

УДК 577.151

ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ЗОНЕ КОНТАКТА СУБЪЕДИНИЦ НА АКТИВНОСТЬ И АЛЛОСТЕРИЧЕСКУЮ РЕГУЛЯЦИЮ ПИРОФОСФАТАЗЫ ИЗ *Mycobacterium tuberculosis**

© 2020 Р.С. Романов^{1,2}, С.А. Курилова^{1,2}, А.А. Байков^{1,2}, Е.В. Родина^{1,2**}

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119991 Москва, Россия; электронная почта: rodina@belozersky.msu.ru

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 26.12.2019

После доработки 14.01.2020

Принята к публикации 14.01.2020

Гексамерная неорганическая пирофосфатаза из *Mycobacterium tuberculosis* (Mt-PPаза) имеет ряд структурных и функциональных особенностей, выделяющих ее среди гомологов, широко распространенных в живом мире. В частности, в ней иные контактные зоны субъединиц и отсутствует *N*-концевой участок полипептидной цепи. В данной работе мы сконструировали две мутантные формы фермента (Ec-Mt-PPазу и R14Q-Mt-PPазу), в первой из которых недостающая часть цепи достроена фрагментом PPазы *Escherichia coli*, а во второй произведена точечная замена в зоне контакта двух тримеров внутри гексамера. Обе модификации значительно улучшили каталитические свойства фермента и устранили его ингибирование избытком кофактора, иона магния. Обнаружена активация Mt-PPазы малыми (~10 мкМ) концентрациями АТР, фруктозо-1-фосфата, L-малата и негидролизуемого аналога субстрата, метиленбисфосфоната (PCP). При концентрации 100 мкМ и выше три первых соединения выступали в роли ингибиторов. Активирующее действие PCP отсутствовало у обеих мутантных форм, а ингибирующее действие фруктозо-1-фосфата отсутствовало у Ec-Mt-PPазы. Эффекты остальных модуляторов изменялись только количественно. Полученные данные свидетельствуют о наличии у Mt-PPазы аллоsterических центров регуляции, которые находятся в зонах контакта субъединиц или структурно связаны с ними.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пирофосфатаза, сайт-направленный мутагенез, аллоsterическая регуляция, фруктозо-1-фосфат, L-малат.

DOI: 10.31857/S0320972520030082

Растворимые неорганические пирофосфатазы семейства I (PPазы) катализируют гидролиз неорганического пирофосфата с образованием двух молекул ортофосфата. PPазы присутствуют в большинстве живых организмов, где выполняют важную задачу — гидролизуют пирофосфат, смещают множество биохимических процессов, протекающих с его образованием, в сторону генерации продуктов [1]. Для PPаз различных ор-

Принятые сокращения: PPаза — неорганическая пирофосфатаза; Mt-PPаза — неорганическая пирофосфатаза из *Mycobacterium tuberculosis*; Ec-PPаза — неорганическая пирофосфатаза из *Escherichia coli*; Ec-Mt-PPаза — химерный фермент, в котором полипептидная цепь Mt-PPазы продолжена на *N*-конце остатками 1–12 Ec-PPазы; R14Q-Mt-PPаза — мутантный вариант Mt-PPазы с заменой Arg14 на Gln; PCP — метиленбисфосфонат.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», BM19-352, 24.02.2020.

** Адресат для корреспонденции.

ганизмов характерны не только сходство строения активного центра и механизма действия, но и высокая консервативность аминокислотных последовательностей и пространственных структур субъединиц [2]. Все PPазы активны только в присутствии ионов магния, которые активируют как фермент, так и субстрат. Всего для катализа необходимы три иона магния на один активный центр: один из них образует с пирофосфатом истинный субстрат (комплекс MgPP_i), а два других формируют на ферменте центр связывания субстрата и, кроме того, активируют нуклеофильную молекулу воды [3]. Ферментативная реакция протекает без образования ковалентного интермедиата, как прямая атака молекулы воды, активированной двумя ионами магния, на атом фосфора [4].

PPаза из *Mycobacterium tuberculosis* (Mt-PPаза) обладает рядом структурных и функциональных особенностей, отличающих ее от большинства известных PPаз, и поэтому входит в группу пер-

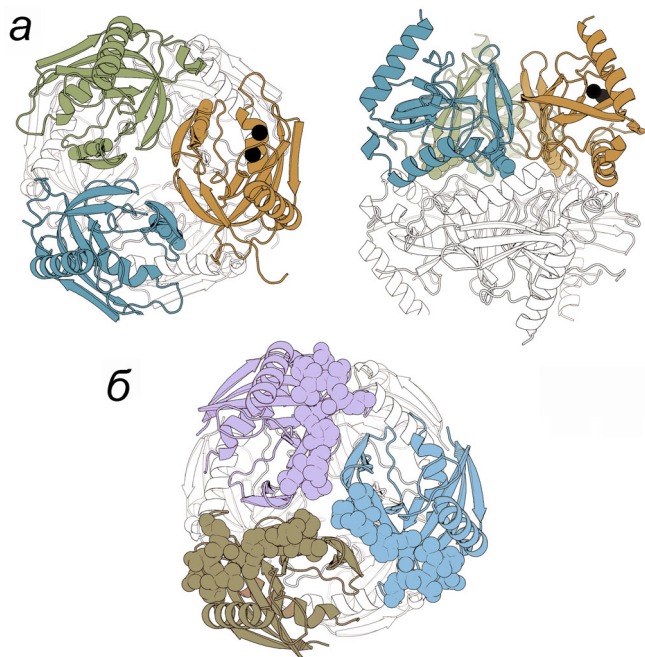


Рис. 1. Пространственные структуры гексамерных Mt-PPазы и Ec-PPазы (коды PDB: 4Z71 и 1OBW соответственно) [8, 9]. *a* – Два вида на Mt-PPазу – вдоль оси третьего порядка (слева) и перпендикулярно ей (справа). Субъединицы верхнего тримера окрашены в разные цвета, нижний тример не окрашен. *N*-концевые остатки каждой цепи указаны соответствующим цветом. Заменяемый остаток Arg14 приведен в виде шаростержневых моделей во всех субъединицах окрашенного тримера. Ионы магния, локализованные в активном центре, показаны в виде черных сфер. *b* – Вид вдоль оси третьего порядка на молекулу Ec-PPазы. Субъединицы верхнего тримера окрашены в разные цвета, нижний тример не окрашен. Остатки 1–12, отсутствующие в Mt-PPазе, показаны более насыщенным цветом в субъединицах верхнего тримера. Рисунок создан с помощью программы UCSF Chimera (UCSF Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics, США) [10]. С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

