

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М. В. Ломоносова

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи



Анашкин Виктор Андреевич

**БАКТЕРИАЛЬНАЯ ПИРОФОСФАТАЗА, СОДЕРЖАЩАЯ НУКЛЕОТИД-
СВЯЗЫВАЮЩИЕ CBS-ДОМЕНЫ: КИНЕТИКА И ТЕРМОДИНАМИКА КАТАЛИЗА И
РЕГУЛЯЦИИ**

Специальность: 02.00.10 – биоорганическая химия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
д. х. н., профессор Байков А. А.

Москва – 2016

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
1. ВВЕДЕНИЕ	7
2. Белки, содержащие CBS-домены (обзор литературы).....	9
2.1. Цистатионин-β-синтаза (CBS)	11
2.2. АМР-активируемая протеинкиназа (АМРК).....	15
2.3. Инозин-5'-монофосфатдегидрогеназа (IMPDH).....	18
2.4. Магний-селективный канал MgtE	22
2.5. Семейство хлорид-транспортирующих белков CIC	24
2.6. Растительные белки семейства CBSX.....	27
2.7. CBS-PPаза	28
2.7.1. Канонические РРаза семейства II	28
2.7.2. CBS-PPаза.....	31
2.8. CBS-белки: Заключение	33
3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	41
3.1. Материалы	41
3.2. Методы.....	42
3.2.1. Биоинформатический анализ	42
3.2.2. Сайт-направленный мутагенез.....	42
3.2.2.1. Полимеразная цепная реакция (ПЦР).....	42
3.2.2.2. Электрофорез ДНК в агарозном геле.....	42
3.2.2.3. Ферментативная обработка ДНК	43
3.2.2.4. Подготовка компетентных клеток и трансформация	43
3.2.2.5. Выделение плазмидной ДНК.....	44
3.2.3. Работа с клетками E. coli	44
3.2.4. Определение концентрации белков.....	46
3.2.5. ПААГ-электрофорез в денатурирующих условиях	46

3.2.6. Измерение скорости гидролиза PP_i	46
3.2.7. Изотермическое калориметрическое титрование	47
3.2.8. Аналитическое ультрацентрифугирование	47
3.2.9. Химическое сшивание белков.....	48
3.2.10. Расчёт концентраций ионов металлов.....	48
3.2.11. Математическая обработка данных.....	48
3.2.12. Молекулярная динамика.....	48
4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	50
4.1. Четвертичная структура CBS-PPазы и её значение для активности.....	50
4.1.1. CBS-PPазы имеют димерную структуру.....	50
4.1.2. Обратимая диссоциация Dh-PPазы.....	53
4.2. Кооперативность в катализе и регуляции CBS-PPазы	59
4.2.1. Кооперативность гидролиза субстрата CBS-PPазами	59
4.2.2. Отсутствие кинетической кооперативности в Δ CDC-Dh-PPазе.....	64
4.2.3. Кооперативность связывания аденозинолигофосфатов CBS-PPазами	65
4.2.4. Влияние аденозинолигофосфатов на кинетическую кооперативность	72
4.2.5. Активность CBS-PPаз как функция отношения ADP:ATP	73
4.3. Диаденозинполифосфаты как регуляторы CBS-PPазы	75
4.3.1. Влияние Ar_nA на активность CBS-PPаз при постоянной концентрации свободных ионов магния	75
4.3.2. Зависимость уровня активации CBS-PPаз от концентрации свободных ионов магния	78
4.3.3. Анализ активации CBS-PPаз по уравнению Михаэлиса-Ментен.....	79
4.3.4. Термодинамика и стехиометрия связывания фосфатных производных аденозина с CBS-PPазами.....	83
4.4. Роль остатка аспарагина в передаче информации между каталитическими и регуляторными центрами.....	87
4.4.1. Eh-PPаза содержит мутацию в консервативном мотиве	88

4.4.2. Eh-PPаза не проявляет кинетическую кооперативность и не регулируется адениновыми производными.....	88
4.4.3. Замена N312S в Dh-PPазе устраняет кинетическую кооперативность и обращает эффект Ar ₄ A на последнюю.....	91
4.4.4. N312S-Dh-PPаза сохраняет кооперативность связывания производных аденозина.....	94
4.4.5. Мутация не влияет на термодинамику связывания производных аденозина ...	97
4.4.6. Молекулярно-динамическое моделирование подтвердило важность остатка аспарагина для взаимодействия активных центров CBS-PPазы.....	98
5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	102
ПРИЛОЖЕНИЕ	107
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	112

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В работе были использованы стандартные трехбуквенные и однобуквенные сокращения аминокислот по номенклатуре IUPAC (Международный союз чистой и прикладной химии) и IUB (Международный союз биохимиков), а также следующие сокращения:

ДТТ	трео-2,3-дигидрокси-1,4-димеркаптобутан (дитиотреитол)
кДа	килодальтон
МД	молекулярная динамика
ПААГ	полиакриламидный гель
Трис	трис(гидроксиметил)аминометан
ЭГТА	этиленгликоль-О,О'-бис(2-аминоэтил)-N,N,N',N'-ацетат
ЭДТА	этилендиаминтетраацетат
ADP	аденозин-5'-дифосфат
AMP	аденозин-5'-монофосфат
Ap ₃ A	5,5'-диаденозинтрифосфат
Ap ₄ A	5,5'-диаденозинтетрафосфат
Ap ₅ A	5,5'-диаденозинпентафосфат
Ap ₆ A	5,5'-диаденозингексафосфат
Ap _n A	5,5'-диаденозинполифосфат
АТР	аденозин-5'-трифосфат
CBS	цистатионин-β-синтаза
CBS-PPаза	пирофосфатаза, содержащая CBS домены
DEAE	диэтиламиноэтил
HEPES	N-(2-гидроксиметил)пиперазин-N'-(2-этансульфоновая кислота)
ИТС	изотермическая калориметрия
MOPS	3-(N-морфолино)пропансульфоновая кислота
P _i	фосфат
PNP	имидодифосфат
PP _i	пирофосфат
PPаза	пирофосфатаза
Bs-PPаза	пирофосфатаза <i>Bacillus subtilis</i>
Cn-PPаза	CBS-пирофосфатаза <i>Clostridium novyi</i>
Cp-PPаза	CBS-пирофосфатаза <i>Clostridium perfringens</i>
Dh-PPаза	CBS-пирофосфатаза <i>Desulfitobacterium hafniense</i>

N312S-Dh-PPаза	CBS-пирофосфатаза <i>Desulfitobacterium hafniense</i> с заменой остатка аспарагина на серин в DHNE мотиве
ΔCDC-Dh-PPаза	CBS-пирофосфатаза <i>Desulfitobacterium hafniense</i> без регуляторной части
EI-PPаза	CBS-пирофосфатаза <i>Eggerthella lenta</i>
Eh-PPаза	CBS-пирофосфатаза <i>Ethanoligenens harbinense</i>
S213N-Eh-PPаза	CBS-пирофосфатаза <i>Ethanoligenens harbinense</i> с заменой остатка серина на аспарагин в DHSE мотиве
Mt-PPаза	CBS-пирофосфатаза <i>Moorella thermoacetica</i>
RMSD	среднеквадратичное отклонение (root mean square deviation)
RMSF	среднеквадратичное смещение (root mean square fluctuation)
SDS	додецилсульфат натрия (sodium dodecyl sulfate)
TES	N-трис[гидроксиметил]метил-2-аминоэтансульфоновая кислота
TEV	вирус картофельной мозаики (tobacco etch virus)
WT	природный штамм (wild type)

1. ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Неорганический пирофосфат является метаболитом многих биосинтетических процессов. Неорганические пирофосфатазы (РРазы) гидролизуют его, тем самым сдвигая равновесия реакций в сторону биосинтеза. Во всех клетках есть растворимая РРаз, преобразующая энергию пирофосфата в тепловую энергию. Существует три негомологичных семейства растворимых РРаз [1]. Семейство I распространено во всех организмах, семейства II и III встречаются только в бактериях и археях. В некоторых организмах присутствует также мембранная пирофосфатаза, действующая как H^+ - или Na^+ -помпа.

Растворимые пирофосфатазы семейства I были открыты в середине 1950-х годов. Они являются глобулярными гомодимерными или гомогексамерными белками. Для катализа им необходимы ионы магния. Если семейство I довольно хорошо изучено, то семейства II и III начали изучать лишь недавно. Растворимые пирофосфатазы семейства II являются двудоменными белками, активный центр которых расположен на границе двух доменов. Эти ферменты являются гомодимерами. Для катализа им также необходимы ионы магния, но максимальную активность они проявляют, если в среде присутствуют также ионы переходных металлов (Mn^{2+} , Co^{2+}). О пирофосфатазах семейства III известно пока немного. Они относятся к классу НАД-белков (haloacid dehydrogenase — дегидрогеназа галоген-замещенных кислот) и также требуют для катализа присутствия ионов металлов.

Уровень пирофосфата в клетках выше равновесного на 2-3 порядка, хотя растворимый фермент постоянно присутствует в клетке и обладает высокой активностью *in vitro*. Отсюда следует, что пирофосфатаза не проявляет в клетке всю свою потенциальную активность, т.е. она регулируется.

