

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. Ломоносова

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

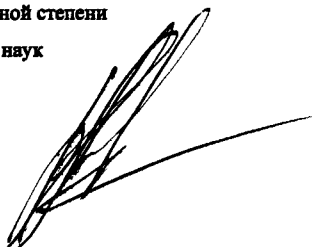
На правах рукописи

МОИСЕЕВ Виктор Михайлович

РОЛЬ КОНФОРМАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ
В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ПИРОФОСФАТАЗЫ
ESCHERICHIA COLI

02.00.10 – биоорганическая химия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

A large, stylized handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and a long horizontal stroke extending to the right.

МОСКВА – 2005

Работа выполнена в лаборатории химии белка кафедры химии природных соединений Химического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова и в отделе химии белка НИИ Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

Научные руководители:

доктор химических наук,
профессор Аваева Светлана Михайловна
кандидат химических наук,
доцент Родина Елена Валерьевна

Официальные оппоненты:

член-корреспондент РАН,
доктор химических наук,
профессор Кочетков Сергей Николаевич

доктор химических наук,
Судьина Галина Федоровна

Ведущая организация:

Институт биоорганической химии
им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Защита состоится 29 ноября 2005 года в 16.00 часов на заседании Диссертационного совета Д 501.001.41 по химическим наукам при Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова по адресу: 119992, Москва, Ленинские Горы, д.1, строение 40, Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, аудитория 501.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Химического факультета МГУ.

Автореферат разослан 28 октября 2005 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук



Смирнова И.Г.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

В настоящее время существование глобулярного белка в растворе принято рассматривать как набор конформационных состояний, между которыми существует равновесие. Из многочисленных переходов между конформациями лишь малая часть необходима для проявления биологической активности белков, в том числе ферментов. Выявление структурных перестроек, участвующих в ферментативном катализе, и выяснение их роли в функционировании ферментов является одной из проблем современной биохимии.

Объектом исследования в настоящей работе является неорганическая пирофосфатаза из *Escherichia coli*. Растворимые неорганические пирофосфатазы (КФ 3.6.1.1.; РРазы) катализируют гидролиз неорганического пирофосфата до двух молекул ортофосфата. Структура РРаз семейства I, к которым относится изучаемый фермент, очень лабильна и в ходе функционирования, несомненно, проходит через большое количество конформационных состояний. Анализ пространственных структур РРаз позволяет выявить некоторые из специфических перестроек, которые, в частности, включают подвижные участки 97-101 и 141-149, обрамляющие вход в активный центр. Консервативность данных неупорядоченных участков в структурах РРаз из разных источников, а также схожесть наблюдаемых перестроек для РРаз *E. coli* и *S.cerevisiae* позволяют предположить, что подвижность данных структурных элементов, а также лабильность структуры в целом могут играть важную роль в катализе. Поскольку РРазы являются одними из наиболее эффективных катализаторов, то исследование вклада конформационной подвижности их структуры в ферментативную активность представляется актуальной задачей.

Цель и задачи исследования. Настоящая работа посвящена выяснению роли структурной лабильности в функционировании РРазы *E. coli*. Для выполнения работы были сформулированы следующие задачи:

1. изучение свойств мутантных РРаз *E. coli* с заменами остатков глицина в неупорядоченных участках 97-101 (далее петля II) и 141-149 (далее петля III);
2. определение параметров термической и химической денатурации нативной РРазы *E. coli* и ряда мутантных вариантов. Оценка вклада введенных мутаций и связывания лигандов в стабильность глобулярной структуры РРазы;
3. выяснение возможной роли остатка Asp67 в катализе РРазы *E. coli*.



Научная новизна и практическая значимость работы. В диссертационной работе охарактеризованы две не описанные ранее мутантные формы пирофосфатазы *E.coli* с заменами Gly100Ala и Gly147Val, в которых конформационная гибкость участков 97-101 и 141-149 искусственно снижена. Установлено, что замены остатков глицина в подвижных петлях снижают скорости конформационных перестроек, необходимых для принятия активной конформации фермента при связывании субстрата. Введение замен привело к значительному снижению каталитической константы гидролиза субстрата. Причиной снижения k_{cat} является замедленный уход продуктов реакции. Установлено, что максимальное равновесное количество связанного с ферментом пирофосфата при его синтезе из фосфата магния для варианта Gly100Ala в 2 раза и для варианта Gly147Val в 5 раз превышает уровень, характерный для нативной РРазы.

Определена энтальпия термической денатурации нативной РРазы *E. coli* и мутантных вариантов Gly100Ala и Gly147Val, а также ряда вариантов с единичными заменами в различных областях молекулы. Количественно охарактеризовано стабилизирующее влияние Mg^{2+} на РРазу *E. coli*.

Изучена денатурация WT и ряда мутантных РРаз под действием гуанидингидрохлорида. Рассмотрены две модели денатурации РРазы, рассчитаны соответствующие изменения свободной энергии. Установлено, что введение мутаций снижает стабильность глобулярной структуры РРазы. Показано, что добавление свободного пирофосфата увеличивает энергию денатурации нативного фермента.

Анализ рентгеноструктурных данных и изучение pH-зависимости ингибирования РРазы фторид-ионом позволил высказать новое предположение о роли остатка Asp67 в катализе неорганической пирофосфатазы *E. coli*.

Публикация и апробация работы. По теме диссертации опубликованы 2 статьи. Результаты диссертации были представлены на III Съезде Биохимического общества (Санкт-Петербург, 2002 г.), Пушкинской школе-конференции молодых ученых "Биология – наука XXI века" (Пушино, 2004), 29 Конгрессе Европейского Биохимического сообщества FEBS-2004 (Варшава, 2004), 3 международном конгрессе по пирофосфатазам (Бирмингем, 2004).

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, приложения и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 117 страницах и содержит 50 рисунков и 11 таблиц.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

Актуальной задачей современной биохимии является выяснение роли конформационных перестроек в функционировании белков. Практически единственным методом выявления конформационных изменений является наложение структур, полученных рентгеноструктурным анализом. Неорганическая пирофосфатаза (PPаза) в этом отношении относится к хорошо изученным объектам, к настоящему времени решено большое количество структур фермента в комплексе с различными лигандами. Сравнительный анализ различных комплексов, имитирующих различные состояния фермента, выявляет конформационные изменения по ходу катализа для неорганической пирофосфатазы *E. coli*. Настоящая работа посвящена выяснению возможной роли наблюдаемых перестроек для функционирования фермента.

Растворимые неорганические пирофосфатазы (PPазы) катализируют гидролиз пирофосфата (PP) с образованием двух фосфатов (P). Бактериальные PPазы семейства I, к которым относится изучаемый объект, представляют собой гомотексамеры, построенные из



Рис. 1. Наложение структур PPазы *E.coli*. Полипептидная цепь окрашена по возрастанию В-фактора C_{α} -атомов (от синего цвета к красному). Полость активного центра заполнена ионами магния (выделены зеленым цветом) и пирофосфатом (красно-желтым цветом).

одинаковых мономеров. Субъединица (мономер) пирофосфатазы является однодоменным белком. Основу глобулы составляет стабильный гидрофобный кор. Активный центр фермента представляет собой полость диаметром около 20 Å, основание которой опирается на гидрофобный кор.