спективных мишеней для лечения туберкулеза животных и человека [5]. Кроме того, гибридные наноматериалы на основе иммобилизованной Mt-PPазы в качестве активного агента перспективны для лечения пирофосфатной артропатии человека [6]. Фермент представляет собой гексамер, образованный как димер тримеров (рис. 1, *a*). К структурным особенностям этого фермента относится отсутствие 12 аминокислотных остатков на *N*-конце полипептидной цепи по сравнению с PPазой *Escherichia coli* (Ec-PPазы) (рис. 1, *b*) и многих других представителей прокариотических PPаз и, как следствие, измененные межсубъединичные контакты. Кроме того, в активном центре Mt-PPазы присутствуют два остатка гистидина (в положениях 21 и 86) вместо обычных остатков аланина и лизина [7].

В настоящей работе с целью определения путей регуляции Mt-PPазы и поиска структурно-функциональных соотношений в молекуле фермента мы сконструировали мутантные варианты Mt-PPазы с модифицированными межсубъединичными контактами в областях, которые отличаются Mt-PPазу от других прокариотических PPаз. Мы определили влияние этих модификаций на каталитические свойства и взаимодействие Mt-PPазы с аналогом субстрата и тремя потенциальными аллостерическими регуляторами активности фермента в клетке. Полученная информация о путях регуляции Mt-PPазы может быть использована для конструирования специфических ингибиторов этого фермента.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение генетических конструкций. Генетическая конструкция Mt-PPазы/pUC-19 для экспрессии Mt-PPазы дикого типа без дополнительных вставок была получена нами ранее [11]. Мутацию Arg14Gln вводили двустадийной ПЦР с использованием праймеров №1 (прямого) и №2 (обратного) («Евроген», Россия). Последовательности праймеров приведены в табл. 1. Полученный фрагмент вырезали эндонуклеазами рестрикции («Thermo Fisher Scientific», США) по сайтам NdeI и BglII и лигировали в линейаризованный вектор pET-42a для экспрессии («Thermo Fisher Scientific», США).

Для присоединения фрагмента 1–12 Ec-PPазы (SLLNVPAGKDLP) к *N*-концу Mt-PPазы использовали описанные ранее плазмиды Mt-PPазы/pET-28a и NdeI-Ec-PPазы/pUC-18 [11]. Вторая плазида содержит ген пирофосфатазы из *E. coli* и сайт рестрикции эндонуклеазой NdeI на 5'-конце. В качестве праймеров на разных стадиях использовали три олигонуклеотида: №3 (кодирует аминокислотные остатки 9–13 Ec-PPазы и 1–5 Mt-PPазы), №4 (M13/pUC – «обратный» праймер) и №5 (для введения сайта

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных для оценки количества импортированных ДНК-субстратов

Название праймера	5'–3' последовательность праймеров
1	CCAAGGGCCAGCAGAACAATACGAG
2	CTCGTATTTGTTCTGCTGGCCCCTTGG
3	ATGGTCACGTCCAATTGTTCCGGCAGATCTTTA
4	GTTTTCCAGTCACGAC
5	GAGGAGAATTTCGCGTTATCAG

рестрикции EcoRI на 3'-конец гена Mt-PPазы). Последовательности праймеров приведены в табл. 1. Первую полимеразную цепную реакцию проводили с праймерами №3 и №4 и плазмидой NdeI-Ec-PPаза/pUC-18 (получена нами ранее). Полученный фрагмент использовали с праймерами №4 и №5 во второй полимеразной цепной реакции с плазмидой Mt-PPаза/pET-28a (получена нами ранее). Полученный фрагмент ДНК гидролизовали рестриктазами NdeI и EcoRI и лигировали в плазмиду pET23a.

Получение и очистка белков. Вышеописанные генетические конструкции были экспрессированы в клетках *E. coli* BL21(DE3), и рекомбинантные белки были выделены с помощью гидрофобной хроматографии, как описано ранее для Mt-PPазы дикого типа [11]. Выход белков составил 20–30 мг/литр культуры. Чистота ферментов, определенная методом гель-электрофореза по Лэммли [12], составила 99%. Масс-спектрометрическую идентификацию белков проводили с использованием масс-спектрометра типа MALDI TOF/TOF («Bruker Daltonics», США).

Полученные препараты хранили при 4 °С в виде суспензий в растворе сульфата аммония (90% насыщения). Непосредственно перед использованием ферменты растворяли в 50 мМ буфере Tris-HCl, pH 7,5, содержащем 5 мМ MgCl₂, и отделяли сульфат аммония гель-фильтрацией на колонке с Sephadex G-50 («GE Healthcare», США). Концентрацию белков определяли спектрофотометрически, используя следующие величины $A_{280}^{0,1\%}$, рассчитанные из аминокислотного состава с помощью программы ProtParam: для Mt-PPазы дикого типа и R14Q-Mt-PPазы – 1,04; для Ec-Mt-PPазы – 0,98. Теоретическая молекулярная масса субъединицы, рассчитанная с помощью программы ProtParam, составила: для Mt-PPазы дикого типа и R14Q-Mt-PPазы – 18,3 кДа, для Ec-Mt-PPазы – 19,5 кДа.