Степень разработанности темы. Пути регуляции растворимых РРаз пока не известны. Наибольший прогресс достигнут для растворимых пирофосфатаз семейства II, содержащих нуклеотид-связывающие CBS-домены (CBS-РРаз). Каждая из субъединиц белка имеет в своем составе пару CBS-доменов, способных связывать фосфатные производные аденозина (AMP, ADP и АТР): AMP и ADP ингибируют, а АТР активирует фермент. Кинетический и молекулярный механизмы регуляции CBS-РРаз в клетке практически не известны.

Цель работы заключалась в установлении механизма регуляции CBS-РРазы. Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**: 1) Определить кинетический механизм влияния лигандов активного центра (субстрата, ионов металлов) и регуляторного центра (производных аденозина) на работу фермента; 2) определить структурные элементы белка, участвующие в передаче сигнала между регуляторными и каталитическими центрами.

Научная новизна работы. Установлено, что регуляция CBS-PPазы происходит по кооперативному механизму, который имеет два аспекта: кооперативное связывание субстрата и кооперативное связывание аденозиноголигофосфатов. Оба типа кооперативности положительны и, действуя вместе, усиливают зависимость активности фермента от концентраций пиррофосфата и аденозиноголигофосфатов. Кроме этого, был выявлен еще один класс активаторов CBS-PPаз – диаденозинполифосфаты (Ar_nA , $n = 3-6$). Помимо активации фермента в несколько раз, они устраняют оба типа кооперативности в регуляции, а по своему средству к CBS-PPазе превосходят мононуклеотиды на 2-3 порядка. Точечным мутагенезом показана важная роль остатка аспарагина в каталитической части фермента для передачи информации между субъединицами димера CBS-PPазы. Все эти результаты являются новыми.

Теоретическая значимость работы заключается в понимании регуляции работы CBS-PPазы, как наиболее простого CBS-белка, а также в возможности переноса полученных результатов на другие CBS-белки.

Практическая значимость работы. Полученные данные могут быть использованы в белковой инженерии для рационального дизайна нуклеотид-регулируемых белков.

Апробация работы. Основные результаты работы были доложены на Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2015», Москва, Россия (2015).

Степень достоверности представленных результатов диссертационного исследования подтверждена публикацией научных результатов в трёх научных статьях в рецензируемых научных журналах, определенных Высшей аттестационной комиссией и индексируемых в базах Web of Science и Scopus.

Личный вклад автора состоит в непосредственном участии автора в получении исходных данных и научных экспериментах, в обработке и интерпретации экспериментальных данных, полученных лично автором, в подготовке публикаций в рецензируемых журналах по теме выполненной работы.

2. Белки, содержащие CBS-домены (обзор литературы)

Впервые нуклеотид-связывающие CBS-домены были обнаружены Бейтманом [2] в составе нескольких белков бактерии *Methanococcus jannaschii* и фермента цистатионин- β -синтазы (CBS) человека. По сокращенному названию последнего они и были обозначены. Для краткости мы будем называть белки, содержащие эти домены, CBS-белками. CBS-домены к настоящему моменту обнаружены во многих организмах — так у человека есть 75 CBS-белков, а у бактерии *Escherichia coli* — 8. Число CBS-доменов в составе одного полипептида для охарактеризованных белков варьирует от 2 до 4. Тем не менее, имеются предсказанные последовательности белков с неизвестной функцией, имеющих в своем составе 8 (UniProtKB: Q8ZTN6) или даже 20 CBS-доменов (UniProtKB: W2PZQ5). С мутациями в CBS-доменах растворимых белков и мембранных каналов связан ряд наследственных заболеваний человека, таких как гомоцистинурия, пигментозный ретинит, синдром Бартера, остеопетроз и другие [3].

CBS-домен образован несколькими α -спиралями и β -тяжами, имеет топологию $\beta 1$ - $\alpha 1$ - $\beta 2$ - $\beta 3$ - $\alpha 2$ (рис. 1А) и относится к типу $\alpha + \beta$ — β -лист из трёх β -тяжей (первые два параллельны, третий антипараллелен) дополнен двумя α -спиралями, расположенными по одну сторону β -листа (рис. 1Б). Перед CBS-доменом, как правило, находится небольшая спираль $\alpha 0$, за которой следует линкер (иногда содержащий тяж $\beta 0$). В структурах некоторых белков тяж $\beta 1$ заменен соединительным линкером (рис. 1Б).

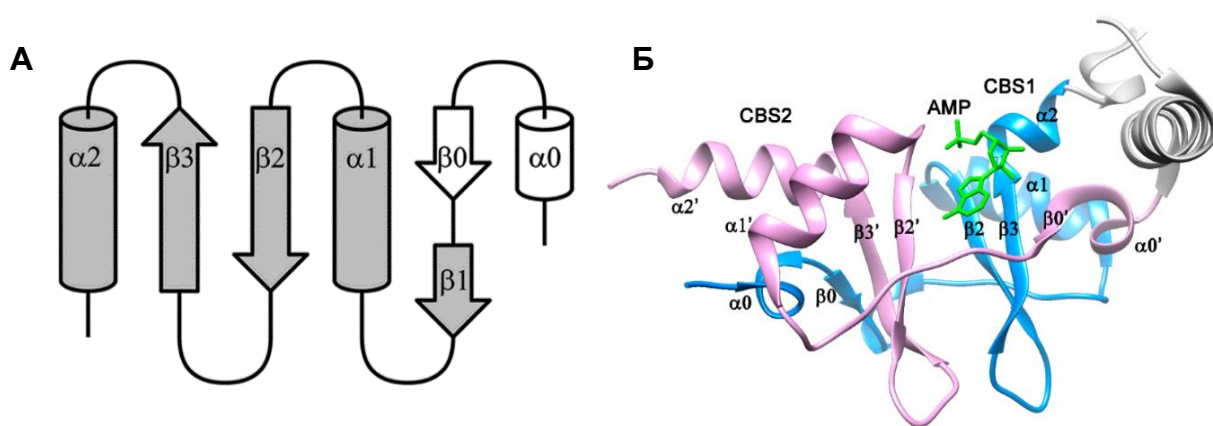


Рис. 1. Структура CBS-домена. (А) Топология CBS-домена. Ядро CBS-домена отмечено серым цветом, обычно присутствующий линкер — белым [4]. (Б) Структура субъединицы белка CBSX2 из *Arabidopsis thaliana* (код PDB: 4GQY). CBS-домены окрашены в голубой и розовый цвета, связанный AMP в центре S1 — в зеленый, дополнительная вставка между CBS-доменами — в серый. Обозначения элементов вторичной структуры относятся только к CBS-доменам. $\beta 1$ - и $\beta 1'$ -тяжи отсутствуют в данной структуре.

CBS-домены всегда встречаются парами. Пожалуй, единственное исключение — это белок CBSDUF7 из *A. thaliana*, в котором один из четырех CBS-доменов заменен близкой по длине последовательностью, богатой остатками серина. CBS-домены образуют псевдо-димер (иначе называемый модуль Бейтмана) за счёт тесно ассоциированных β -листов; димер и является функциональной единицей (рис. 1Б). Два модуля Бейтмана могут быть организованы в пространстве тремя способами: (а) параллельно, в диск-подобную структуру по типу голова-к-голове (около 95% известных структур — С- и N-концы мономеров в димере находятся с одной стороны), так что сближенными оказываются CBS1-домен первой субъединицы и CBS1-домен второй субъединицы (аналогично сближены и CBS2-домены) (рис. 2А); (б) антипараллельно, в диск-подобную структуру по типу голова-к-хвосту (менее 5% известных структур — С- и N-концы мономеров в димере находятся по разные стороны), так что сближенными оказываются CBS1-домен первой субъединицы и CBS2-домен второй субъединицы (рис. 2Б); (в) как V-образная структура (около 1% известных структур) — в димере образует контакт лишь одна пара CBS-доменов (рис. 2В). Структуру, образованную четырьмя CBS-доменами, называют CBS-модулем.

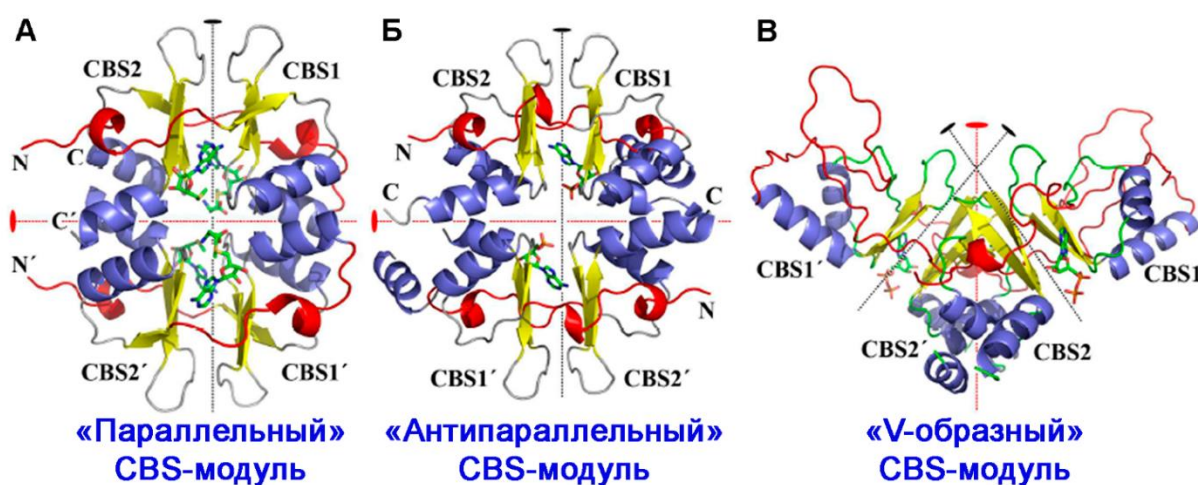


Рис. 2. Структура CBS-модуля (пары модулей Бейтмана) [5]. В зависимости от ориентации модулей Бейтмана CBS-модуль может быть: (А) параллельным, (Б) антипараллельным и (В) V-образным. Во всех трех случаях модули Бейтмана обладают псевдо-осью симметрии второго порядка (показана красной пунктирной линией). CBS-домены также обладают осью симметрии второго порядка (показана черной пунктирной линией). Показанные структуры соответствуют белкам MJ0100 из *M. jannaschii* (код PDB: 3KPC), CBSX2 из *A. thaliana* (код PDB: 4GQY) и CIC-5 человека (код PDB: 2JA3).

