

ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

УДК 577.15.024.У

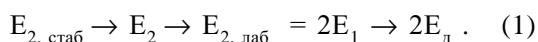
СТАБИЛИЗАЦИЯ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ ИОНАМИ МАГНИЯ

О.М. Полторац, Е.С. Чухрай, И.Ю. Торшин, С. Наккар, М.Н. Веселова

(кафедра физической химии)

Показано на примере щелочной фосфатазы, иммобилизованной на поверхности силикагеля, модифицированного холестерином, что присутствие иона магния в контактном растворе стабилизирует нативный димер фермента, а разрушение координационной сферы магния и вымывание последнего во внешнюю среду (хранение образца в отсутствие ионов магния) приводит к возникновению лабильного легко диссоциируемого димера, крайне неустойчивого при хранении в среде, лишенной магния.

Анализ структуры межбелкового контакта щелочной фосфатазы *E. coli* по данным РСА [1] показал соответствие между минимальным числом стадий в кинетическом механизме термоинактивации и числом контактных участков между глобулами димера, равным трем [2]. В этой работе показано, что третичная структура фермента стабилизирована межбелковым взаимодействием глобул димера, выделены два узловых аминокислотных остатка Glu 410 и Gln 416, оказывающие, вероятно, наибольшее влияние на термостабильность. Разрушение всех связей любого из этих аминокислотных остатков приводит к сильному изменению конформации петли 402-417, несущей каталитически активный His 412, и к полной потере каталитической активности фермента. Таким образом, работа [2] предлагает структурное обоснование потери каталитической активности в результате диссоциации димера щелочной фосфатазы на протомеры согласно (1)



В схеме (1) последовательно показаны нативный стабильный димер, стабилизированный тремя межсубъединичными контактами, интермедиат, стабилизированный двумя контактами, лабильный димер, стабилизированный лишь одним контактом, влияющим на положение His 412, неактивный протимер и денатурированный протимер; k_1 , k_{-1} и k_d – соответствующие константы скорости диссоциации и ассоциации лабильного димера и денатурации протимера.

Согласно работе [3], каждая глобула имеет клиновидную форму. Две из наклонных поверхностей – плоскости межбелкового контакта I и II (вторая

плоскость, параллельна большой β -структуре, содержит спираль 333-359 и петлю-спираль 288-298-312. Через линию двугранного угла проходит плоскость петли 1-29 (плоскость III межбелкового контакта). Расстояние между С- и N-концами полипептидной цепи составляет 30 Å. Оба конца расположены в передней части глобулы, причем С-конец расположен со стороны межбелкового контакта. Ближе к основанию клина в задней его части расположена малая β -структура, в передней – отрезки полипептидной цепи 234-264 и 160-200. Большая β -структура перпендикулярна плоскости межбелкового контакта. Основания «клиньев» глобул направлены в противоположные стороны.

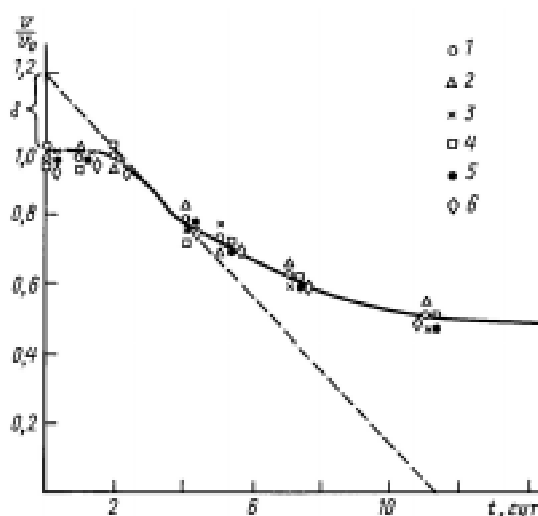


Рис. 1. Кинетика термоинактивации щелочной фосфатазы, адсорбированной на SiO₂+хол, при 23° в 0.05 М трис-буфере в присутствии 0.03М MgCl₂ при разных значениях pH: 1 – 7.2, 2 – 7.6, 3 – 8.0, 4 – 8.7, 5 – 9.2, 6 – 9.5 ($v_0 = 25.5 \cdot 10^{-4}$ ОЕ/мин·мкг белка)