Основными структурными элементами, перестройки которых обнаруживаются при наложении структур E-PPазы, являются многие боковые группы (в том числе остатки, не относящиеся к активному центру), а также некоторые участки полипептидной цепи. К ним относятся три неупорядоченные области,

обрамляющие вход в полость активного центра и обозначаемые здесь и далее как петли I, II и III (рис. 1). Петли II и III имеют высокий В-фактор, что означает их высокую конформационную подвижность. Несмотря на это, в отличие от других подвижных элементов основной цепи, эти петли сохраняют консервативное строение в

прокариотических и эукариотических РРаз. Поэтому было высказано предположение, что их лабильность может играть определенную роль в функционировании фермента.

Для выявления возможной роли подвижности петель II и III были получены мутантные ферменты, в которых гибкость данных участков искусственно снижена. Легкость конформационных переходов во многом определяется наличием остатков глицина. Для решения поставленной задачи в данной работе были охарактеризованы мутантные варианты пирофосфатазы *E. coli* с заменами консервативных остатков глицина, Gly100Ala и Gly147Val, в петлях II и III, соответственно.

Следующая часть работы посвящена количественной характеристике стабильности/подвижности глобулярной структуры РРазы и оценке вклада в нее некоторых факторов, таких как введение мутаций и связывание лигандов. Для этого была изучена термическая и химическая денатурация нативного фермента и некоторых мутантных вариантов и рассчитаны термодинамические параметры денатурации. В последней части работы проанализирована возможная роль остатка Asp67 в катализе РРазой *E.coli*. Для этого исследована pH-зависимость ингибирования Е-РРазы фторид-ионом, а также использованы последние данные «рентгеноструктурной кинетики» фермента.

Характеристика мутантных вариантов с искусственно сниженной подвижностью петель.

Связывание ионов магния. Для того, чтобы неорганическая пирофосфатаза смогла проявлять каталитическую активность, необходимо предварительно насытить ее активный центр ионами магния. Mg^{2+} при этом занимает активаторные центры связывания M1 и M2. Равновесие в случае нативного фермента устанавливается быстро, т.е. достаточно добавить Mg^{2+} в реакционную смесь вместе с субстратом и ферментом. Дальнейшее связывание субстрата (пирофосфата магния, $MgPP_i$) тоже является быстрым процессом. Максимальная активность для нативного фермента составляет ~ 600 МЕ (pH 9,0, 1 mM Mg^{2+} , 40 мкМ $MgPP_i$). Таким образом, измерение ферментативной активности нативной РРазы не требует предварительной инкубации ее с ионами магния.

Измеренная в аналогичных условиях пирофосфатазная активность мутантных вариантов Gly100Ala и Gly147Val оказалась очень низкой (рис. 2) и составила около 10 и 20 МЕ, соответственно. Значения K_m для обоих вариантов были очень высоки (табл. 1). В то же время, предварительная инкубация Gly100Ala и Gly147Val пирофосфатаз с ионами магния значительно улучшает их каталитические свойства, причем степень их изменения зависит от времени прединкубации и от концентрации Mg^{2+} . Увеличение максимальной скорости гидролиза субстрата и снижение K_m происходит уже при выдерживании этих ферментов с 5

мМ Mg^{2+} в течение 2 часов, однако наилучшие результаты проявляются после инкубации с 10 мМ Mg^{2+} в течение 15-20 часов (рис. 2, табл. 1). Дальнейшее выдерживание Gly100Ala и Gly147Val РРаз с Mg^{2+} не приводит к заметным изменениям. Поэтому все дальнейшие кинетические измерения проводили после предварительной инкубации данных мутантных РРаз с 10 мМ Mg^{2+} в течение 15-20 часов при 4 °С. Прединкубированные ферменты сохраняли свою активность в течение двух недель. Однако даже после прединкубации максимальная скорость гидролиза и значения K_m мутантных вариантов все же не достигают значений нативной РРазы.

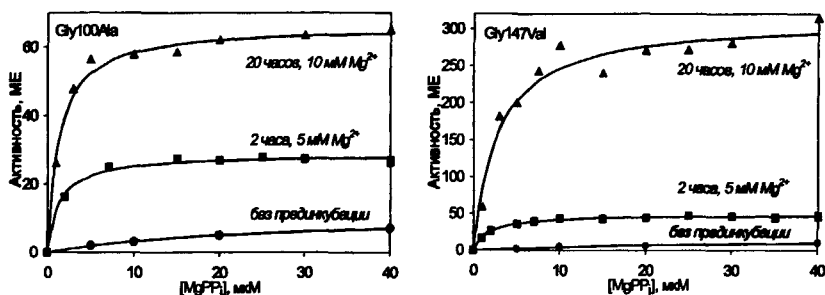


Рис. 2. Зависимость каталитической активности мутантных РРаз Gly100Ala и Gly147Val от предварительной инкубации с ионами Mg^{2+} .

Поскольку причиной такого аномального поведения мутантных ферментов могло быть снижение сродства активаторных центров связывания к Mg^{2+} , были определены константы диссоциации комплексов мутантных ферментов с Mg^{2+} .

Для апоферментов константы диссоциации комплексов с Mg^{2+} в центрах M1 и M2 (соответственно, K_{d1} и K_{d2}) определяли спектрофотометрическим титрованием (табл. 2).

Таблица 1. Влияние прединкубации с Mg^{2+} на кинетические параметры гидролиза $MgPP_1$.

РРаз	Условия прединкубации	V_m , МЕ/мг	K_m , мкМ
WT		600	0,9-1,1
Gly100Ala	без прединкубации	11,8±0,7	27±3
	2 часа с 5 мМ Mg^{2+}	28,8±0,5	1,4±0,2
	15-20 часов с 10 мМ Mg^{2+}	66±1	1,3±0,2
Gly147Val	без прединкубации	18±4	34±15
	2 часа с 5 мМ Mg^{2+}	49,1±0,6	1,8±0,1
	15-20 часов с 10 мМ Mg^{2+}	305±5	2,1±0,2

Связывание ионов металла приводит к появлению дифференциальных спектров, при этом за заполнением центра M1 можно следить по появлению минимума при длине волны 290 нм, а за заполнением центра M2 – по появлению максимума при длине волны 246 нм.

Константы диссоциации комплексов РРаз Gly100Ala и Gly147Val с Mg^{2+} в присутствии субстрата определяли из зависимости каталитической активности от концентрации свободного Mg^{2+} . Мутантные ферменты прединкубировали с 10 мМ Mg^{2+} и затем, добавляя аликвоту фермента в реакционную смесь значительно большего объема, измеряли активность в присутствии различных концентраций свободного Mg^{2+} . Полученные данные (табл. 3) обрабатывали с помощью уравнения:

$$A = \frac{A_0[Mg^{2+}]}{K_A + [Mg^{2+}] + \frac{[Mg^{2+}]^2}{K_I}},$$

где A_0 – максимальное потенциальное значение скорости гидролиза в отсутствие ингибирования;
 K_A – константа диссоциации Mg^{2+} в активаторном центре;
 K_I – константа диссоциации Mg^{2+} в ингибиторном центре.

Поскольку РРаз активна только после заполнения центра более низкого сродства, M2, то значение K_A , рассчитанное из полученного профиля, соответствует K_{d2} .