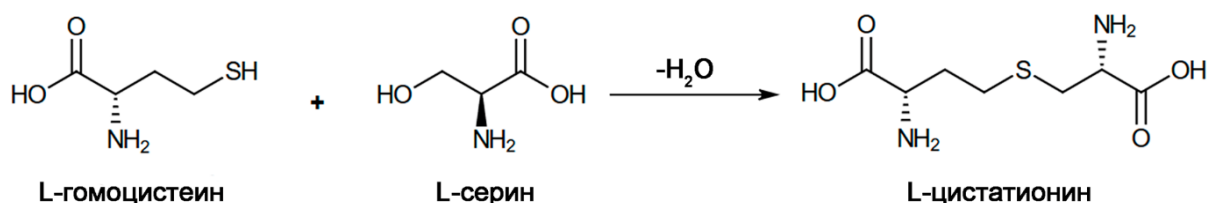
В силу симметричного расположения CBS-доменов в модуле Бейтмана (ось симметрии второго порядка) последний имеет в своем составе два центра связывания (S1 и S2), расположенные между CBS-доменами. Однако, не все CBS-белки связывают лиганды в обоих центрах.

Пространственная структура полного белка или его CBS-доменов определена для 47 CBS-белков. К белкам, для которых с определенными оговорками известна полная структура, относятся цистатионин-β-синтаза (CBS) [6], инозин-5'-монофосфатдегидрогеназа (IMPDH) [7], АМР-активируемая протеинкиназа (АМРК) [8], магний-селективный канал (MgtE) [9], хлорид-транспортирующие белки (C1C) [10] и белок с неизвестной функцией TTHA0829 (предполагаемая ацетондегидрогеназа) [11]. Для CBS-PPазы [12], транспортера карнитина OpuCA [13], транспортера магния CogC (PDB код: 3NQR), магниевого канала CNNM2 [14], репрессора CspN (PDB код: 3FWR) и 18 белков с неизвестной функцией определены структуры только их CBS-доменов. Особую группу составляют структуры 18 белков, которые образованы только CBS-доменами (например, белки CBSX растений [15]; один из них имеет дополнительный мотив «цинковый палец» [16]).

Настоящий обзор посвящен нескольким наиболее изученным CBS-белкам, для которых решена (полностью или частично) пространственная структура и определена функция в клетке.

2.1. Цистатионин-β-синтаза (CBS)

Как уже было сказано, именно с цистатионин-β-синтазы началась история изучения CBS-доменов. Фермент катализирует одну из реакций в цепи синтеза цистеина у всех эукариотов — синтез L-цистатионина из L-серина и L-гомоцистеина [17]:



CBS является гомотетрамером [18], каждая из субъединиц которого содержит каталитическое ядро (N-концевой гем-связывающий домен и центральный каталитический домен со связанным пиридоксаль-5'-фосфатом (PLP)), линкер и C-концевой тандем двух CBS-доменов (модуль Бейтмана), связывающих эффектор S-аденозилметионин (SAM) (рис. 3).

Если PLP абсолютно необходим для катализа, то присутствие гема не считалось важным. Например, дрожжевой фермент не содержит гем-связывающий участок и не связывает гем, но при этом нормально функционирует. Однако фермент человека без гема работает плохо (менее 20 % активности) [19]. В настоящий момент гему отводят две роли: с одной стороны, он необходим для связывания PLP в активном центре в процессе фолдинга белка [17]; с другой

стороны, атом Fe(II) гема является сенсором CO — при связывании последней фермент ингибируется [20].

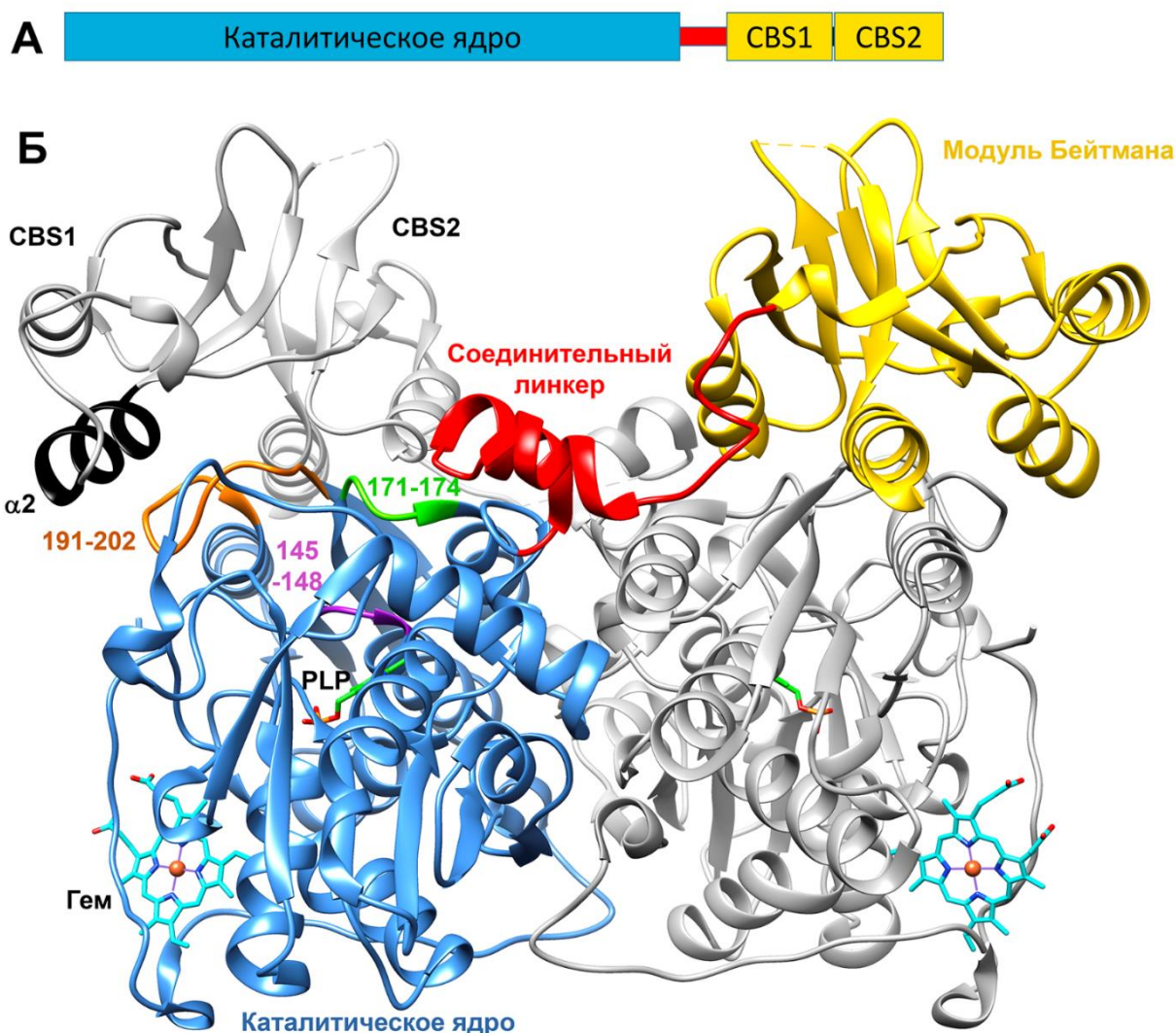


Рис. 3. Структура димерной CBS человека. (А) Топология доменов. (Б) Трехмерная структура димера без петли 513-519 (показана штриховыми линиями) (код PDB: 4COO). Каталитическое ядро выделено синим цветом, модуль Бейтмана — желтым, соединительный линкер — красным. Вторая субъединица окрашена в серый цвет. Гем и пиродоксаль-5'-фосфат окрашены в голубой и зеленый цвета, соответственно (кроме гетероатомов). Вход в активный центр закрыт тремя петлями: 145-148 (фиолетовый), 171-174 (салатовый) и 191-202 (оранжевый). Последняя контактирует с $\alpha 2$ -спиралью (черный цвет) CBS1-домена соседней субъединицы.

Вход в активный центр закрывается петлями 145–148, 171–174 и 191–202 (наиболее близкая к CBS1-домену). Также недалеко от входа располагается одна из α -спиралей CBS1-домена соседней субъединицы [6].