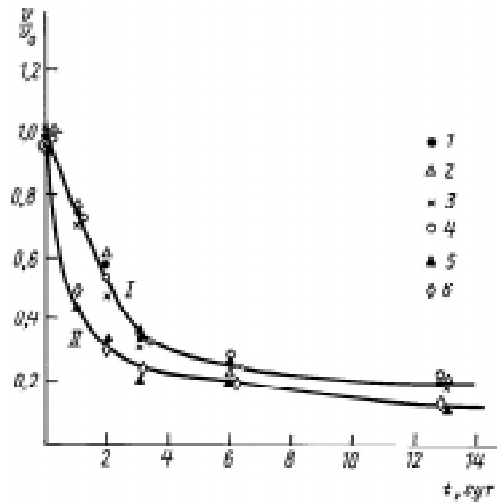


Рис. 2. Кинетика термоинактивации иммобилизованной щелочной фосфатазы в отсутствие ионов магния при pH: 1 – 7.2, 2 – 7.6, 3 – 8.0, 4 – 8.7, 5 – 9.2, 6 – 9.5 ($v_0 = 25.5 \cdot 10^{-4}$ ОЕ/мин·мкг белка)

В настоящей работе приведены данные термоинактивации щелочной фосфатазы, адсорбированной на силикагеле, модифицированном холестерином. Методы приготовления носителя, методы адсорбции и определения активности приведены в работе [4]. Для проявления максимальной активности щелочной фосфатазы, приготовленной из кишечника цыпленка (фирма «Reanal»), необходимо присутствие в активном центре фермента помимо двух каталитически активных атомов цинка ионов магния [1]. Прочность связывания магния в активном центре различна для ферментов, полученных из различных источников. В активном центре магний находится на расстоянии 5 и 7 Å соответственно от первого и второго атомов цинка. Он не взаимодействует непосредственно с субстратом. Роль магния в активном центре щелочной фосфатазы остается неясной, хотя в литературе этому вопросу уделено много внимания. Важная информация получена в работе [5], где проведено сравнение аминокислотных последовательностей в области активного центра с последующим сайт-направленным мутагенезом фермента из *E. coli*. Ясно одно – ионы магния в активном центре щелочной фосфатазы бактериального происхождения связаны прочнее, чем в щелочной фосфатазе животного происхождения. Щелочная фосфатаза животного происхождения является удобным объектом изучения стабилизирующей роли магния, поскольку магний легко и обратимо связывается в ее активном центре. На рис. 1–3 представлены кинетические кривые термоинактивации фермента при хранении в 0.05M трис-HCl буферном растворе в присут-

ствии (рис. 1) и в отсутствие (рис. 2, 3) ионов магния в контактном растворе. Иммобилизованная щелочная фосфатаза в этом эксперименте была удобным объектом исследования, поскольку в таком виде (монослой фермента на гидрофобном носителе) она устойчива к бактериальному заражению. Эксперименты можно проводить на одном и том же образце длительное время при 23°. Опыт длился 40 дней, однако в присутствии ионов магния фермент потерял чуть более 50% активности, тогда как в отсутствие ионов магния в контактном растворе активность упала более чем на 80%.

На кинетических кривых рис.1, полученных в присутствии 0.03M $MgCl_2$, имеет место индукционный период, как следствие неизменности активности фермента в течение первых двух суток хранения. Индукционный период отвечает стадии скрытых изменений – плавлению конформационного замка. Использование соотношения (2)

$$n = (0.13 + \delta) / (0.13 - 0.05\delta) \quad (2)$$

позволяет определить число минимальных стадий в этом процессе. Определение безразмерной величины δ показано на рис. 1. Кинетические кривые, полученные в интервале pH 7.2 – 9.5, ложатся на одну кривую. Величина $\delta = 0.21$, что соответствует $n \approx 3$. Это согласуется со схемой (1), предполагающей три активных димерных интермедиата, отличающихся стабильностью и образованных с помощью одного, двух и трех межглобулярных контактов. Константа скорости локальной диссоциации иммобилизованного димера щелочной фосфатазы k_1 в изученном интервале концентраций не зависит от pH и равна $1.2 \cdot 10^{-6} \text{ с}^{-1}$.

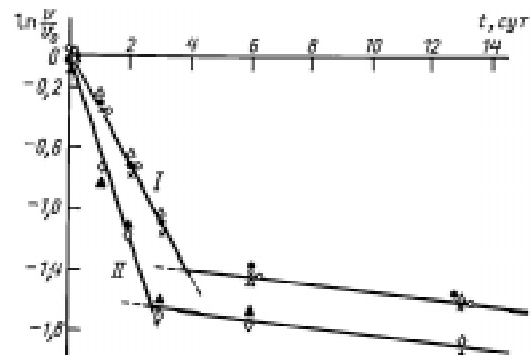
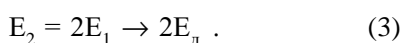