Полученные в обоих экспериментах результаты показывают, что константы диссоциации K_{d1} и K_{d2} для мутантных ферментов практически не отличаются от соответствующих величин для нативной РРазы. Следовательно, мутации Gly100Ala и Gly147Val не приводят к ухудшению сродства РРазы к активаторным центрам M1 и M2, но равновесие устанавливается гораздо медленнее.

Таблица 3. Константы диссоциации активаторного и ингибиторного центров связывания Mg^{2+} .

Фермент	V_0 , МЕ/мг	K_A , мМ	K_I , мМ
WT	594±15	200±40	16±2
Gly100Ala	57,7±2,6	23,2±5,4	43,5±1,3
Gly147Val	196,9±5,2	94±11	126±37

ингибируется. Ранее было показано, что причиной ингибирования является заполнение ионом магния центра связывания M4 (рис. 3). Для нативной РРазы ингибирование ярко выражено и константа ингибирования (K_I) составляет порядка 16 мМ (табл. 3). Изученные варианты Gly100Ala и Gly147Val также показывают ингибирование при концентрации свободного Mg^{2+} выше 1 мМ, однако снижение активности для обоих мутантных РРаз очень слабо выражено. Значение K_I для Gly100Ala возросло по сравнению с нативным ферментом в 3 раза, а для Gly147Val константу диссоциации можно лишь приблизительно оценить. Снижение сродства к ингибиторному центру нельзя строго расценивать как результат

Таблица 2. Константы диссоциации Mg^{2+} в центрах M1 и M2.

РРаз	K_{d1} , мМ	K_{d2} , мМ
WT	50±10	1,46±0,02
Gly100Ala	40±3	1,05±0,40
Gly147Val	74±8	1,12±0,13

Помимо констант диссоциации активаторных центров, полученный профиль дает возможность оценить сродство РРазы к ингибиторному центру. Нативная пиррофосфатаза *E. coli* в присутствии повышенных концентраций свободного Mg^{2+}

замены данных конкретных остатков глицина, т.к. многие другие единичные мутации Е-РРазы приводят к аналогичному результату. По-видимому, строение центра М4 нарушается в результате перестроек структуры РРазы при введении мутаций.

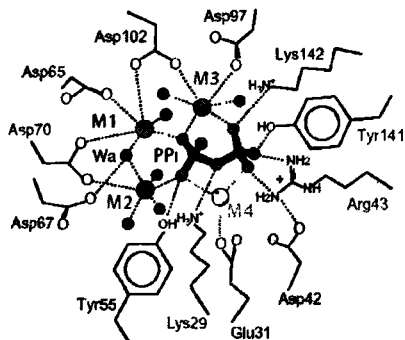


Рис. 3. Схема активного центра Е-РРазы в комплексе с ионами металла и субстратом. Центры связывания активаторных ионов металла М1-М3 показаны серым цветом, ингибиторного иона М4 – незакрашенным кружком.

скорости переходов между возможными конформациями этих петель. Иными словами, обнаруженные из анализа кристаллических структур перестройки петель II и III, которыми сопровождается связывание Mg^{2+} , происходят гораздо медленнее в случае Gly100Ala и Gly147Val вариантов. Резкое снижение активности и ухудшение сродства к субстрату для вариантов без прединкубации показывают, что обнаруженные перестройки необходимы, чтобы фермент принял компетентную конформацию для следующей стадии катализа – связывания субстрата.

Во всех дальнейших экспериментах мутантные варианты Gly100Ala и Gly147Val были предварительно прединкубированы с 10 мМ Mg^{2+} в течение суток.

рН-независимые кинетические параметры. Для определения рН-независимых значений кинетических параметров была снята рН-зависимость скорости гидролиза $MgPP_i$ мутантными РРазой Gly100Ala и Gly147Val при различных концентрациях субстрата. Для обоих мутантных вариантов сохраняется колоколообразный профиль рН-зависимости как k_{cat} , так и k_{cat}/K_m , что дает возможность рассчитать pK_a титруемых каталитически важных групп белка (табл. 4). Основным итогом мутации остатков глицина является снижение кинетических констант гидролиза по сравнению с нативной РРазой. Величина k_{cat} для варианта Gly100Ala составляет порядка 4%, а для варианта Gly147Val – 25% от нативного фермента. Эффективность катализа k_{cat}/K_m для обоих мутантных вариантов снижается на два

Напротив, необходимость прединкубации с Mg^{2+} для проявления каталитической активности является уникальным свойством мутантных РРаз Gly100Ala и Gly147Val с заменами остатков глицина. Ни один из трех десятков изученных мутантных вариантов Е-РРазы не обладал подобной характеристикой. Следовательно, можно сделать вывод, что обнаруженное свойство является следствием увеличения конформационной жесткости петель II (в случае Gly100Ala) или III (в случае Gly147Val варианта). Под увеличением жесткости в данном случае подразумевается замедление

Таблица 4. pH-независимые параметры гидролиза MgPP_i , 5 mM Mg^{2+} .

	WT	Gly100Ala	Gly147Val
k_{cat} (с^{-1})	389 $\pm$ 80	14,3 $\pm$ 0,6	101 $\pm$ 5
K_m (мкМ)	0,13 $\pm$ 0,06	0,27 $\pm$ 0,07	1,4 $\pm$ 0,2
k_{cat}/K_m ($\text{мкМ}^{-1} \text{с}^{-1}$)	3038 $\pm$ 800	54 $\pm$ 10	75 $\pm$ 6
pK_{EH_2}	7,75 $\pm$ 0,50	8,31 $\pm$ 0,20	7,59 $\pm$ 0,12
pK_{EH}	8,67 $\pm$ 0,50	9,13 $\pm$ 0,20	9,38 $\pm$ 0,13
pK_{ESH_2}	7,56 $\pm$ 0,25	6,78 $\pm$ 0,10	7,45 $\pm$ 0,08
pK_{ESH}	8,96 $\pm$ 0,20	9,38 $\pm$ 0,08	10,09 $\pm$ 0,09

условиях насыщения субстратом является уход обоих продуктов, поэтому снижение k_{cat} показывает, что конформационная гибкость обеих петель необходима не только для принятия компетентной конформации при связывании субстрата, но и для эффективного ухода продуктов.

Синтез пирофосфата в активном центре РРазы. Наряду с гидролизом пирофосфата, РРазы катализирует обратный процесс – синтез пирофосфата из двух фосфатов. По ходу катализа в каждый момент времени в активном центре конкурируют два процесса – уход

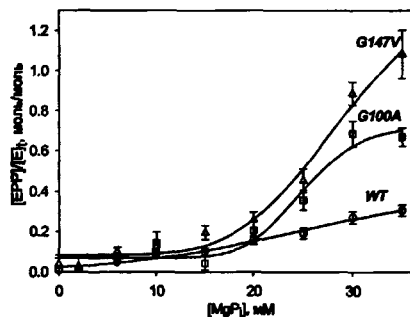


Рис. 4. Зависимость количества связанного в активном центре PP_i от концентрации MgP , для WT РРазы и мутантных вариантов Gly100Ala и Gly147Val.