Активация под действием SAM (рис. 4) CBS человека (hCBS) происходит за счёт сближения модулей Бейтмана и образования CBS-модуля. При этом, облегчается доступ в

активный центр фермента за счет сдвига петли 191–202 [21]. Интересно, что CBS из *Drosophila melanogaster* (dCBS) всегда находится в активированной форме [22], благодаря менее структурированному линкеру, из-за чего CBS-домены образуют CBS-модуль без связанного SAM (рис. 5) и доступ в активный центр не затрудняют. Активацию, хотя и меньшую, можно наблюдать и если удалить CBS-домены в hCBS [6, 19]. Кроме того, CBS-домены hCBS в свободной форме расположены так, что в них доступны оба центра связывания SAM (S1 и S2), а в dCBS (или hCBS со связанным SAM) — доступен лишь один (S2).

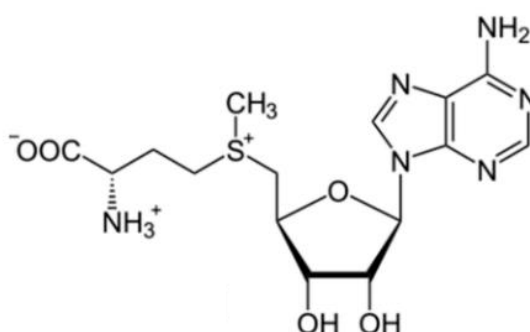


Рис. 4. Строение S-аденозил-метионина — активатора цистатионин-β-синтазы.

Интересно, что аллостерическая активация увеличивает максимальную скорость (число оборотов) фермента в 2,5–5 раз, но не влияет на константу Михаэлиса (K_m) [6, 19, 22]. Этот факт находится в некотором противоречии с выводом о том, что CBS-домены контролируют доступ в активный центр, впрочем, константа Михаэлиса не является константой равновесия комплексообразования.

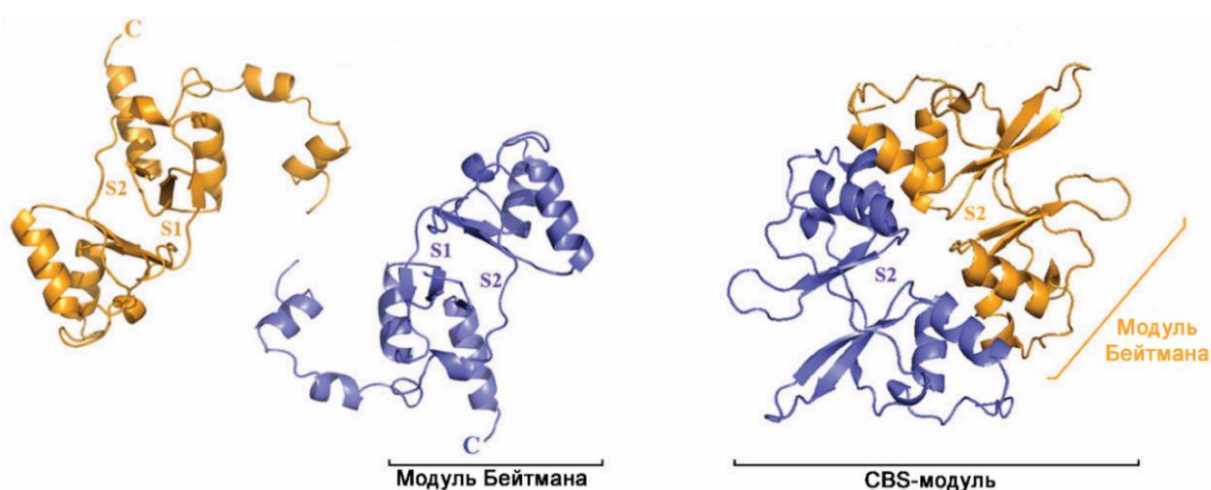


Рис. 5. Вид сверху на CBS-домены hCBS (слева) и dCBS (справа) без лигандов в регуляторных центрах [6]. Модули Бейтмана разных субъединиц окрашены в разные цвета.

Нужно отметить, что CBS-домены участвуют в образовании не только димерного контакта hCBS, но также и междимерного в тетрамере (рис. 6). Это следует из невозможности образования тетрамера мутантом hCBS не только с полностью удаленными CBS-доменами, но и лишённого петли 513–519 [6].

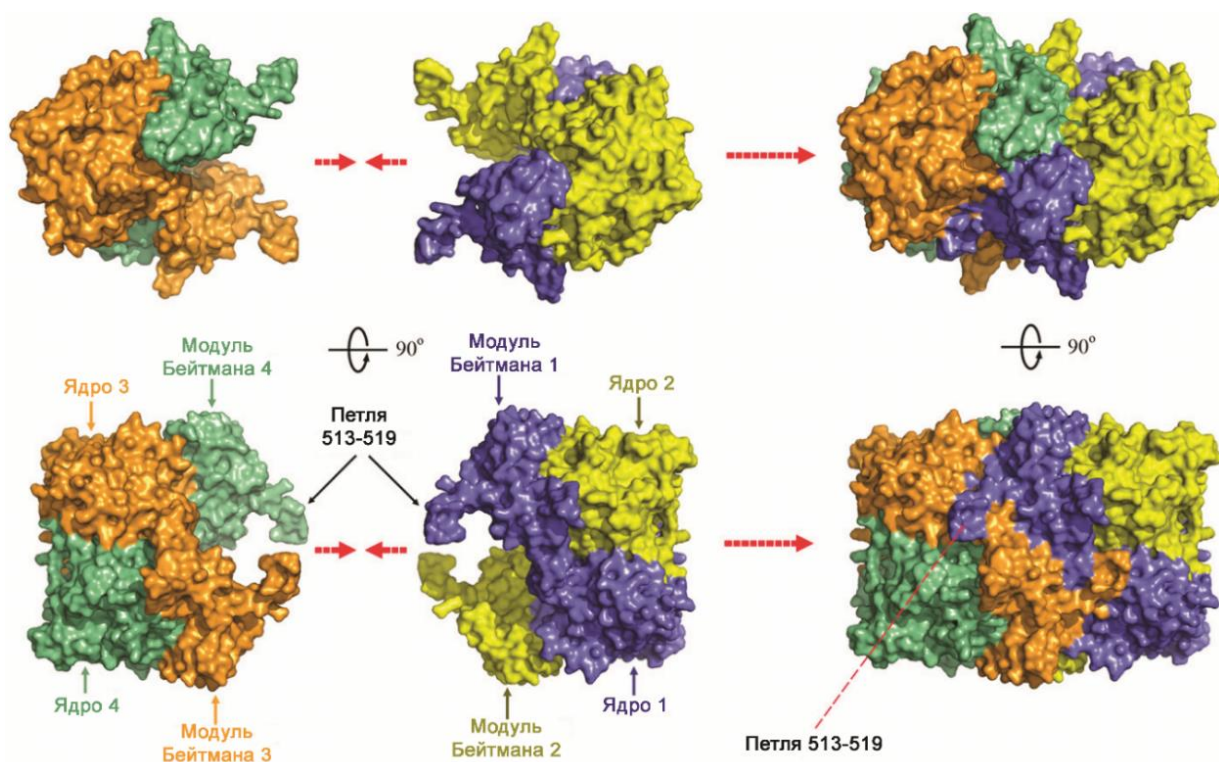


Рис. 6. Предположительная схема образования тетрамера hCBS [6]. Субъединицы окрашены в разные цвета. Нижние рисунки показывают вид сверху.

В литературе указывается, что активатор SAM связывается в регуляторных центрах разных субъединиц независимо (некооперативно) [18] или с положительной кооперативностью [23] с константой диссоциации 5–15 мкМ. Однако, последние исследования [24] показали, что hCBS имеет два класса центров связывания SAM — высокоаффинные ($K_d \sim 10$ нМ — два центра на тетрамер) и низкоаффинные ($K_d \sim 400$ нМ — четыре центра на тетрамер). Это склоняет чашу весов в сторону положительной кооперативности. Высокоаффинные центры нужны для стабилизации фермента, а низкоаффинные — для его активации. Без SAM происходит постепенная денатурация регуляторных доменов фермента. Обращаясь к схеме на рис. 6, высокоаффинные центры, скорее всего, расположены на границе димера hCBS, и, связываясь там, SAM стабилизирует тетрамер, в то время как низкоаффинные центры — это канонические центры связывания в CBS-доменах (в данном случае S2), через которые осуществляется регуляция активности. Это согласуется с тем, что активация фермента на 50% происходит при концентрации SAM, равной 3,2 мкМ [24].

2.2. АМР-активируемая протеинкиназа (АМРК)

Другим примером CBS-содержащего белка является эукариотическая АМР-активируемая протеинкиназа (АМРК) (рис. 7). Фермент относится к классу серин/треониновых протеинкиназ и участвует в поддержании энергетического гомеостаза клетки и в ответе на стресс [25]. При низком уровне энергии (большая часть АТФ гидролизована до АДФ и АМР) фермент активируется и переключает метаболические пути на синтез АТФ (активация транспорта глюкозы, включение гликолиза и окисления жирных кислот, остановка синтеза гликогена); когда энергии много (концентрация АТФ сильно превалирует над АДФ и АМР) фермент ингибируется, что позволяет снова переключить метаболические пути с помощью ферментов фосфатаз.