Определение скорости гидролиза пирофосфата. Каталитическую активность PPазы определяли по скорости образования продукта (фосфата) по описанной ранее методике, основанной на реакции фосфомолибдатного комплекса с малахитовым зеленым и цитратом натрия [13]. К 25 мкл 50 мМ буфера Tris-HCl, pH 7,5, содержащего, если не указано иначе, 5 мМ Mg²⁺ и 50 мкМ комплекс MgPP_i (общая концентрация PP_i – 74,5 мкМ), добавляли 0,5–1,5 мкл раствора PPазы (конечная концентрация белка 0,2–0,4 мкг/мл) и инкубировали смесь при 20 °С. Через фиксированные промежутки времени в интервале 15–60 с реакцию останавливали добавлением окрашивающего раствора: малахитовый зеленый («Sigma Aldrich», США), молибдат аммония («Реахим», Россия), соляная

кислота («СигмаТек», Россия), поливиниловый спирт («ЛенРеактив», Россия), вода деионизованная, через 15 с добавляли водный раствор цитрата натрия («Sigma Aldrich», США) и измеряли светопоглощение при 590 нм с использованием планшетного спектрофотометра Victor x5 («Perkin Elmer», США).

Определение зависимости стабильности Mt-PPазы от pH и температуры. Раствор фермента (0,1 мг/мл) в буфере с pH в диапазоне 2,6–11, содержащем 5 мМ Mg²⁺, инкубировали в течение суток при 4 °С, после чего измеряли остаточную активность, как описано выше. В качестве буферов для различных диапазонов pH использовали 50 мМ лимонную кислоту/50 мМ цитрат натрия (pH 2,6–4,6); 50 мМ MES (pH 5,6–6,6); 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5–8,6); 50 мМ CAPSO (pH 9,6) и CAPS 50 мМ (pH 10,6–11). Для характеристики термостойкости PPазы (0,1 мг/мл) инкубировали 10 мин при 25–75 °С в 50 мМ Tris-HCl, pH 7,5 (измерено при 25 °С), содержащем 5 мМ Mg²⁺, и затем измеряли остаточную активность.

Аналитическое ультрацентрифугирование. Для седиментационного анализа использовали аналитическую ультрацентрифугу Spinco E («Beckman», США) со сканированием при 280 нм при скорости вращения 48000 об./мин. Перед седиментацией образцы, содержавшие фермент, 50 мМ Tris-HCl, pH 7,5 и 5 мМ MgCl₂, преинкубировали ночь при 4 °С.

Математическая обработка результатов и моделирование структуры. Кривые ингибирования ионами фтора и кальция, а также влияние метиленисбисфосфоната (PCP) описывали простой гиперболической функцией. Для описания колоколообразной зависимости активности Mt-PPазы от концентрации модулирующего соединения использовали схему.

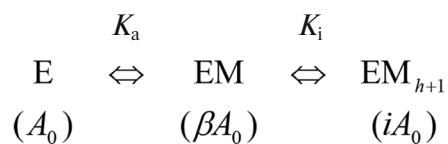


Схема. Активация и ингибирование активности PPазы при последовательном связывании ионов модулятора. М – модулятор (ион магния, PCP или аллостерический эффектор), K_a и K_i – кажущиеся константы диссоциации комплекса фермента с активирующим и ингибирующим ионом модулятора соответственно, A_0 – активность в отсутствие модулятора, β и i – коэффициенты активации и ингибирования соответственно. Для модуляции ионами магния $\beta = \infty$, $i = 0$, поскольку активность в отсутствие Mg²⁺ и при его бесконечной концентрации равна нулю. Параметры в скобках под формами фермента обозначают их активности. Максимальная активность соответствует комплексу EM

Определение скорости для схемы представлено уравнением (1), в котором A — измеряемая активность, h — эмпирический коэффициент (аналог коэффициента Хилла). Величина h меньше или равна числу ионов модулятора, связывание которых вызывает ингибирование и может иметь нецелые значения.

$$A = A_0(1 + \beta[M]/K_a + i[M]^{h+1}/K_a K_i^h) / (1 + [M]/K_a + [M]^{h+1}/K_a K_i^h). \quad (1)$$

Для описания колоколообразной рН-зависимости стабильности РРазы использовали уравнение (2), которое предполагает наличие основных и кислотных групп с pK_{a1} и pK_{a2} в количестве m и n соответственно:

$$A = A_{\max} / [1 + 10^{m(pK_{a1} - pH)} + 10^{n(pH - pK_{a2})}]. \quad (2)$$

Для определения температуры полуинактивации РРазы ($T_{1/2}$) из зависимости активности от температуры (T) преинкубации использовали уравнение (3), где a — эмпирический коэффициент.

$$A = A_{\max} / [1 + (T/T_{1/2})^a]. \quad (3)$$

Для аппроксимации данных методом нелинейной регрессии использовали программу SigmaPlot («Systat Software Inc», США). Коэффициент седиментации ($s_{20,w}$) рассчитывали из профиля седиментации с помощью программы SedFit [14]. Гомологическое моделирование проводили с помощью программы SWISS-MODEL со стандартными значениями параметров и структурой Ес-РРазы (PDB ID 1OBW) в качестве шаблона.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выбор направлений мутагенеза. Мт-РРазы отличается от Ес-РРазы и большинства других РРаз семейства I отсутствием N -концевого фрагмента из 12 а.о. [7]. В Ес-РРазе в этот фрагмент (SLLNVPAGKDLР) входят несколько остатков, формирующих водородные связи и гидрофобные контакты между различными субъединицами внутри тримера (Ser1-Ser36, Leu2-Ala38) [11]. Вследствие отсутствия указанного фрагмента в Мт-РРазе открыта полость во внутритримерном интерфейсе, в которой могут связываться низкомолекулярные лиганды — потенциальные аллостерические эффекторы.