кривой можно заключить, что в результате мутации остатков глицина критического ухудшения сродства к фосфатам не наблюдается. Полученные данные показывают, что при концентрациях MgP , вплоть до 20 mM количество синтезируемого пирофосфата в активном центре мутантных РРазы низко и сравнимо с аналогичным значением для нативной пирофосфатазы. При более высоких концентрациях фосфата наблюдается существенное отличие. Максимальный уровень равновесной концентрации синтезируемого пирофосфата,

порядка. Значение pH-независимой константы Михаэлиса возрастает на порядок для Gly147Val, но всего в два раза для Gly100Ala, поэтому потеря активности пирофосфатазы при введении мутаций только частично связана с ухудшением сродства к субстрату. Скорость-лимитирующей стадией катализа в

фосфатов и синтез из них PP_i . Равновесие P/PP_i в активном центре зависит от соотношения скоростей этих процессов. Если насытить активный центр фосфат-ионами, то образованный из них PP_i (который прочно связан с ферментом) можно определять количественно. На рисунке 4 показана зависимость количества связанного с ферментом PP_i от концентрации MgP , в растворе для нативной РРазы и двух мутантных РРаз Gly100Ala и Gly147Val, полученная после установления равновесия P/PP_i в активном центре ферментов. Из хода

$[EPP_i]/[E]$, для Gly100Ala в два раза, а для Gly147Val варианта в пять раз выше, чем для нативного фермента.

Наблюдаемое отличие показывает, что изучаемые мутантные РРазы характеризуются более высоким соотношением скоростей синтеза РР, и ухода Р, чем нативный фермент. Как показывает сравнение кристаллических структур, в результате собственно гидролиза или синтеза происходят минимальные конформационные изменения, а вот уход фосфатов (или их связывание в обратной реакции) сопровождается заметными перестройками, в том числе включающими петли II и III. По-видимому, замедление конформационных переходов при замене остатков глицина приводит к тому, что фосфаты после гидролиза не успевают выйти из активного центра, поэтому равновесие РР/Р, в них смещено в сторону РР, по сравнению с нативным ферментом, что и приводит к повышению наблюдаемого уровня $[EPP_i]/[E]$. Это подтверждает высказанное выше предположение о том, что конформационная гибкость мутированных петель играет важную роль в уходе продуктов.

Стабильность структуры РРазы.

Чтобы количественно оценить, насколько конформационная стабильность структуры РРазы изменяется в результате введенных мутаций, были определены термодинамические параметры денатурации нативной РРазы и ряда мутантных вариантов.

Термическая денатурация.

Эффективные параметры термоденатурации нативной РРазы были определены методом дифференциальной сканирующей калориметрии (рис. 5). При повторном прогреве образцов воспроизводилась базовая линия, что показывает, что процесс термической денатурации РРазы *E. coli* и ее мутантных вариантов необратим. Определенные значения T_m (температуры максимального теплопоглощения) и ΔH (калориметрической энтальпии) приведены в таблице 5.

Апоформа нативной РРазы характеризуется высокой температурой плавления ($T_m=73^\circ\text{C}$) и высокой кооперативностью денатурации (параметр k , определяемый как ширина пика плавления на половине высоты (рис. 5, таблица 5)). При плавлении нативной РРазы в присутствии 10 мМ Mg^{2+} значение T_m увеличивается более чем на 10°C , а энтальпия денатурации возрастает втрое. Увеличение T_m и ΔH для холоформы объясняется стабилизирующим действием Mg^{2+} на структуру РРазы. Действительно, в холоформе Mg^{2+} заполняет центры M1 и M2, и, кроме того, способен связываться в области контакта между тримерами.

Сложнее объяснить другое отличие кривых плавления апо- и холоформы нативной РРазы. Пик плавления апоформы симметричен, в то время как кривая для холоформы имеет

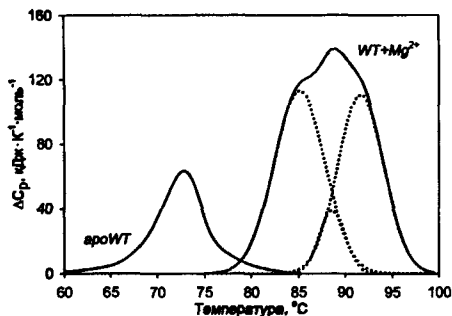


Рис. 5. Дифференциальная сканирующая калориметрия апо- и холоформы (10 мМ Mg^{2+}) нативной РРазы *E. coli*.

имеет сложную форму (рис. 5). Наиболее точно эта кривая может быть описана суммой трех гауссиан, из которых две соответствуют основным пикам с T_m 85,6°C и 91,7°C, а третья – минорному пику с T_m 88,1°C. Суммарная величина энтальпии денатурации составляет $\Delta H = 1580$ кДж/моль (табл. 5). Сложная форма кривой плавления означает, что на пути от полностью свернутого белка к полностью развернутому существуют термодинамически устойчивые промежуточные состояния. Как уже говорилось, молекула РРазы однодоменна, поэтому наличие нескольких пиков на кривой плавления трудно отнести к последовательной денатурации различных частей глобулы, как это принято в подобных случаях. Наличие пиков с разными T_m нельзя также объяснить денатурацией различных олигомерных форм РРазы, поскольку присутствие Mg^{2+} и высокая концентрация белка, используемая в эксперименте, делают маловероятной диссоциацию гексамера в процессе плавления. Возможно, в холоформе РРазы стабилизируются несколько конформационных состояний, переход между которыми затруднен по тем или иным причинам.

В работе определяли также термодинамические параметры денатурации ряда мутантных РРаз *E. coli* с единичными заменами в разных частях молекулы. РРазы с увеличенной жесткостью петель II и III, Gly100Ala и Gly147Val, характеризуются снижением как T_m , так и ΔH . Однако и для большинства остальных исследованных мутантных вариантов (E145Q, Y55F, D65N, D26A, а также РРазы, химически модифицированная по остатку Lys146 диальдегидным производным АТФ) наблюдается снижение T_m и/или ΔH . Таким образом, дестабилизация структуры не является уникальным свойством мутантных РРаз Gly100Ala и Gly147Val. Наблюдаемые отличия свидетельствуют скорее об общей дестабилизации пространственной структуры РРазы в результате нарушения нативной сети нековалентных взаимодействий.

Таблица 5. Параметры термической денатурации.

Е-РРазы	T_m , °C	ΔH , кДж/моль	$\Delta\Delta H$, кДж/моль	k , °C
апо-WT	72,8	440	-	4,7
WT,	85,6			5,4
10 мМ Mg^{2+}	88,1	1580	1140	2,7
	91,7			4,8

Химическая денатурация.

Определение параметра $[GuHCl]_{1/2}$. Под действием гуанидингидрохлорида ($GuHCl$) гидролитическая активность РРазы снижается и через несколько часов выходит на постоянное ненулевое значение, определяемое долей свернутых (активных) молекул в общем числе молекул фермента. В данной работе строили профиль равновесной денатурации, для чего измеряли остаточную каталитическую активность РРазы после инкубации с $GuHCl$ в течение 20-24 часов.

Графики зависимости остаточной активности от концентрации $GuHCl$ представлены на рис. 6. Обработка полученных зависимостей дала возможность рассчитать параметры $[GuHCl]_{1/2}$ – концентрацию денатуранта, при которой половина молекул фермента находится в активном состоянии.