АМРК состоит из трех разных субъединиц (каталитической α , и регуляторных β и γ (рис. 7), каждая из которых может продуцироваться в нескольких изоформах (для α и β — 2, для γ — 3) [26]. α -Субъединица состоит из N-концевого домена, обладающего киназной активностью, небольшого автоингибирующего домена и С-концевого домена, отвечающего за связывание с регуляторными субъединицами. Эта субъединица определяет локализацию фермента в клетке (форма 1 — вне ядра, форма 2 — как в ядре, так и вне его). β -Субъединица содержит два домена: N-концевой, благодаря которому фермент может присоединяться к мембране и связывать гликоген, и С-концевой, который отвечает за связывание с другими субъединицами. γ -Субъединица состоит из небольшого варибельного N-концевого участка и тандема четырех CBS-доменов (двух модулей Бейтмана) [27].

Фермент может быть активирован как фосфорилированием остатка треонина 172 в α -субъединице (посредством вышестоящих серин/треониновых киназ — АМРКК (LKB1, CaMKK, TAK1)) [28], так и связыванием АМР в γ -субъединице: при этом дефосфорилирование невозможно до ухода АМР. Деактивация происходит с помощью фосфатаз 2A/2C (PP2A/PP2C) или при связывании АТФ (как с фосфорилированной, так и со свободной формой, при этом последняя не может быть активирована (фосфорилирована) до ухода АТФ, а активная (фосфорилированная) подвергается немедленному дефосфорилированию) [3].

CBS-домены фермента образуют CBS-модуль диск-подобной структуры, так что γ -субъединица теоретически способна связать четыре молекулы лиганда. Однако, АМРК в общем случае связывает только 3 молекулы АМР (в центрах S1, S3 и S4). Центр S2 остается незаполненным, он участвует во взаимодействии с β -субъединицей [29]. Одна молекула АМР постоянно связана с γ -субъединицей (центр S4), и ещё две молекулы АМР связываются с положительной кооперативностью [3]. АТФ, также связывается кооперативно. Показано, что все изоформы γ -субъединицы могут связывать аденозилигофосфаты, однако, концентрации полунасыщения ($V_{0.5}$) у них различаются следующим образом: $\gamma 1 < \gamma 2 < \gamma 3$ (для АМР 20, 53 и 125

мкМ соответственно, для АТФ концентрации больше в 4–8 раз [3]) — это свидетельствует о возможности дифференциальной регуляции АМРК аденозинолигофосфатами.

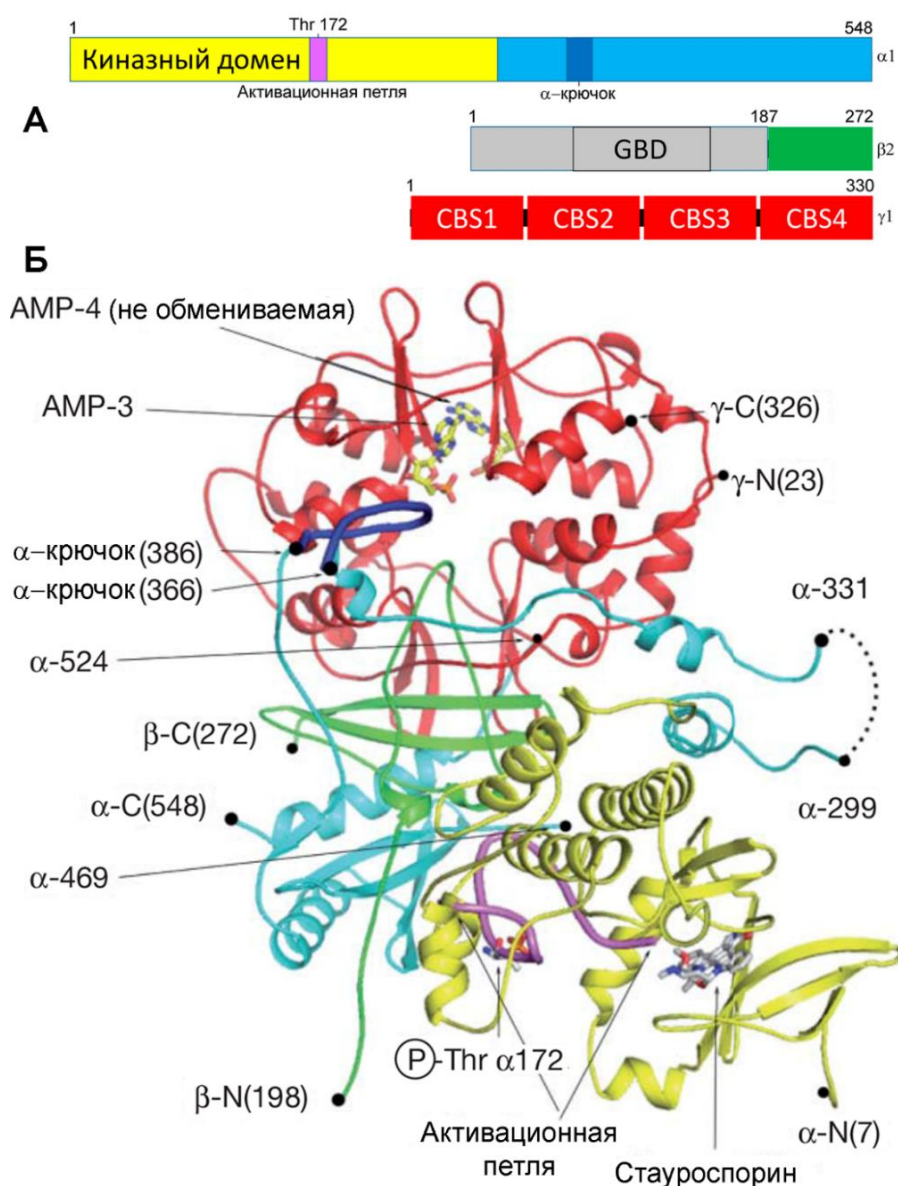


Рис. 7. Структура гетеротримера АМРК человека. (А) Топология доменов α -, β - и γ -субъединиц. (Б) Трехмерная структура со связанными молекулами АМР в центрах S3 и S4 регуляторной γ -субъединицы (код PDB: 4CFH); фосфорилированным остатком Thr172 и связанным стауроспорином (ингибитором) в каталитической α -субъединице [8]. Субъединицы α и γ приведены полностью (за исключением некоторых петель), субъединица β приведена частично, в виде С-концевого участка 198–272.

Хотя полная кристаллическая структура гетеротримера АМРК пока не известна, по некоторым данным [8] в передаче сигнала из регуляторной γ -субъединицы в каталитическую α -субъединицу участвует небольшой участок α -субъединицы (« α -крючок», рис. 7), расположенный вблизи центра связывания S2 γ -субъединицы (в общем случае незаполненного). Скорее всего

именно через него передается сигнал для фосфорилирования/дефосфорилирования остатка Thr172.

Для АМПК дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* (spAMPK) показано связывание молекулы ADP в центре S2 гетеротримера [30], причём даже в присутствии других аденозиолигофосфатов. Помимо остатков γ -субъединицы в связывании участвуют остатки β D250, β Q251, β S252 С-концевого домена β -субъединицы (рис. 8), отвечающие за связывание кольца рибозы. В центре S2 γ -AMPK, консервативный остаток глицина заменен на тирозин, а аспартата на аргинин (рис. 8, γ R165). Это делает невозможным связывание AMP, но ADP связывается — за счёт более длинной олигофосфатной части и другой конформации он способен координироваться остатком аргинина. Связыванию АТФ мешает слишком длинная олигофосфатная часть.

Для АМПК человека также совсем недавно было показано связывание ADP с фосфорилированной формой фермента [8]. Это связывание не влияет на активность фермента, но предотвращает его дефосфорилирование.

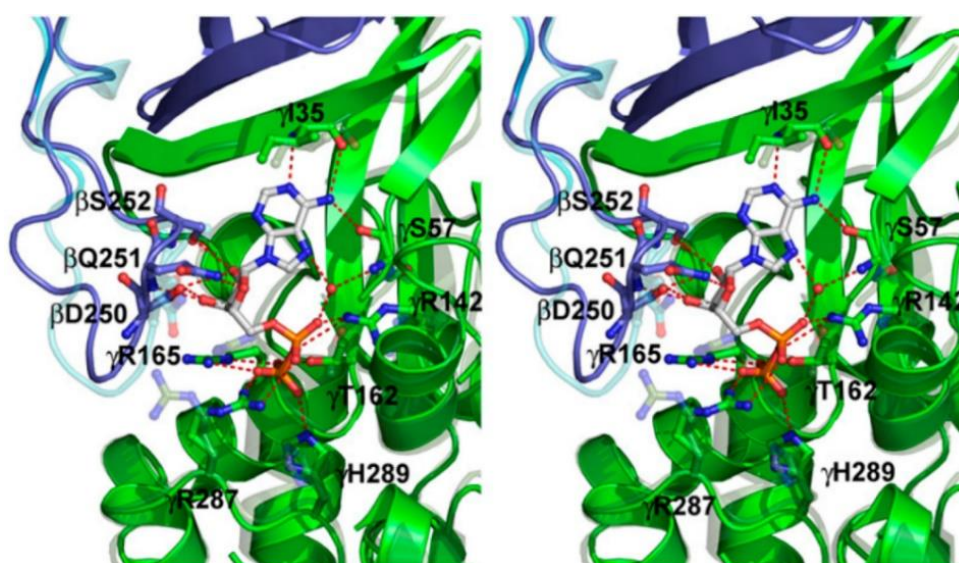


Рис. 8. Стереорезультат изображения центра связывания S2 γ -субъединицы spAMPK [30]. β - и γ -субъединицы окрашены в синий и зеленый цвет, соответственно. Наложенные структуры β - и γ -субъединиц без связанного ADP показаны полупрозрачными, чтобы иллюстрировать конформационные изменения при связывании.