Для проверки этого предположения было решено сконструировать химерный белок Ес-Мт-

РРазу, в котором полипептидная цепь Мт-РРазы продолжена на N -конце остатками 1–12 Ес-РРазы. Методом гомологического моделирования было показано, что добавленный фрагмент может занимать то же положение, что и в Ес-РРазе (рис. 1, б), и затруднять связывание аллостерических эффекторов в полости внутритримерного интерфейса.

Остаток Arg14 экспонирован в межтримерную полость Мт-РРазы (рис. 1, а) и входит в положительно заряженный кластер Lys11-Arg14-Arg101, образованный остатками трех субъединиц. Сеть контактов Arg14 различной природы удерживает петлю Tyr31–Met36, участвующую в формировании межтримерного контакта. В Ес-РРазе расположенный в другом участке субъединицы аналогичный кластер остатков Lys112, Lys115 и Lys146 представляет собой аллостерический центр, связывающий активатор АТР и ингибитор фруктозо-1-фосфат [15, 16].

Получение и характеристика мутантных форм Мт-РРазы. Две мутантные формы Мт-РРазы, R14Q-Мт-РРазы и Ес-Мт-РРазы, были продуцированы в *E. coli*. Идентичность белков была подтверждена методом MALDI-масс-спектрометрии по массам полноразмерных белков и наборам пептидов после гидролиза белков трипсином (данные не приведены).

Четвертичная структура трех форм Мт-РРазы была определена методом скоростной седиментации (рис. 2). Во всех случаях основная масса белка представляла собой гексамерный белок (табл. 2). Во всех препаратах присутствовало также малое количество более тяжелой формы (предположительно додекамера).

Для мутантных форм Мт-РРазы были определены каталитические параметры гидролиза $MgPP_i$, максимальная активность и K_m , константы диссоциации комплексов с металлом-кофактором Mg^{2+} и ингибиторами Ca^{2+} и F^- , а также параметры рН и термостабильности гексамера (табл. 3). Параметр K_a (Mg^{2+}) в табл. 3 относится к одному из двух ионов Mg^{2+} , которые активируют фермент. Второй активирующий ион Mg^{2+} связывается гораздо прочнее, и поэтому не про-

Таблица 2. Коэффициенты седиментации ($s_{20,w}$) и предполагаемая олигомерная организация пирофосфатаз

Фермент	$s_{20,w}$, S	Олигомерная форма
Мт-РРазы	6,6	гексамер
R14Q-Мт-РРазы	7,4	гексамер
Ес-Мт-РРазы	7,8	гексамер
Ес-РРазы [17]	6,0	гексамер

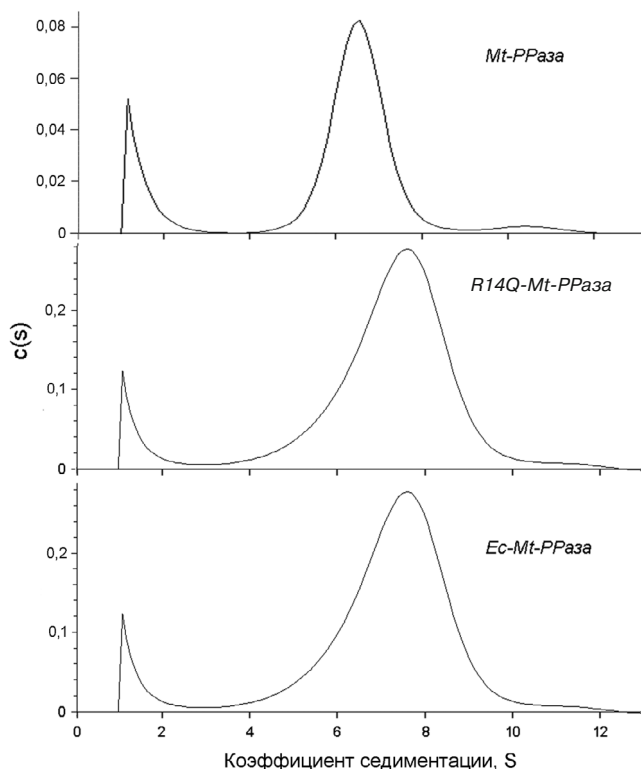


Рис. 2. Распределение величин коэффициента седиментации для трех форм Mt-PPазы при 20 °С. Концентрация белка во всех экспериментах – 0,6 мг/мл

является в использованном диапазоне концентраций Mg^{2+} . Как следует из полученных данных, мутации значительно «улучшали» каталитические характеристики Mt-PPазы – увеличивали максимальную активность (каталитическую константу) и уменьшали K_m , приближая ее по этим параметрам к Ec-PPазе. Кроме того, мутации снимали ингибирующий эффект металлокофактора (Mg^{2+}) при его высоких концентрациях. С другой стороны, мутации снижали сродство к активирующему иону Mg^{2+} , а мутация R14Q

снижала термостойкость. Действие ингибиторов, ионов фтора и кальция, в большинстве случаев изменилось мало, кроме увеличения чувствительности химерного белка к ионам кальция.

Активация и ингибирование Mt-PPазы аналогом субстрата. Для PPаз семейства I характерно наличие аллостерических центров связывания эффекторов в зонах контакта субъединиц, которые структурно обособлены от активного центра [3]. Некоторые аналоги пирофосфата могут связываться как в активном центре, так и в аллостерических регуляторных центрах. Так, например в Ec-PPазе аллостерический регулятор АТР может гидролизироваться в активном центре [15]. Свободная форма пирофосфата, связываясь в аллостерическом центре, активирует Ec-PPазу [19, 22]. Чтобы проверить наличие аллостерических центров связывания в Mt-PPазе и их взаимосвязь с областями олигомерных контактов, мы исследовали влияние негидролизуемого аналога пирофосфата, РСР, на активность Mt-PPазы и ее мутантных вариантов Ec-Mt-PPазы и R14Q-Mt-PPазы с заменами в области контакта субъединиц.