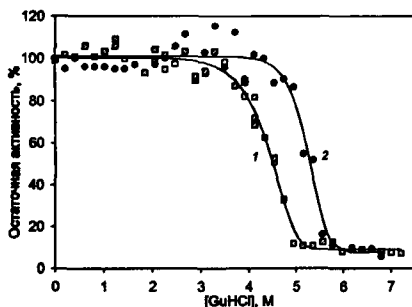


Рис. 6. Остаточная активность РРазы после инкубации с $GuHCl$: (1) – апоформа, (2) – холоформа (10 мМ Mg^{2+}).

Нативная РРаз имеет очень высокое значение $[GuHCl]_{1/2}$. Для апоформы РРазы значение этой величины составляет 4,5 М, а для холоформы (в присутствии 10 мМ Mg^{2+}) это значение возрастает до 5,3 М (табл. 6). Некоторая остаточная активность сохраняется даже при концентрации денатуранта 8 М.

Отсутствие дополнительных ступеней на графике зависимости активности от концентрации $GuHCl$ свидетельствует о том,

что денатурацию РРаз можно формально рассматривать как простую мономолекулярную реакцию, когда белок переходит из одного состояния в другое без промежуточных термодинамически устойчивых состояний. Только нативное (N) и денатурированное (U) состояния белковой молекулы наблюдаются в заметных количествах, что позволяет описать процесс денатурации с помощью модели двух состояний. Согласно этой модели, в системе нативная и денатурированная формы белка существуют в равновесии: $N \leftrightarrow U$. Полученные данные были использованы для расчета энергии денатурации, $\Delta G_{ден}(H_2O)$.

Природа денатурированного состояния. Величина $\Delta G_{ден}(H_2O)$ определяется константой равновесия между нативным и денатурированным состоянием белка, $N \leftrightarrow U$. Однако для расчета константы равновесия необходимо знать олигомерную природу денатурированной формы. В обычных условиях РРаз *E. coli* существует в виде гомогексамера. Присутствие химического денатуранта способствует разрушению контактов

между субъединицами, поэтому олигомерная природа денатурированного состояния может быть различной.

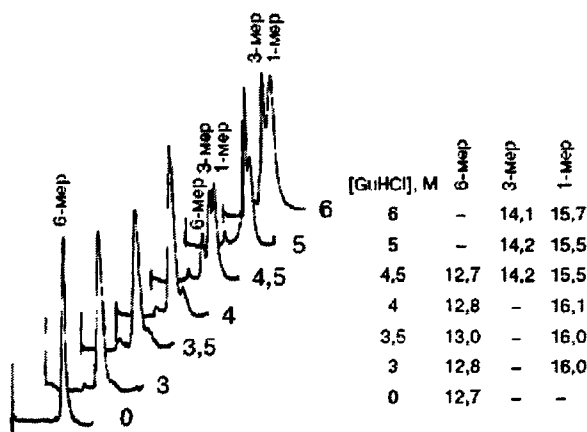


Рис. 7. Профили элюции ВЭЖХ растворов нативной РРазы после инкубации с GuHCl и отделения денатуранта. В таблице справа приведены времена удерживания основных пиков.

В данной работе исследовали изменение олигомерного состава РРазы *E. coli* при денатурации. Для этого после инкубации фермента с определенной концентрацией GuHCl денатурант быстро отделяли центрифугированием на спин-колонке, и полученный раствор разделяли с помощью ВЭЖХ. Результаты показывают (рис. 7), что

в ходе денатурации гексамерная Е-РРаз диссоциирует с параллельным образованием тримеров и мономеров. Последние обнаруживаются при концентрации GuHCl выше 4 М. Полученные данные не позволяют точно определить относительные количества олигомерных форм Е-РРазы, поскольку в процессе денатурации пики отдельных форм уширяются, что отражает изменение компактности белковой глобулы, и начинают перекрываться. Тем не менее, результаты подтверждают, что после инкубации в присутствии GuHCl гексамерная Е-РРаз частично диссоциирует.

Расчет энергии денатурации. Полученные данные показывают, что денатурация Е-РРазы протекает по сложному механизму, при каждой концентрации GuHCl в растворе сосуществуют молекулы различного олигомерного состава в различной степени денатурации. Поэтому в данной работе для расчета константы равновесия, а следовательно, и $\Delta G_{\text{ден}}(\text{H}_2\text{O})$ использованы две модели, соответствующие двум крайним случаям. Модель (I) соответствует равновесию гексамер $\leftrightarrow$ денатурированный гексамер ($\text{H} \leftrightarrow \text{U}_\text{H}$), рассчитанная по ней величина $\Delta G_{\text{ден}}(\text{H}_2\text{O})$ отражает энергетические затраты собственно на денатурацию. Модель (II) соответствует равновесию гексамер $\leftrightarrow$ 6 денатурированных мономеров ($\text{H} \leftrightarrow 6\text{U}_\text{M}$), и рассчитанная по этой модели величина $\Delta G_{\text{ден}}(\text{H}_2\text{O})$ включает дополнительно энергетические затраты на разрушение олигомерных контактов. Таким образом, в таблице 6

представлены значения энергии денатурации $\Delta G_{\text{ден}}(\text{H}_2\text{O})$, рассчитанные согласно двум моделям. Их можно рассматривать как нижнюю и верхнюю границы диапазона, в который попадает истинное значение $\Delta G_{\text{ден}}(\text{H}_2\text{O})$.

Таблица 6. Параметры химической денатурации нативной РРазы *E. coli*.

Лиганды	$[\text{GuHCl}]_{1/2}$, М	Параметры денатурации					
		$\text{H} \leftrightarrow \text{U}_\text{H}$			$\text{H} \leftrightarrow 6\text{U}_\text{M}$		
		$\Delta G_{\text{ден}}(\text{H}_2\text{O})$, $\frac{\kappa \Delta \text{Ж}}{\text{моль}}$	$\Delta \Delta G_{\text{ден}}(\text{H}_2\text{O})$, $\frac{\kappa \Delta \text{Ж}}{\text{моль}}$	m^* , $\frac{\kappa \Delta \text{Ж}}{\text{моль} \cdot \text{М}}$	$\Delta G_{\text{ден}}(\text{H}_2\text{O})$, $\frac{\kappa \Delta \text{Ж}}{\text{моль}}$	$\Delta \Delta G_{\text{ден}}(\text{H}_2\text{O})$, $\frac{\kappa \Delta \text{Ж}}{\text{моль}}$	m^* , $\frac{\kappa \Delta \text{Ж}}{\text{моль} \cdot \text{М}}$
нет	4,5	29±2	—	-7±1	257±3	—	-23±1
10 мМ Mg^{2+}	5,3	49±6	20	-9±1	259±13	2	-19±3
1 мМ PP_i	4,4	58±4	29	-13±1	369±12	112	-48±3

*Коэффициент пропорциональности m — это мера изменения площади гидрофобной поверхности, обращенной в растворитель, при денатурации.