В *M. jannaschii* есть гомолог γ -субъединицы АМПК, CBS-белок MJ1225 (рис. 9), который может связывать лиганд в центре S2, поскольку сохранил все необходимые остатки для связывания адениновых производных, в частности консервативный остаток аспарагиновой кислоты, который в γ -AMPK человека или *S. pombe* заменен на аргинин [31]. Интересно, что в MJ1225 AMP может связываться и в неканонических центрах на периферии CBS-доменов (рис. 9).

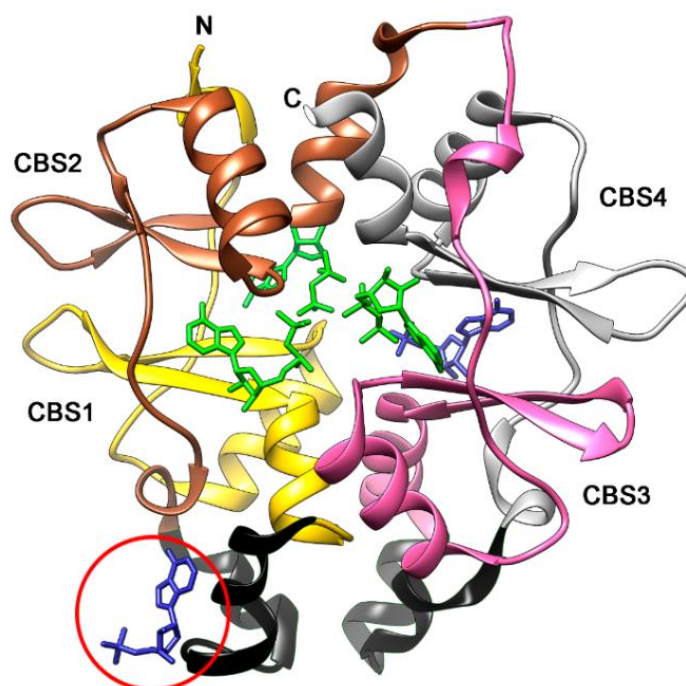
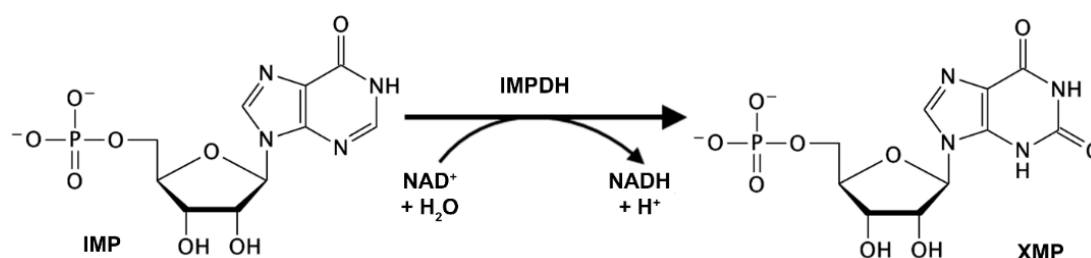


Рис. 9. Структура CBS-белка MJ1225 со связанными лигандами: AMP (окрашены в синий цвет) и ADP (зеленый) (код PDB: 3KH5). CBS-домены окрашены в различные цвета, дополнительные вставки между доменами CBS1 и CBS2, а также между CBS3 и CBS4 окрашены в черный цвет. Неканонический центр связывания отмечен красным кругом.

2.3. Инозин-5'-монофосфатдегидрогеназа (IMPDH)

Инозин-5'-монофосфатдегидрогеназа (IMPDH) превращает инозин-5'-монофосфат в ксантозин-5'-монофосфат с восстановлением кофактора NAD^+ до NADH (рис. 10). Фермент вводит карбонильный кислород в положение C2 инозина:



Продукт является предшественником гуанозин-5'-монофосфата, образуемого GMP-синтазой путем замены карбонильного кислорода в положении C2 на аминогруппу. Интересно, что IMP может быть предшественником для синтеза *de novo* как GTP, так и АТФ, поэтому регуляция его превращения важна для регуляции соотношения пула адениновых и гуаниновых нуклеотидов [32]. Реакция, катализируемая IMPDH, является скоростью-лимитирующей стадией для *de novo* синтеза GTP.

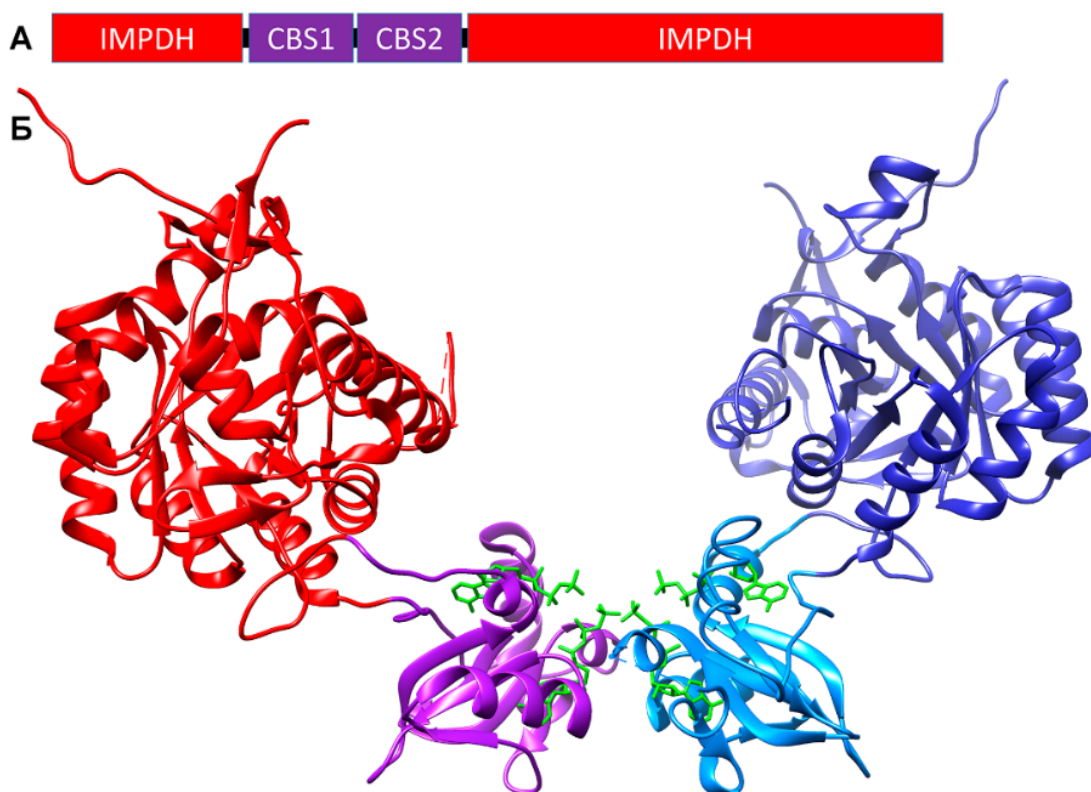


Рис. 10. Структура IMPDH. (А) Топология доменов. (Б) Трехмерная структура димера raIMPDH (IMPDH из *Pseudomonas aeruginosa*) (код PDB: 4DQW). Каталитические домены окрашены в синий и красный цвета, модули Бейтмана в голубой и розовый, связанный АТР в зеленый.

Структурно фермент является ТИМ-баррелем со вставкой через петлю двух CBS-доменов (рис. 10). Белок образует октамер (димер тетрамеров): каталитические домены образуют тетрамер, а CBS-домены, образуя четыре CBS-модуля диск-подобной структуры по типу голова-к-хвосту, связывают два тетрамера в октамер [7]. При этом тетрамеры в октамере могут находиться на различных расстояниях друг от друга (рис. 11) в зависимости от происхождения белка и состояния CBS-доменов (свободные или заполненные лигандами) [7, 33, 34]. Изменение взаимного расположения каталитического домена и CBS-доменов в результате связывания лигандов, по-видимому, лежит в основе регуляции IMPDH. Удаление регуляторной вставки приводит к активации фермента до уровня, сопоставимого с уровнем активности в присутствии активатора (АТР). Это означает, что регуляторная вставка сама по себе ингибирует фермент («внутреннее ингибирование»).