Полученные данные (рис. 3, а) показывают резкое различие в поведении Mt-PPазы и Ec-PPазы. Если Ec-PPаза ингибировалась под действием РСР почти полностью, то Mt-PPаза активировалась этим аналогом пирофосфата. Мутантные формы Mt-PPазы, в отличие от нативного фермента, ингибировались под действием РСР, но снижение активности составило не более 40%.

Полученные зависимости были описаны упрощенной схемой, предполагающей связывание только активирующей или ингибирующей молекул РСР. Полученные в рамках этой схемы параметры (табл. 4) показывают, что сродство Mt-PPазы дикого типа к РСР на порядок ниже, чем у Ec-PPазы. У химерного белка, Ec-Mt-PPазы,

Таблица 3. Каталитические свойства вариантов Mt-PPазы в сравнении с Ec-PPазой

Параметр	Mt-PPаза	R14Q-Mt-PPаза	Ec-Mt-PPаза	Ec-PPаза
Максимальная активность, МЕ/мг	295 ± 7	646 ± 13	505 ± 10	754 ± 13 [7]
K_m , мкМ	6,0 ± 0,5	2,6 ± 0,3	2,9 ± 0,1	3,2 ± 0,3 [7]
K_a (Mg^{2+}), мкМ	140 ± 40	600 ± 30	360 ± 20	200 ± 40 [18]
K_i (Mg^{2+}), мМ	36 ± 4			16 ± 2 [19]
K_i (F^-), мкМ	660 ± 30	710 ± 40	500 ± 30	36 ± 0,2 [20]
K_i (Ca^{2+}), мкМ	310 ± 30	400 ± 22	160 ± 10	10 ± 1 [21]
$T_{1/2}$ инактивации, °С	60 ± 2	40 ± 1	57 ± 2	70 ± 3
pK_{a1} (рН-стабильность)	5,4 ± 0,2	4,5 ± 0,3	5,4 ± 0,02	6 ± 0,2 [7]
m	4,3 ± 1,5	4 ± 0,5	2,5 ± 0,2	6 [7]
pK_{a2} (рН-стабильность)	9,8 ± 0,2	8,7 ± 0,3	8,04 ± 0,06	> 8,5 [7]
n	4,3 ± 1,5	4 ± 0,5	2,5 ± 0,2	6 [7]

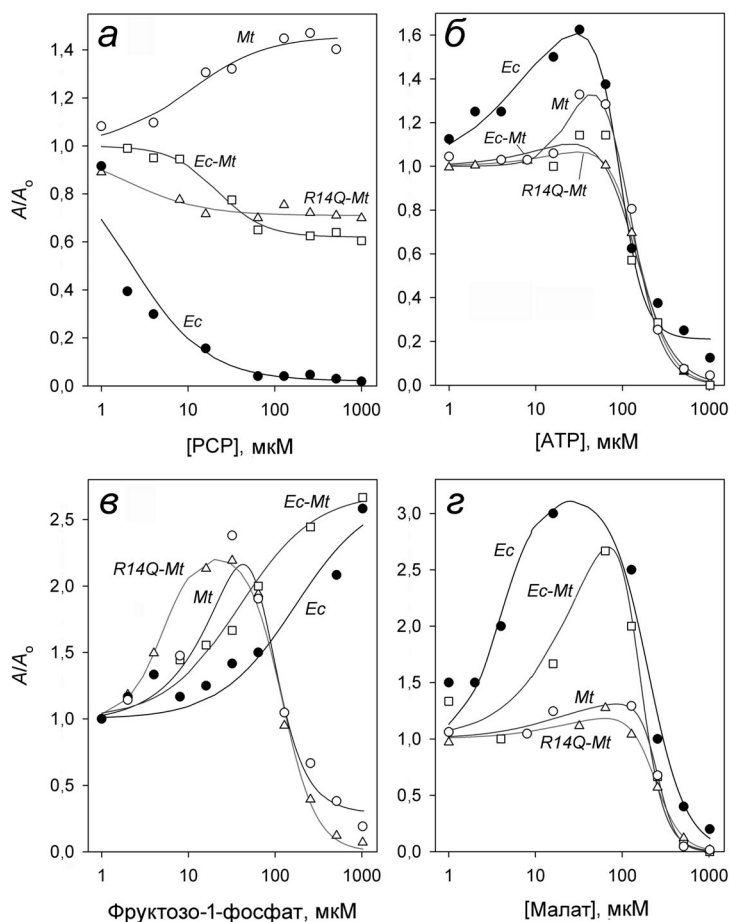


Рис. 3. Влияние РСР (а), АТР (б), фруктозо-1-фосфата (в) и L-малата (з) на активности Ес-РРазы и трех форм Мт-РРазы. Обозначения: Мт – Мт-РРазы, R14Q-Мт – Мт-РРазы с заменой R14Q, Ес-Мт – Мт-РРазы, соединенная с фрагментом Ес-РРазы, Ес – Ес-РРазы. Линиями показана наилучшая аппроксимация уравнением (1)

средство к РСР практически не изменилось, в то время как у варианта R14Q-Мт-РРазы оно возросло на порядок.