Влияние лигандов на стабильность РРазы. Свободный пирофосфат, в отличие от пирофосфата магния, не является субстратом РРазы, однако согласно кинетическим данным

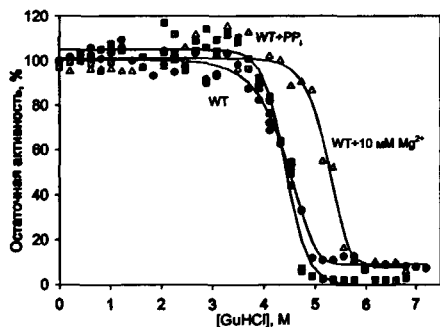


Рис. 8. Профиль денатурации WT РРазы и ее комплексов с Mg^{2+} или PP_i под действием GuHCl .

он может связываться в эффекторном центре РРазы и активировать фермент. Аллостерическая активация РРазы предполагает, что структура фермента изменяется при связывании свободного PP_i . Как видно на рис. 8, присутствие эффектора практически не меняет параметр $[\text{GuHCl}]_{1/2}$. Тем не менее, независимо от используемой для расчета модели, значение энергии денатурации резко возрастает по сравнению с апоформой фермента (табл. 6). Это происходит за счет значительного увеличения коэффициента пропорциональности при вычислении $\Delta G_{\text{ден}}(\text{H}_2\text{O})$, параметра m . Возможно, стабилизация структуры происходит за счет того, что связывание PP_i инициирует образование контактов между структурными элементами белка, которые в отсутствие эффектора не связаны. Не исключено также, что перестройка структуры при связывании PP_i приводит к изолированию гидрофобных участков молекулы, которые в апоформе РРазы экспонированы, поэтому изменение общей гидрофобной поверхности при денатурации выше

для комплекса фермента с PP_i. Так или иначе, связывание эффектора существенно стабилизирует глобулу.

В отличие от свободного пирофосфата, в случае стабилизации РРазы под действием ионов магния параметр $[GuHCl]_{1/2}$ значительно увеличивается. Вероятно, причина такой разницы – в определении доли денатурированных молекул по изменению каталитической активности. Ионы магния, связываясь в активном центре, стабилизируют в основном кор глобулы, поэтому каталитическая активность сохраняется до более высоких концентраций денатуранта, несмотря на то, что поверхностные структурные элементы уже частично денатурировали. Свободный пирофосфат, согласно этой логике, связывается таким образом, что поверхностные элементы структуры закрепляются более прочно. Это приводит к затрудненному началу денатурации, но как только поверхностные петли все-таки плаваются, оставшаяся структура денатурирует с высокой степенью кооперативности.

Влияние мутаций на энергию денатурации. В работе была определена энергия денатурации мутантных вариантов РРазы *E.coli* (Gly100Ala, Gly147Val, Glu31Ala, Asp26Ala). Денатурация мутантных ферментов следует тем же закономерностям, которые наблюдаются и для нативной Е-РРазы. Полученные значения $\Delta G_{ден}(H_2O)$ были использованы для количественной оценки вклада мутаций в стабильность РРазы. Результаты показывают, что из изученных вариантов РРазы *E. coli* наибольшее снижение стабильности белка наблюдается при замене остатка Gly100. Облегчение денатурации может быть связано с тем, что в результате мутации Gly100 конформация петли II искажается за счет неоптимальных торсионных углов, и петля может частично отодвигаться от поверхности глобулы, уменьшая количество контактов с поверхностью и облегчая доступ молекулам денатуранта. Для мутантного варианта Gly147Val значение $\Delta\Delta G$, рассчитанное по модели ($H \leftrightarrow U_H$), составляет почти -20 кДж/моль. Вместе с тем, если энергию денатурации определять по модели ($H \leftrightarrow 6U_M$), то для этого варианта наблюдается некоторая стабилизация ($\Delta\Delta G = 15$ кДж/моль). Такое различие может говорить о том, что мутация Gly147Val, облегчая собственно денатурацию, повышает энергетические затраты на диссоциацию гексамера. Значения $\Delta\Delta G$ для вариантов Glu31Ala и Asp26Ala низки, что говорит о незначительном вкладе этих остатков в стабильность глобулярной структуры.

Данная часть исследования продемонстрировала, как направленное введение мутаций помогает выявлять существенные для функционирования фермента перестройки, включающие полипептидную цепь. Не менее важным является понимание роли перестроек боковых групп, сопровождающих превращение субстрата. Ниже проанализирована возможная роль в катализе разворота боковой группы Asp67.

Роль остатка Asp67 в функционировании РРазы *E. coli*.

F является обратимым ингибитором гидролитической реакции. В присутствии РР, он связывается в активном центре РРазы, замещая нуклеофильную частицу W_a и делая гидролиз фосфоангидридной связи невозможным. Это свойство позволяет получить стабильный фермент-субстратный комплекс, в котором W_a замещена на F. Снижение концентрации ингибитора в смеси приводит к восстановлению гидролитической активности РРазы *E. coli*. Недавно на основании этих свойств были получены пространственные структуры Е-РРазы в двух последовательных каталитических состояниях: 1) фермент-субстратный комплекс, стабилизированный F, и 2) комплекс фермента с одним из фосфатов – продуктов реакции – после диссоциации другого фосфата. Обе структуры сняты с одного кристалла и уточнены с очень высоким разрешением, поэтому их сравнительный анализ позволил обнаружить новые детали динамической перестройки структуры РРазы по ходу катализа.

Одним из конформационных изменений, не обнаруженных ранее, является возможный разворот боковой группы остатка активного центра Asp67. Для этого остатка наблюдаются два альтернативных положения в зависимости от того, что связано в активном центре, - пирофосфат или фосфат (рис. 9). В первом случае карбоксильная группа Asp67 является прямым лигандом фторид-иона, который в кристалле занимает место атакующего нуклеофила W_a . Во втором случае Asp67 лигандирует соответствующий атом O_b только через молекулу воды, которая, в свою очередь, входит в координационную сферу иона металла M4.

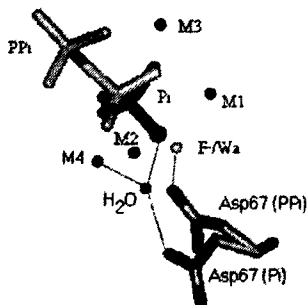


Рис. 9. Альтернативные положения боковой группы остатка Asp67 в структурах комплексов Е-РРазы с РР_i и Р_i. Показаны ионы марганца M1-M3 (имеют одинаковое положение в обеих структурах). Фторид-ион связан только в структуре комплекса с РР_i и занимает место атакующего нуклеофила W_a . Показаны также ион M4 и молекула воды (структура комплекса с Р_i).

В фермент-субстратном комплексе нуклеофильная молекула воды W_a связана одновременно с двумя ионами металла-активатора, M1 и M2, и поляризована за счет этого взаимодействия. В присутствии подходящего акцептора протона она может превратиться в более активный гидроксид-ион OH^- . Ранее в литературе было высказано предположение, что роль акцептора протона от W_a выполняет карбоксильная группа Asp67, поскольку она является единственным белковым лигандом F/ W_a во всех известных структурах РРаз *E. coli*

или *S. cerevisiae*. Однако структура, изображенная на рис. 9, снята при pH 5, в то время как pH-оптимум действия Е-РРазы лежит около 8,5. В этих условиях акцептирование H^+ карбоксильной группой предполагает повышенное значение ее pK_a . Известно, что из всех мутантных вариантов Е-РРазы Asp67Asn обладает уникальной особенностью – его сродство к F⁻ и стабильность полученного фермент-субстратного производного резко повышены. Причины этого до сих пор были непонятны. Чтобы прояснить этот вопрос, а также выяснить возможную роль наблюдаемого смещения боковой группы Asp67, в данной работе была изучена pH-зависимость сродства нативной Е-РРазы и Asp67Asn варианта к фторид-иону.

pH-зависимость ингибирования РРазы фторид-ионом.