В работе бактериального фермента проявляется кооперативный механизм регуляции активности [7]. Зависимость скорости каталитической реакции от концентрации субстрата указывает на коэффициент Хилла больше единицы ($h = 1,55$). В присутствии насыщающих концентраций АТР кооперативность пропадает ($h \sim 1$). Кроме того, под действием АТР максимальная скорость удваивается, а K_m уменьшается в 50 раз (с 1,5 мМ до 30 мкМ). В дополнение к

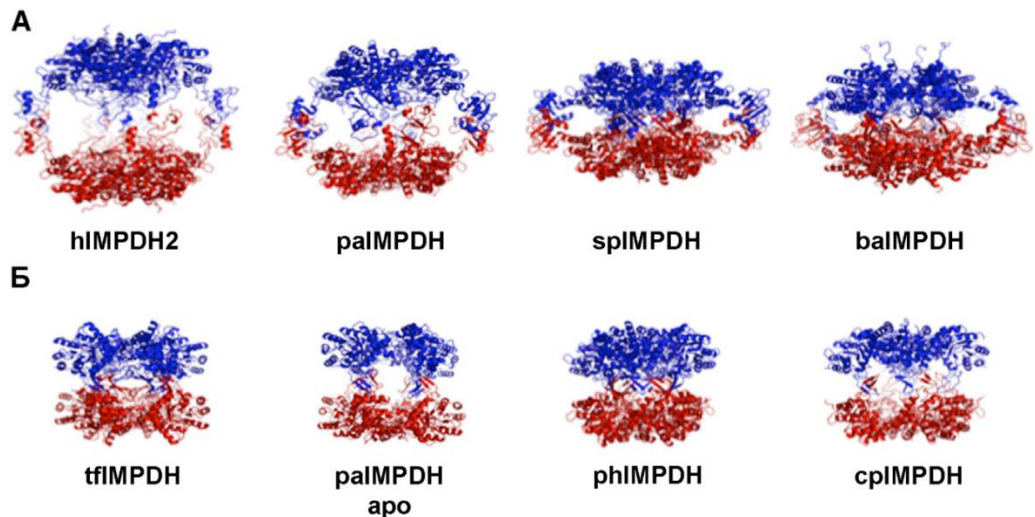


Рис. 11. Примеры организации октамеров IMPDH [7]. В синий и красный цвета окрашены тетрамеры. (А) Белки с известной структурой CBS-доменов. Слева направо: человека, *P. aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus anthracis*. (Б) — белки, для которых структура CBS-доменов не определена. Слева направо: *Tritichomonas fetus*, *P. aeruginosa*, *Pyrococcus horikoshii*, *Cryptosporidium parvum*.

вышеописанному, сам АТФ тоже связывается с положительной кооперативностью, заполняя оба центра связывания (S1 и S2) в модуле Бейтмана (димере CBS-доменов) каждой субъединицы октамера IMPDH.

В отличие от прокариотического фермента, эукариотический фермент аллостерически ингибируется миллимолярными концентрациями GDP и GTP [35]. Эти лиганды связываются в CBS-доменах (рис. 12), что возможно из-за более длинного линкера между CBS-доменами и нес-

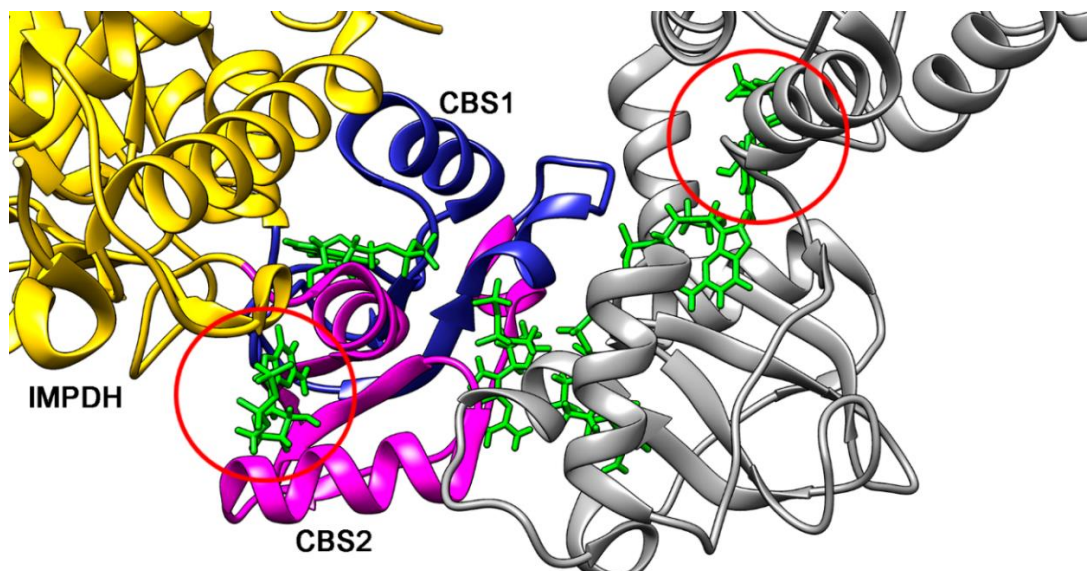


Рис. 12. Структура димера IMPDH *Ashbya gossypii* (agIMPDH) со связанным GDP (код PDB: 4Z87). Домен IMPDH окрашен в желтый цвет, CBS-домены — в синий и розовый цвета, соответственно, молекулы GDP в зеленый. Вторая субъединица окрашена в серый цвет. Молекулы GDP связанные вне канонических центров связывания CBS-доменов отмечены красными кругами.

кольких замен в области связывания лигандов (о чем будет рассказано в главе 2.8). Кроме того, в данном случае CBS-домены тоже способны связывать лиганды вне канонических центров связывания (рис. 12), как и белок MJ1225.

Интересным свойством обладает IMPDH человека — в присутствии MgATP фермент образует филаменты (рис. 13), структурной единицей которой является октамер, образуемый за счет взаимодействия тетрамеров через каталитические или регуляторные домены [7]. Единичная мутация в CBS2-домене (D226N) приводит к увеличению количества таких ассоциатов и агрегации белка (рис. 13Б). По данным криоэлектронной микроскопии, основная часть октамеров IMPDH (69%) образуется из тетрамеров за счет контактов каталитических доменов. Упомянутая мутация находится недалеко от области контакта субъединиц, образованного в октамере CBS-доменами. Если предположить, что мутация усилила взаимодействие CBS-доменов в октамере и между октамерами, то это могло привести к усилению взаимодействий в филаментах фермента, что в итоге привело к увеличению их длины и агрегации белка.

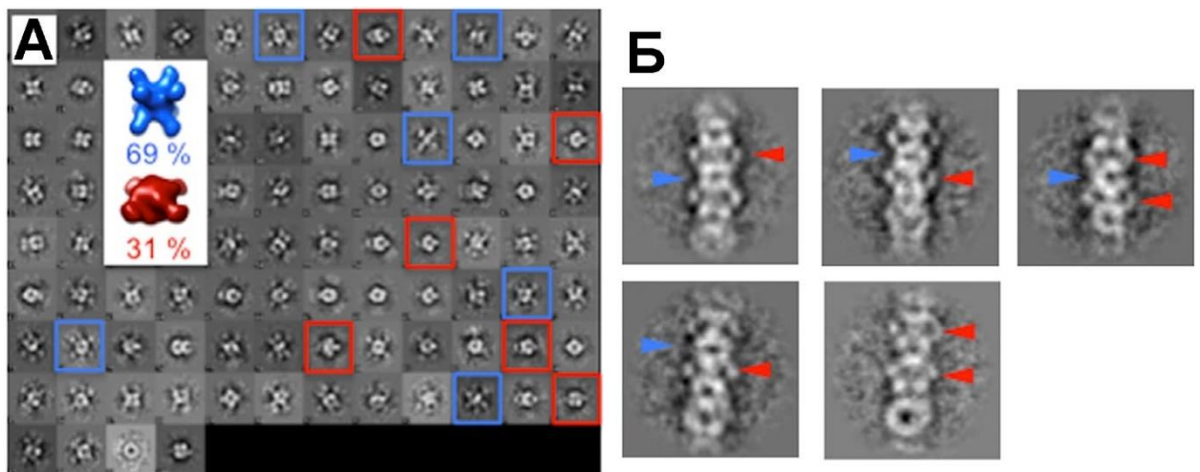


Рис. 13. Электронная микроскопия IMPDH1 человека [7]. (А) Обработанные снимки замороженной гидратированной IMPDH, раскрывающие два конформационных состояния. Основное состояние соответствует октамеру, образованному за счёт димеризации тетрамеров каталитических доменов (CBS-домены направлены наружу), в то время как минорное состояние аналогично раIMPDH. (Б) Частицы IMPDH в присутствии MgATP образуют филаменты, благодаря линейному стекингу октамеров.

Таким образом, CBS-домены позволяют IMPDH выполнять ключевую роль в регуляции соотношения пулов адениновых и гуаниновых нуклеотидов. Когда АТФ имеется в большом количестве, IMPDH превращает инозин для синтеза GTP, а когда концентрация АТФ уменьшается, активность фермента снижается и инозин идет на синтез АТФ. Дополнительная возможность ингибирования эукариотического фермента связыванием GDP или GTP в CBS-доменах усиливает данную регуляцию, позволяя выключать фермент при достаточно высоких концентрациях пула гуаниновых нуклеотидов.

2.4. Магний-селективный канал MgtE

Ион магния (Mg^{2+}) является самым распространенным двухвалентным катионом в клетке. Он критически важен для многих биохимических процессов, протекающих как внутри, так и вне клетки, а его недостаток (как и избыток) способен привести к серьезным заболеваниям [36]. Ион обладает самым маленьким радиусом и самой большой гидратной оболочкой среди других двухвалентных металлов и для его перемещения через мембрану клетки (поддержание определенной внутриклеточной концентрации) используются специализированные системы. Об одной из них и пойдет речь далее.