Активация и ингибирование Мт-РРазы метаболитами. Влияние на активность Мт-РРазы было измерено также для АТР, фруктозо-1-фосфата и L-малата. Выбор этих соединений объясняется тем, что АТР и фруктозо-1-фосфат влияют на активность Ес-РРазы [15, 16], а связанный L-малат был обнаружен в кристаллической структуре РРазы из *Bartonella henselae* (PDB ID 3SW5). Все три соединения в малых концентрациях активировали, а в больших – ингибировали Мт-РРазу (рис. 3, б–з). Влияние АТР и L-малата было качественно похожим для всех исследованных белков, тогда как для фруктозо-1-фосфата отсутствовал эффект ингибирования в случае Ес-РРазы и Ес-Мт-РРазы. По профилю изменения активности под действием фруктозо-1-фосфата и L-малата химерная Ес-Мт-РРазы больше походит на Ес-РРазу, чем на Мт-РРазу, в то время как вариант R14Q-Мт-РРазы практически не отличается от Мт-РРазы дикого типа

(рис. 3, в). Рассчитанные в рамках схемы параметры активации и ингибирования приведены в табл. 4. Как видно, значения K_a для разных форм Мт-РРазы и разных модуляторов в большинстве случаев различаются не сильно. Резкое падение активности при высоких концентрациях АТР и L-малата указывает на то, что этот эффект обусловлен кооперативным связыванием нескольких молекул ингибитора. Величина h равна примерно двум для АТР и трем – для L-малата. В большинстве остальных случаев она не отличается достоверно от единицы.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Использованные в данной работе мутации так или иначе затрагивают олигомерные контакты в гексамерной Мт-РРазе, что позволяет объяснить большинство наблюдаемых эффектов. Повышенная активность мутантных форм может означать, что образование олигомерных контактов в гексамере природной Мт-РРазы по-

Таблица 4. Параметры схемы для взаимодействия Ес-РРаза и трех форм Мт-РРаза с РСР, АТР, фруктозо-1-фосфатом и L-малатом, полученные из рис. 3

Фермент	Активация		Ингибирование		h
	β	K_a , мкМ	i	K_i , мкМ	
<i>Метиленбисфосфонат (РСР)</i>					
Мт-РРаза	1,46 ± 0,05	11 ± 3			
R14Q-Мт-РРаза			0,71 ± 0,01	1,9 ± 0,2	~1
Ес-Мт-РРаза			0,58 ± 0,02	22 ± 7	~1
Ес-РРаза			<0,03	2,2 ± 0,6	~1
<i>АТР</i>					
Мт-РРаза	1,60 ± 0,2	30 ± 10	<0,03	120 ± 20	2,3 ± 0,3
R14Q-Мт-РРаза	1,19 ± 0,03	40 ± 10	<0,03	140 ± 40	2,2 ± 0,1
Ес-Мт-РРаза	1,25 ± 0,25	24 ± 3	<0,03	130 ± 10	1,9 ± 0,3
Ес-РРаза	1,8 ± 0,1	7 ± 3	0,21 ± 0,05	90 ± 10	3 ± 1
<i>Фруктозо-1-фосфат</i>					
Мт-РРаза	≥4	≥60	0,3 ± 0,2	≤60	1,9 ± 0,7
R14Q-Мт-РРаза	3,3 ± 0,4	14 ± 6	<0,03	84 ± 14	1,9 ± 0,2
Ес-Мт-РРаза	2,5 ± 0,2	50 ± 10			
Ес-РРаза	2,5 ± 0,3	280 ± 180			
<i>L-Малат</i>					
Мт-РРаза	1,4 ± 0,1	20 ± 10	<0,03	250 ± 10	4 ± 1
R14Q-Мт-РРаза	1,30 ± 0,05	30 ± 10	<0,03	240 ± 10	2,8 ± 0,1
Ес-Мт-РРаза	4 ± 1	40 ± 10	<0,03	141 ± 12	3 ± 0,7
Ес-РРаза	3,2 ± 0,3	4 ± 1	<0,03	230 ± 10	2 ± 0,5

давляет ее потенциальную активность, т.е. вызывает своего рода «внутреннее ингибирование» («самоингибирование»). Поэтому нарушение олигомерных контактов произведенными структурными изменениями снимает внутреннее ингибирование и в определенном смысле восстанавливает каталитическую активность белка, увеличивая каталитическую константу и уменьшая K_m . При этом модификации зон контакта субъединиц не изменили олигомерное строение Мт-РРаза, а лишь сделали структуру молекулы белка менее компактной, о чем свидетельствуют данные седиментационного анализа. Так, величины $s_{20,w}$ для мутантных форм в табл. 2 значимо выше, чем для фермента дикого типа, даже при учете увеличенной на 8% массы Ес-Мт-РРаза. Кроме влияния на активность мутации уменьшили сродство фермента к ионам металла-кофактора и устранили ингибирование его избытком. Следовательно, и действие кофактора, который тоже связывается в активном центре, может зависеть от контактов субъединиц и компактности молекулы в целом.

Активация Мт-РРаза негидролизуемым аналогом субстрата, РСР, может означать, что он связывается не в активном центре. Положительная гетеротропная кооперативность действия активных центров представляется менее вероятным объяснением, поскольку субстрат взаимодействует с активными центрами не кооперативно [7, 11]. Наши данные позволяют предположить, что сайт связывания активирующей молекулы РСР расположен в межсубъединичных интерфейсах либо связан через них с активным центром, поскольку обе мутации устраняют активацию Мт-РРаза под действием РСР. Наблюдаемое в мутантных формах частичное ингибирование также трудно объяснить, если считать, что РСР связывается в активном центре. Более вероятно, что ингибирование возникает по мере заполнения аллостерических центров связывания.

В целом действие РСР на Мт-РРаза имеет принципиально иной характер, чем его действие на Ес-РРаза, которую он конкурентно ингибирует с K_i приблизительно равной K_m [22]. Отсюда следует важный практический вывод о

неперспективности конструирования селективных ингибиторов Mt-PPазы с помощью рационального дизайна на основе аналогов субстрата.