Различия ингибирования фторид-ионом при Mg^{2+} - и Mn^{2+} -активируемом гидролизе. В работе определяли константу ингибирования фторидом-ионом (K_i) гидролиза РР, нативной Е-РРазой в присутствии Mg^{2+} либо Mn^{2+} . Для этого измеряли скорость гидролиза РРi в присутствии фиксированной концентрации субстрата и катиона-активатора (Mg^{2+} либо Mn^{2+}) при возрастающих концентрациях F⁻. В случае нативной Е-РРазы как для Mg^{2+} -, так и Mn^{2+} -активируемого гидролиза наблюдается увеличение K_i с ростом pH, т.е. происходит снижение сродства фермента к фторид-иону. Два катиона, однако, существенно различаются по двум параметрам: во-первых, собственно величиной K_i , а во-вторых, значением pH, при котором K_i изменяется наиболее сильно. В случае активации фермента Mg^{2+} значение K_i лежит в микромолярной шкале (при 5 мМ Mg^{2+} и pH 7,4 $K_i = 35,8$ мкМ), в то время как при активации РРазы Mn^{2+} значение K_i переходит в область миллимолярных концентраций (при 50 мкМ Mn^{2+} $K_i = 2,8$ мМ).

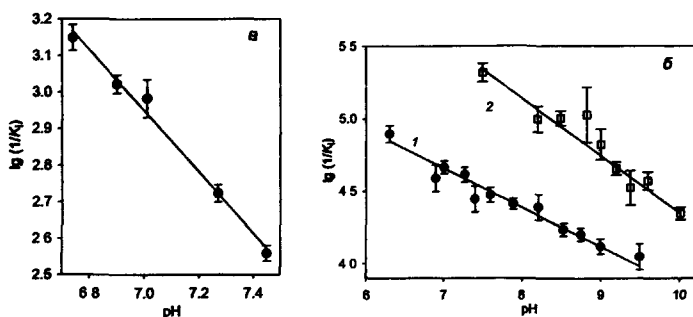


Рис. 10. pH-зависимость K_i в координатах Диксона-Уэбба для Mn^{2+} -активируемого гидролиза WT РРазы (а) и Mg^{2+} -активируемого гидролиза (б) для WT РРазы (1) и мутантного варианта Asp67Asn (2).

Линеаризация данных в координатах Диксона-Уэбба (рис. 10) показывает, что в случае активации Mn^{2+} тангенс угла наклона составляет 0,96, что соответствует ионизации единственной группы с pK_a 7,3. В случае Mg^{2+} -активируемого гидролиза наклон имеет очень низкое значение (около 0,2), поэтому pH-зависимость нельзя строго приписать ионизации единственной титруемой группы. Тем не менее, полученные данные однозначно показывают, что pH-переход, отвечающий за изменение сродства РРазы к F⁻, происходит в случае активации Mg^{2+} на две единицы pH выше, чем в случае активации Mn^{2+} .

Природа pH-зависимости сродства РРазы к F⁻. Возможной причиной ухудшения сродства к F⁻ с ростом pH может быть ионизация группы белка, с которой связывается фторид-ион. Для Е-РРазы единственной такой группой является карбоксильная группа Asp67. Логично предположить, что в протонированной форме Asp67 связывается с F⁻ прочнее, чем в форме отрицательно заряженного карбоксилата. В этом случае область pH, в которой наблюдается наиболее сильное изменение K_i , соответствует pK_a Asp67, и его карбоксилат действительно мог бы акцептировать протон от W_a в области pH-оптимума.

Чтобы проверить высказанное предположение, аналогичная pH-зависимость для Mg^{2+} -активируемого гидролиза РР, была снята для мутантной РРазы Asp67Asn. Однако для этого варианта сохраняется общий характер кривой и наклон в координатах Диксона-Уэбба, хотя значение pH-перехода слегка смещается (менее чем на 0,3 единицы pH) в более щелочную область. Сохранение pH-зависимости K_i для РРазы, в которой титруемая группа Asp67 элиминирована, свидетельствует о том, что изменение сродства к F⁻ вызвано какой-либо другой причиной. Таким образом, предположение о повышенном значении pK_a Asp67 не подтверждается полученными результатами. Поэтому вопрос о возможности акцептирования протона этой группой при оптимальном для катализа pH 8-8,5 остается открытым.

Другим возможным объяснением ухудшения сродства фермента к F⁻ с ростом pH является ионизация какой-либо другой группы активного центра. Карбоксильные группы – лиганды ионов металла – исключаются из рассмотрения, т.к. вероятность для них иметь столь высокие значения pK_a очень низка. В работе была исследована pH-зависимость ингибирования Mg^{2+} -зависимого гидролиза под действием мутантных Е-РРаз с заменами остатков – лигандов пирофосфата: Arg43Gln (с удалением основного белкового лиганда группы Р2) и Tyr55Phe (с удалением основного белкового лиганда группы Р1). Однако для них тоже сохраняется характерная для нативного фермента форма pH-профиля K_i , а также значение тангенса угла наклона в координатах Диксона-Уэбба и область pH-перехода. Следовательно, и эти остатки не определяют наблюдаемую зависимость.

Альтернативным объяснением pH-зависимости K_i может быть ионизация замещаемой молекулы воды (W_a). Если определяемое значение pH-перехода является не истинной константой ионизации определенной группы, а некоторой эффективной величиной (на что указывает низкий наклон прямой в координатах Диксона-Уэбба), то на него может влиять прочность связывания замещаемой частицы с ионами металла M1 и M2. В этом случае незаряженная молекула воды будет легче уходить от двух ионов металла, чем заряженный гидроксид-ион, и в этом случае равновесие ионизации W_a ($H_2O \leftrightarrow H^+ + OH^-$) действительно может чувствоваться при изучении ингибирования фторид-ионом. В этом случае значение pH-перехода отражает pK_a атакующей молекулы воды. Для Mn^{2+} -активируемого гидролиза эта величина составляет около 7,3, а для Mg^{2+} -активируемого гидролиза – около 9. Данное предположение могло бы объяснить наблюдаемую разницу в сродстве Mg^{2+} - или Mn^{2+} -активируемой РРазы к фторид-иону, поскольку, согласно полученным данным, при одном и том же значении pH в активном центре фермента может находиться либо (в случае Mg^{2+}) ионизованная молекула воды, либо (в случае Mn^{2+}) OH^- , и от этого зависит легкость обмена данной частицы на F⁻.

