**Разников, Андрей Валерьевич.**

## Функционально-важные остатки аминокислот неорганических пирофосфатаз S. Cereviciae и e. coli : диссертация ... кандидата химических наук : 02.00.10. - Москва, 1992. - 129 с. : ил.

## Оглавление диссертациикандидат химических наук Разников, Андрей Валерьевич

введение

ГЛАВА I. ФШЩЮКАЛЬНО-ВАЖНЫЕ АМИНОКИСЛОТНЫЕ ОСТАТКИ НЕОРГАНИЧЕСКИХ ПИРОФОСФАТАЗ (обзор литературы)

1 . РАСТВОРИМЫЕ ПИРОФОСФАТАЗЫ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ

A. Пирофосфатаза S.cerevisiae

1.А.1. Общие свойства фермента—

1 .А.2. Функционально-важные аминокислотные остатки

1.А.2.1. Химическая модификация

I.А. 2.2. Рентгено-структурный анализ

B. Пирофосфатаза е.coli

1.Б.1. Общие свойства фермента

1.Б.2. Функционально-важные, аминокислотные остатки

В. Пирофосфатаза термофильной бактерии PS-3

Г. Пирофосфатаза о?.thermophilic------------:

Д. Пирофосфатаза S. faecal is

Е. Пирофосфатаза Т. thiooxidans------■----------—■

Ж. Пирофосфатаза В.stearothermophilus

3. Пирофосфатаза s. commune

И. Пирофосфатаза U.urealiticum

2. ПРЕДПОЛАГАЕМЫМ ОБЩИМ МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ НЕОРГАНИЧЕСКИХ ПИРОФОСФАТАЗ. ОТЛИЧИЯ ФЕРМЕНТОВ ИЗ РАЗНЫХ ИСТОЧНИКОВ-------- '

ГЛАВА II. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Функционально-важный остаток тирозина в пирофосфатазе

S. cere vis iae

1.1. Химическая модификация и локализация в первичной структуре

1.1.1. Инактивация и модификация пирофосфатазы

1.1.2. Определение природы остатка, модификация которого приводит к инактивации фермента----------:

1.1.3. Локализация в первичной структуре функционально-важного остатка тирозина

1.2. Возможная роль Т;ут89 в механизме действия фермента—

1.2.1. Влияние лигандов активного центра на реакционное состояние Tyr89

1.2.2. Гшсохромный эффект в спектре поглощения пирофосфатазы, модифицированной NBD

1.2.3. Аномальная реакционная способность остатка Тугвэ—

1.2.4. Функциональная роль остатка Туг89

2. Функционально-важный остаток глутаминовой кислоты в пиро-фосфатазе Е.coli

2.1. Химическая модификация и локализация в первичной структуре

2.1.1. Инактивация и модификация фермента

2.1.2. Локализация функционально-важного остатка дикарбоновой аминокислоты в первичной структуре пирофосфатазы

2.2. Возможная роль остатка глутаминовой аминокислоты в механизме действия фермента

2.2.1. Аффинная элюция

2.2.2. Активность модифицированного фермента

2.2.3. Возможная функциональная роль остатка Е98

3. Селективная модификация пирофосфатазы E.coli реагентом Вудворда К вне активного центра

ГЛАВА III. ЭКСПЕРЗШЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

1. Метода исследования

1.1. Определение концентрации бежа

1.2. Определение активности ферментов

1.3.Определение количества радиоактивных веществ

1.4. Протеолиз

1.4.1. Алкилирование SH-групп

1.4.2. Гидролиз трипсином

1.4.3. Гидролиз протеазой Staphilocooous aureus Y8

1.4.4. Гидролиз химотрипсином

1.5. Ступенчатая деградация по методу Эдмана

1.6. Масс-спектрометрический анализ пептидов

2. Исследование реакции РРазы S.oerevisiae с 4-хлор-7-нитробензо-2-окса-1,3-диазолом

2.1. Инактивация фермента

2.2. Получение модифицированного фермента

2.3. Спектры поглощения модифицированного фермента

2.4. Определение природы модифицированной аминокислоты

2.4.1. Реактивация модифицированной РРазы-------:——

2.4.2. Инактивация РРазы с модифицированными SH-группами

2.4.3. Модификация SH-rpyim РРазы, модифицированной ЖВБ—

2.5. Локализация в первичной структуре функционально-важного остатка тирозина

2.5.1. Разделение пептидов

2.5.2. Установление структуры пептидов

2.6. Выяснение возможной функциональной роли остатка тирозина

2.6.1. Влияние ионов металлов

2.6.2. Влияние фосфата

2.6.3. pH-зависимость скорости инактивации

3. Исследование реакции РРазы е.coli с реагентом Вудворда К. 83 3.1. Изучение устойчивости реагента Вудворда К при различных

3.2. Инактивация фермента

3.3. Получение модифицированного фермента—

3.4. Исследование устойчивости винилового эфира, образующегося при модификации РРазы реагентом Вудворда К

3.5. Локализация в первичной структуре функционально-важного остатка дикарбоновой аминокислоты

3.5.1. Разделение пептидов

3.5.2. Установление структуры пептидов--------:---------—

3.6. Выяснение возможной функциональной роли остатка дикарбоновой аминокислоты

3.6.1. Аффинная элюция

3.6.3. pH-зависимость остаточной активности модифицированного фермента

4. Селективная модификация пирофосфатазы Е-coli реагентом Вудворда К вне активного центра

4.1. Модификация РРазы

4.2. Выделение модифицированного пептида

4.3. Установление структуры пептида

ВЫВОДЫ