АТФ, фруктозо-1-фосфат и L-малат являются важными для всех организмов метаболитами, поэтому их влияние на активность Mt-PPазы, наблюдаемое *in vitro*, может отражать их участие в регуляции PPаз *in vivo*. Константы диссоциации комплексов фермента с этими эффекторами лежат в диапазоне 10–300 мкМ, что позволяет использовать их в качестве лидерных соединений для создания высокоаффинных ингибиторов. Действие АТФ и L-малата на Mt-PPазу и Ec-PPазу качественно похоже в том, что их низкие концентрации вызывают активацию, которая переходит в ингибирование при высоких концентрациях (рис. 3, б, г). Это свидетельствует о наличии нескольких центров их связывания в белке. Разнонаправленное действие на Mt-PPазу оказывает и фруктозо-1-фосфат, тогда как Ec-PPазу он только активирует. Ингибирующее действие фруктозо-1-фосфата на Mt-PPазу устраняется после присоединения к ней N-концевого фрагмента Ec-PPазы. Эта модификация Mt-PPазы делает ее похожей на Ec-PPазу и по влиянию РСР.

В совокупности полученные данные свидетельствуют о наличии в Mt-PPазе не менее одного, а возможно, двух или трех аллостерических центров связывания эффекторов. Активация всеми лигандами, а также неполное ингибирование под действием РСР не могут быть следствием их связывания в активном центре. Соответствующий аллостерический центр (условно названный «активирующим») может быть расположен в зоне межтримерных контактов субъединиц. Это следует из данных рентгеноструктурного анализа других гексамерных PPаз, в которых были обнаружены связанные L-малат и фосфат только в этой зоне (PDB ID 3SW5 и 3FQ3 соответственно), что означает, что соответствующий центр имеет наибольшее сродство к этим лигандам. Сродство «ингибирующего» центра к АТФ, фруктозо-1-фосфату и L-малату значительно меньше, но связывание с ним характеризуется высокой кооперативностью. Наблюдаемые закономерности можно объяснить в рамках модели, согласно которой и активирую-

щие, и ингибирующие лиганды связываются в одном и том же аллостерическом центре, расположенном в межсубъединичном интерфейсе каждой субъединицы. Заполнение этого центра в одной субъединице вызывает активацию фермента, а его заполнение в других субъединицах вызывает ингибирование, что предполагает взаимозависимость субъединиц.

Альтернативное объяснение предполагает связывание эффекторов в двух или даже трех аллостерических центрах на субъединицу, один из которых активирующий, а другие – ингибирующие. Если ингибирующий центр один на субъединицу, то для объяснения кооперативности ингибирования следует допустить взаимовлияние ингибирующих центров разных субъединиц. Поскольку полость в межтримерном интерфейсе, вероятно, является активирующим центром, роль ингибирующего центра может выполнять полость, открытая в Mt-PPазе из-за отсутствия N-концевого фрагмента. В пользу этого говорит отсутствие ингибирования фруктозо-1-фосфатом Ec-Mt-PPазы, в чем она похожа на Ec-PPазу. В случае двух ингибирующих центров они могут быть независимыми. При этом один из ингибирующих центров может быть активным центром фермента. Возможность связывания в нем АТФ следует из наличия АТФ-азной активности у Mt-PPазы [11]. Экспериментально обоснованный выбор между всеми этими возможностями является целью наших дальнейших исследований.

Благодарности. Мы благодарим П. В. Калмыкова и Н. Н. Магретову за проведение скоростной седиментации, Н. Н. Воробьеву за предоставленные образцы Ec-PPазы и М. В. Серебрякову за проведение масс-спектрометрического анализа белков. MALDI-масс-спектрометр был доступен в рамках Программы развития МГУ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит каких-либо результатов, полученных с участием людей или животных, использованных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baykov, A.A., Cooperman, B.S., Goldman, A., and Lahti, R. (1999) *Cytoplasmic inorganic pyrophosphatase*, in *Inorganic Polyphosphates*, Springer, pp. 127–150.
2. Cooperman, B.S., Baykov, A.A., and Lahti, R. (1992) Evolutionary conservation of the active site of soluble inorganic pyrophosphatase, *Trends Biochem. Sci.*, **17**, 262–266.
3. Самыгина В.Р. (2016) Неорганические пирофосфатазы: структурная вариативность на службе функции, *Успехи химии*, **85**, 464–476.
4. Heikinheimo, P., Tuominen, V., Ahonen, A.-K., Teplyakov, A., Cooperman, B., Baykov, A., Lahti, R., and Goldman, A. (2001) Toward a quantum-mechanical description of metal-assisted phosphoryl transfer in pyrophosphatase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 3121–3126.
5. Vijayan, M. (2005) Structural biology of mycobacterial proteins: the Bangalore effort, *Tuberculosis (Edinb)*, **85**, 357–366.