Участие Asp67 в акцептировании H^+ от W_a . Как указывалось выше, в литературе остатку Asp67 приписывается роль акцептора протона при генерировании OH^- из W_a . Однако полученные данные по pH-зависимости ингибирования Е-РРазы фторидом не подтверждают, что эта группа имеет повышенное значение pK_a . Кроме того, анализ распределения молекул воды в активном центре фермент-субстратного комплекса Е-РРазы показывает, что протон от W_a может быть акцептирован и транспортирован в окружающий раствор без участия карбоксильной группы Asp67. Существует непрерывная цепочка молекул воды, связанных короткими водородными связями (менее 2,8 Å), которая начинается от W_a и заканчивается на поверхности глобулы (рис. 11). Позиции всех молекул воды в данной цепочке строго упорядочены за счет контактов с консервативными белковыми остатками. По такой цепочке протон может легко передаваться с помощью эффекта туннелирования на поверхность глобулы, где он захватывается анионами буферного раствора. После гидролиза OH^- входит в состав электрофильного фосфата Р2 и вместе с ним покидает активный центр, а между ионами M1 и M2 связывается новая молекула воды W_a , и цикл повторяется, включая выброс протона на поверхность. Поскольку карбоксильная группа Asp67 не входит в цепочку туннелирования, то участие этого остатка в катализе как акцептора протона необязательно, ему достаточно лишь усилить поляризацию O-H связи в W_a . Это объясняет незначительную остаточную активность Asp67Asn варианта Е-РРазы (4 % от нативного фермента).

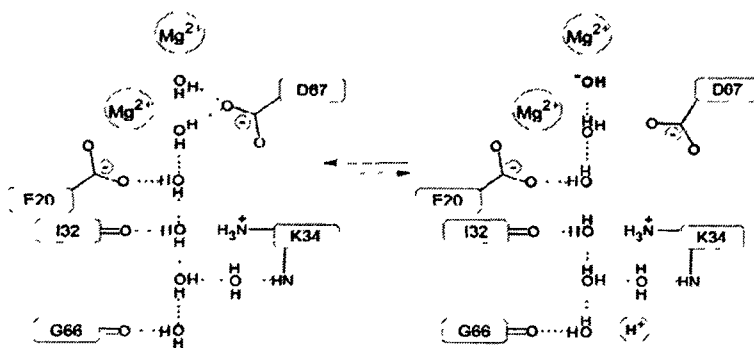


Рис. 11. Туннелирование H^+ от W_a на поверхность глобулы по цепочке структурированных молекул воды.

Альтернативное предположение о роли Asp67 в катализе вытекает из совместного анализа полученных данных по свойствам Asp67Asn PРазы, с одной стороны, и обнаруженного разворота боковой группы Asp67 после ухода одного из фосфатов, с другой стороны. Уход фосфата из электрофильного центра P2 подразумевает разрыв связей, образованных атомом O_{Nu} (бывший кислородный атом W_a) и ионами металла M1 и M2. Моделью этого процесса является восстановление активности Е-РРазы, ингибированной фторид-ионом, в результате снижения концентрации F^- . В этом случае ион F^- замещается на молекулу воды, для этого должен произойти разрыв связей между F^- и теми же ионами металла M1 и M2. Свойства Asp67Asn Е-РРазы показывают, что удаление отрицательного заряда на этом остатке приводит к резкому увеличению сродства фермента к F^- , и ингибирование становится практически необратимым. Отсюда можно сделать вывод, что депротонированная карбоксильная группа остатка Asp67 облегчает освобождение F^- из сферы действия M1 и M2. С точки зрения катализа, это означает, (1) что именно Asp67 контролирует высвобождение O_{Nu} в процессе ухода P2; и (2) что карбоксильная группа Asp67 должна быть ионизована для оптимального катализа.

Таким образом, в работе высказано предположение, что роль Asp67 в катализе Е-РРазой заключается, во-первых, в дополнительной поляризации связи $O-H$ в нуклеофильной молекуле воды W_a при генерировании OH^- ; и, во-вторых, в освобождении кислородного атома O_{Nu} в процессе ухода электрофильного фосфата P2.

ВЫВОДЫ

1. Замены остатков глицина Gly100Ala и Gly147Val РРазы *E. coli* приводят к следующим изменениям свойств фермента:
 - резкое уменьшение скоростей конформационных перестроек после заполнения активаторных центров связывания Mg^{2+} , необходимых для последующего связывания субстрата;
 - существенное уменьшение каталитической константы гидролиза субстрата за счет более медленного ухода продуктов реакции;
 - снижение стабильности РРазы в условиях термической и химической денатурации;
 - увеличение равновесного количества связанного с РРазой пирофосфата при насыщении активного центра фосфатом магния.
2. Определены значения энтальпии денатурации нативной РРазы *E.coli*, мутантных вариантов Gly100Ala, Gly147Val и ряда вариантов с единичными заменами в различных областях молекулы РРазы. Показано, что в присутствии 10 mM Mg^{2+} энтальпия денатурации нативной РРазы возрастает на 1140 кДж/моль.
3. Рассмотрены две модели протекания химической денатурации нативной РРазы *E.coli* и мутантных РРаз Gly100Ala и Gly147Val. Рассчитаны соответствующие изменения свободной энергии денатурации, количественно охарактеризовано влияние лигандов на стабильность структуры нативной РРазы.
4. Предложена модель, согласно которой роль Asp67 в катализе Е-РРазой, наряду с поляризацией связи О-Н в нуклеофильной молекуле воды W_a , заключается в освобождении кислородного атома O_{Nu} в процессе ухода электрофильного фосфата P2.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Моисеев В.М., Родина Е.В., Аваева С.М. (2005) Влияние замен консервативных остатков глицина Gly100 и Gly147 на стабильность неорганической пирофосфатазы *Escherichia coli*. *Биохимия*, **70**, 1030-1040.
2. Моисеев В.М., Родина Е.В., Курилова С.А., Воробьева Н.Н., Назарова Т.И., Аваева С.М. (2005) Замены остатков глицина Gly100 и Gly147 в консервативных петлях снижают скорости конформационных перестроек неорганической пирофосфатазы *Escherichia coli*. *Биохимия*, **70**, 1041-1050.
3. Моисеев В.М., Родина Е.В. (2002) Роль подвижных петель в функционировании неорганической пирофосфатазы *Escherichia coli*. Тезисы научных докладов III Съезда Биохимического общества, с. 595.
4. Моисеев В.М., Суханова И.Ф., Родина Е.В. (2004) Природа атакующего нуклеофила в реакции гидролиза пирофосфата неорганической пирофосфатазой *E. coli*. Тезисы 8 Пущинской школы-конференции молодых ученых "Биология – наука XXI века", с. 62.
5. Moiseev V., Rodina E.V., Kurilova S.A. (2004) Homologous glycine residues in inorganic pyrophosphatase. 29th Meeting of the Federation of the European Biochemical Societies, *EJB*, **271** (Supplement 1), p. 80.
6. Rodina, E., Vorobyeva, N., Kurilova, S., Nazarova, T., Vainonen, Ju., Sitnik, T., Suhanova, I., Moiseev, V., Pavlova, O., Awaeva, S. (2004) Conformational flexibility of *E. coli* soluble inorganic pyrophosphatase: a new role for the enzyme regulation *in vivo*. Proceedings of the 3rd International Meeting on Inorganic Pyrophosphatases "Recent Advances in Inorganic Pyrophosphatase Research", p. 51.

№ 20233

РНБ Русский фонд

2006-4

17746

Подписано в печать 26 октября 2005 г.

Заказ 509. Формат 60 x 90/16.

Тираж 190 экз.

Отпечатано в салоне оперативной печати ПКФ.

Москва, Садовая-Черногрозская, 3Б.