Рис. 3. Данные рис. 2, представленные в полулогарифмических координатах

На рис. 2 представлены две кинетические кривые термоинактивации щелочной фосфатазы в отсутствие ионов магния: I – в интервале pH 7.2 – 8.7 и II – при pH 9.2 и 9.5. На рис. 3 данные представлены в полулогарифмических координатах. На кинетических кривых отсутствует индукционный период. Процесс обнаруживает зависимость от pH, начиная с pK ≈ 9, что соответствует Gln (pK = 9.13). Эти данные согласуются с результатами структурного анализа [2], где выделено два узловых аминокислотных остатка Glu 410 и Gln 416, оказывающих наибольшее влияние на термостабильность. На рис. 3 показано, что кинетика термоинактивации двустадийна и соответствует кинетическому механизму двустадийной диссоциативной термоинактивации активного лабильного димера (3)



Отсутствие на кинетических кривых индукционного периода означает, что в системе нет стабильного димера, стабилизированного тремя межбелковыми контактами, а присутствует лишь лабильный димер с одним межбелковым контактом, который легко и обратимо диссоциирует на неактивные субъединицы.

Поскольку в эксперименте использована адсорбированная щелочная фосфатаза, то речь идет о локальной диссоциации. Соответствующие данные представлены в таблице. Значения кинетических констант скорости локальной диссоциации показывают, что последняя увеличивается более чем в 1.5 раза при pH > 9 и превышает соответствующую величину для фермента в присутствии ионов магния в 3.5 раза (для pH 7.2 – 8.7) и в 5.5 раз (для pH 9.2 – 9.5).

Таким образом, на основе кинетического анализа данных по термоинактивации иммобилизованной щелочной фосфатазы в присутствии и в отсутствие ионов магния в контактном растворе можно сделать вывод о стабилизирующей роли магния. Атом магния координирован тремя группами Asp 51, Glu 322 и Thr 155. Из них только Asp 51 находится вблизи межбелкового контакта (рис. 4), образуемого аминокислотами спирали 54-66, Asp 55, Thr 59, Arg 62 с Glu 416 соседней глобулы. Отрезок Asp 51–Asp 55,

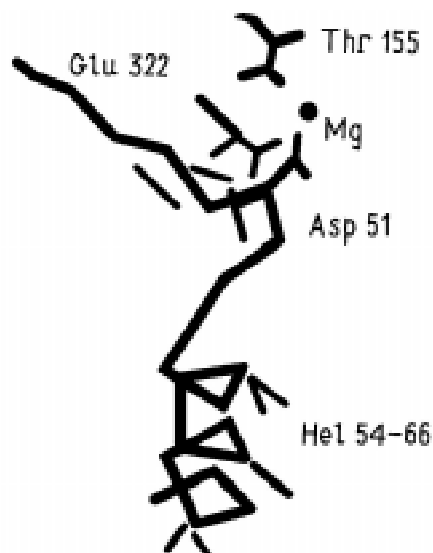


Рис. 4. Координация атома магния в молекуле щелочной фосфатазы. Черточками показаны водородные связи. Водородные связи Hel 54-66 относятся к межбелковому контакту

примерно перпендикулярный межбелковому контакту, имеет водородные связи с собственной глобулой только на концах (взаимодействие между атомами N и O главной цепи), и его положение относительно глобулы поддерживается, вероятно, атомом магния. По всей видимости, при отсутствии магния спираль 54-66, параллельная плоскости контакта, смещается относительно собственной глобулы под действием соседней, что и может приводить к медленному разрушению контакта глобул.

Настоящая работа поддержана грантом РФФИ 96-03-32713а и грантом ИНТАС 93-2577 (РС-5224), за что авторы выражают свою признательность РФФИ и ИНТАС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kim E.E., Wyckoff W.W. // J. Mol. Biol. 1991. **218**. P. 449.
2. Полторак О.М., Торшин И.Ю., Чухрай Е.С. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 1996. **37**. С. 431.
3. Торшин И.Ю., Полторак О.М., Чухрай Е.С. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 1996. **37**. С. 335.
4. Наккар С., Чухрай Е.С., Веселова М.Н., Полторак О.М. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 1989. **30**. С. 450.
5. Janaway C.M.L., Xu Xu, Merphy J.E., Caidaroglou A., Kantrowitz E.R. //Biochemistry. 1993. **32**. P. 1601.

Кинетические параметры локальной диссоциации димера щелочной фосфатазы на SiO₂ в отсутствие ионов магния

Константа	Интервалы pH	
	7.2–8.7 (I)	9.2–9.5 (II)
$K_1 \cdot 10^6, c^{-1}$	4.3	6.9
$K_d \cdot 10^7, c^{-1}$	2.9	3.1