6. Rodina, E.V., Valueva, A.V., Yakovlev, R.Y., Vorobyeva, N.N., Kulakova, I.I., Lisichkin, G.V., and Leonidov, N.B. (2015) Immobilization of inorganic pyrophosphatase on nanodiamond particles retaining its high enzymatic activity, *Biointerphases*, **10**, 041005.
7. Tammenkoski, M., Benini, S., Magretova, N.N., Baykov, A.A., and Lahti, R. (2005) An unusual, His-dependent family I pyrophosphatase from *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Biol. Chem.*, **280**, 41819–41826.
8. Pratt, A.C., Dewage, S.W., Pang, A.H., Biswas, T., Barnard-Britson, S., Cisneros, G.A., and Tsodikov, O.V. (2015) Structural and computational dissection of the catalytic mechanism of the inorganic pyrophosphatase from *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Struct. Biol.*, **192**, 76–87.
9. Harutyunyan, E.H., Oganessyan, V.Y., Oganessyan, N.N., Avaeva, S.M., Nazarova, T.I., Vorobyeva, N.N., Kurilova, S.A., Huber, R., and Mather, T. (1997) Crystal structure of holo inorganic pyrophosphatase from *Escherichia coli* at 1.9 Å resolution. Mechanism of hydrolysis, *Biochemistry*, **36**, 7754–7760.
10. Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., and Ferrin, T.E. (2004) UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis, *J. Comput. Chem.*, **25**, 1605–1612.
11. Rodina, E.V., Vainonen, L.P., Vorobyeva, N.N., Kurilova, S.A., Sitnik, T.S., and Nazarova, T.I. (2008) Metal cofactors play a dual role in *Mycobacterium tuberculosis* inorganic pyrophosphatase, *Biochemistry (Moscow)*, **73**, 897–905.
12. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680.
13. Rowlands, M.G., Newbatt, Y.M., Prodromou, C., Pearl, L.H., Workman, P., and Aherne, W. (2004) High-throughput screening assay for inhibitors of heat-shock protein 90 ATPase activity, *Anal. Biochem.*, **327**, 176–183.
14. Schuck, P., Gillis, R.B., Besong, T.M., Almutairi, F., Adams, G.G., Rowe, A.J., and Harding, S.E. (2014) SEDFIT–MSTAR: molecular weight and molecular weight distribution analysis of polymers by sedimentation equilibrium in the ultracentrifuge, *Analyst*, **139**, 79–92.
15. Rodina, E.V., Vorobyeva, N.N., Kurilova, S.A., Sitnik, T.S., and Nazarova, T.I. (2007) ATP as effector of inorganic pyrophosphatase of *Escherichia coli*. The role of residue Lys112 in binding effectors, *Biochemistry (Moscow)*, **72**, 100–108.
16. Vorobyeva, N.N., Kurilova, S.A., Anashkin, V.A., and Rodina, E.V. (2017) Inhibition of *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase by fructose-1-phosphate, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 953–956.
17. Вайнонен Ю.П., Курилова С.А., Аваева С.М. (2002) Гексамерная, тримерная, димерная и мономерная формы неорганической пирофосфатазы *Escherichia coli*, *Биоорганическая химия*, **28**, 426–433.
18. Avaeva, S.M., Rodina, E.V., Kurilova, S.A., Nazarova, T.I., Vorobyeva, N.N., Harutyunyan, E.H., and Oganessyan, V.Y. (1995) Mg²⁺ activation of *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase, *FEBS Lett.*, **377**, 44–46.
19. Sitnik, T., Vainonen, J., Rodina, E., Nazarova, T., Kurilova, S., Vorobyeva, N., and Avaeva, S. (2003) Effector site in *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase is revealed upon mutation at the intertrimeric interface, *IUBMB Life*, **55**, 37–41.
20. Samygina, V.R., Moiseev, V.M., Rodina, E.V., Vorobyeva, N.N., Popov, A.N., Kurilova, S.A., Nazarova, T.I., Avaeva, S.M., and Bartunik, H.D. (2007) Reversible inhibition of *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase by fluoride: trapped catalytic intermediates in cryo-crystallographic studies, *J. Mol. Biol.*, **366**, 1305–1317.
21. Avaeva, S.M., Vorobyeva, N.N., Kurilova, S.A., Nazarova, T.I., Polyakov, K.M., Rodina, E.V., and Samygina, V.R. (2000) Mechanism of Ca²⁺-induced inhibition of *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase, *Biochemistry (Moscow)*, **65**, 373–387.
22. Vainonen, J.P., Vorobyeva, N.N., Rodina, E.V., Nazarova, T.I., Kurilova, S.A., Skoblov, J.S., and Avaeva, S.M. (2005) Metal-free PP_i activates hydrolysis of MgPP_i by an *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase, *Biochemistry (Moscow)*, **70**, 69–78.

INFLUENCE OF STRUCTURE VARIATIONS IN THE INTERSUBUNIT CONTACTS ON ACTIVITY AND ALLOSTERIC REGULATION OF INORGANIC PYROPHOSPHATASE FROM *Mycobacterium tuberculosis**

R. S. Romanov^{1,2}, S. A. Kurilova^{1,2}, A. A. Baykov^{1,2}, and E. V. Rodina^{1,2**}

¹ Lomonosov Moscow State University, Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, 119991 Moscow, Russia; E-mail rodina@belozersky.msu.ru

² Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, 119991 Moscow, Russia

Received December 26, 2019

Revised January 14, 2020

Accepted January 14, 2020

Hexameric inorganic pyrophosphatase from *Mycobacterium tuberculosis* (Mt-PPase) has a number of structural and functional features that distinguish it from homologues, widely distributed in all lifeforms. In particular, it has unusual zones of intersubunit contacts, and the N-terminal region of its polypeptide chain is absent. In this work, we constructed two mutant forms of the enzyme (Ec-Mt-PPase and R14Q-Mt-PPase). In the first mutant, the missing part of the polypeptide chain is compensated by a fragment of PPase from *Escherichia coli* (Ec-PPase). In the second mutant, a single amino acid residue substitution was made in the contact interface of two trimers inside the hexamer. Both modifications significantly improved the catalytic properties of the enzyme and eliminated its inhibition by excess of the cofactor (Mg²⁺). Activation of Mt-PPase by small (~10 μM) concentrations of ATP, fructose-1-phosphate, L-malate, and a nonhydrolyzable analogue of the substrate – methylene bisphosphonate (PCP) – was found. At concentrations of 100 μM and above, the first three compounds acted as inhibitors. The activating effect of PCP was absent in both mutant forms, and the inhibitory effect of fructose-1-phosphate was absent in Ec-Mt-PPase. The effects of the other modulators varied among mutants only quantitatively. The data obtained indicate the presence of allosteric centers in Mt-PPase, which are located in the zones of intersubunit contacts or associated with them.

Keywords: pyrophosphatase, site-directed mutagenesis, allosteric regulation, fructose-1-phosphate, L-malate