Бактериальный магний-селективный ионный канал MgtE является CBS-белком. Он помогает поддерживать постоянную концентрацию ионов магния в клетке [9]. MgtE состоит из цитоплазматической части (N-концевого домена, двух CBS-доменов и соединительной α -спирали) и трансмембранного домена, образованного пятью α -спиралями (рис. 14А).

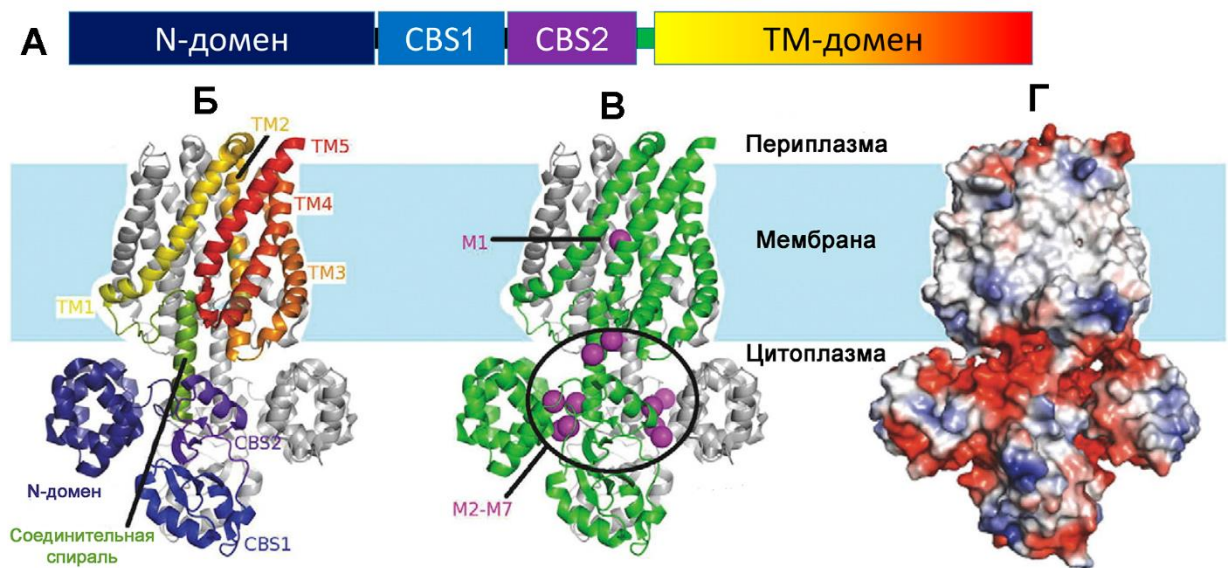


Рис. 14. Структура магниевого канала MgtE. (А) Топология доменов. (Б) Кристаллическая структура димера MgtE из *Thermus thermophilus* (код PDB: 2YVX) с обозначением доменов (N-домен окрашен в темно-синий цвет, CBS1 — в синий, CBS2 — в фиолетовый, соединительная спираль — в зеленый) и пронумерованными α -спиралями трансмембранного домена (окрашены от желтого до красного цвета), вторая субъединица окрашена в серый цвет [37]; (В) Та же структура со связанными ионами магния. Субъединицы окрашены в зеленый и серый цвета, из 13 ионов магния (окрашены в лиловый цвет) 12 связаны в цитоплазматической части, один (M1) связан в центральной проводящей поре; (Г) Распределение заряда на поверхности MgtE. Отрицательный заряд показан красным цветом, положительный синим, нейтральные области белым.

MgtE функционирует в гомодимерном состоянии. CBS-домены образуют димер по типу голова-к-голове [38], и связывают не нуклеотиды, а ионы магния (рис. 14Б,В), которые

модулируют работу канала [37]. Получены кристаллические структуры фермента при низкой и высокой концентрациях ионов магния, имеющие серьезные структурные различия, на основании которых можно было предположить механизм регуляции канала.

При высокой концентрации ионов магния канал закрыт — N-концевой домен и модуль Бейтмана сближены и образуют плотный контакт, так что соединительная спираль и ТМ-домен закрывают проводящую пору (рис. 15А). Когда концентрация ионов магния падает, комплекс белка с ионами магния диссоциирует. При этом разрушается контакт CBS-доменов (включая также контакт с N-концевым доменом) — CBS2-домены расходятся, что вызывает расхождение соединительных спиралей, которые в свою очередь раздвигают спирали ТМ2 и ТМ5, открывая проводящую пору (рис. 15Б) для входа ионов магния внутрь клетки. При повышении внутриклеточной концентрации ионов магния канал закрывается - CBS2-домены сближаются, индуцируя сближение соединительных спиралей, изменение положения спиралей ТМ2 и ТМ5 и, как следствие, закрытие проводящей поры. CBS-домены MgtE связывают ионы магния, а не производные аденина из-за сильного отрицательного заряда в области контакта CBS2- и N-домена (рис. 14Г) вследствие мутаций нескольких остатков, связывающих производные аденозина.

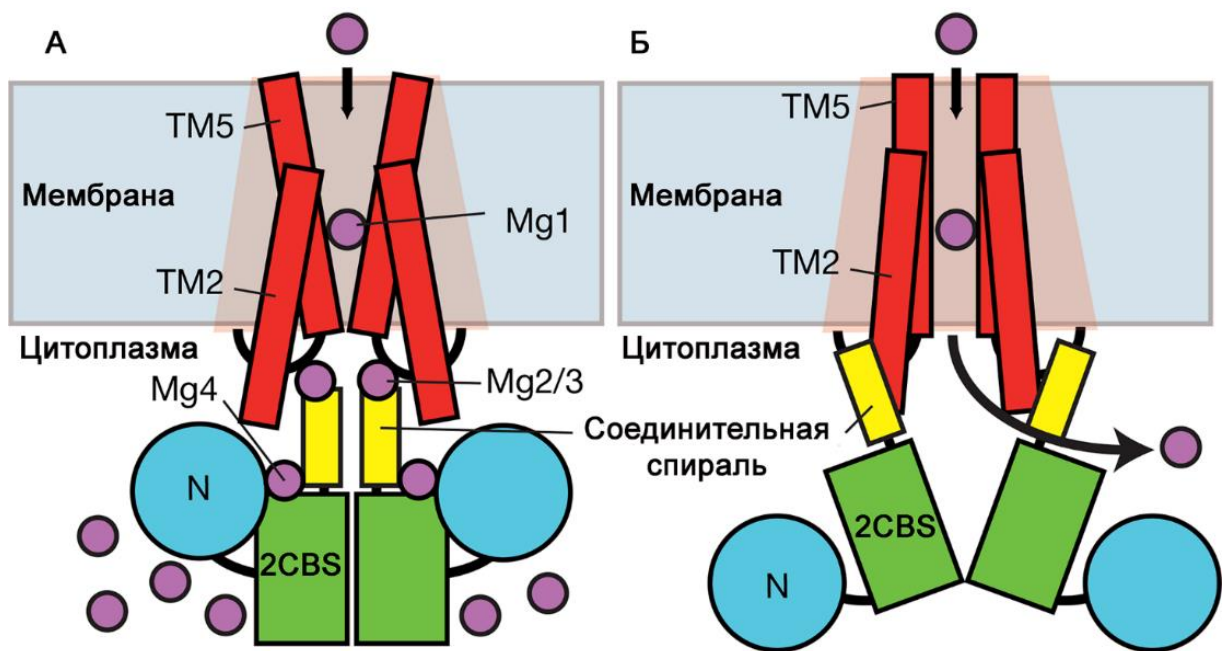


Рис. 15. Механизм работы магниевого канала MgtE [38]. Здесь 2CBS — обозначение модуля Бейтмана (два CBS-домена). N-домен окрашен в голубой цвет, модуль Бейтмана — в зеленый, соединительная спираль — в желтый, трансмембранные α -спирали 2 и 5 — в красный, ионы магния — в лиловый цвета. (А) Закрытое состояние при высокой внутриклеточной концентрации ионов магния. (Б) Открытое состояние при низкой внутриклеточной концентрации ионов магния.

2.5. Семейство хлорид-транспортирующих белков ClC

Хлорид-транспортирующие белки (ClC-белки) также относятся к мембранным белкам. Существует два класса ClC-белков — каналы и антипортеры [39]. Первым представителем стал хлоридный канал ClC-0 из *Torpedo marmorata* [40]. У *E. coli* два канала (ClC-ec1 и ClC-ec2) [41], у человека четыре канала (1, 2, Ка, Кб) и пять антипортеров (3-7) [42]. Все эукариотические ClC-белки содержат тандем из двух CBS-доменов на С-конце [3]. Активность антипортеров регулируется связыванием того или иного лиганда, а активность каналов как связыванием лигандов, так и трансмембранной разностью потенциалов. Например, ClC-2 (канал) связывает АМР и АТР, причём АМР, конкурируя с АТР, делает из «медленного» канала «быстрый» [43]. ClC-5 (антипортер) тоже регулируется аденозилигофосфатами [44]. У всех эукариотических ClC-белков трансмембранная часть состоит из 18 α -спиралей (А–R), причём спирали В–I расположены в одном направлении, J–Q — в противоположном, а спирали А и R полностью или практически полностью находятся в растворе [45] (рис. 16).

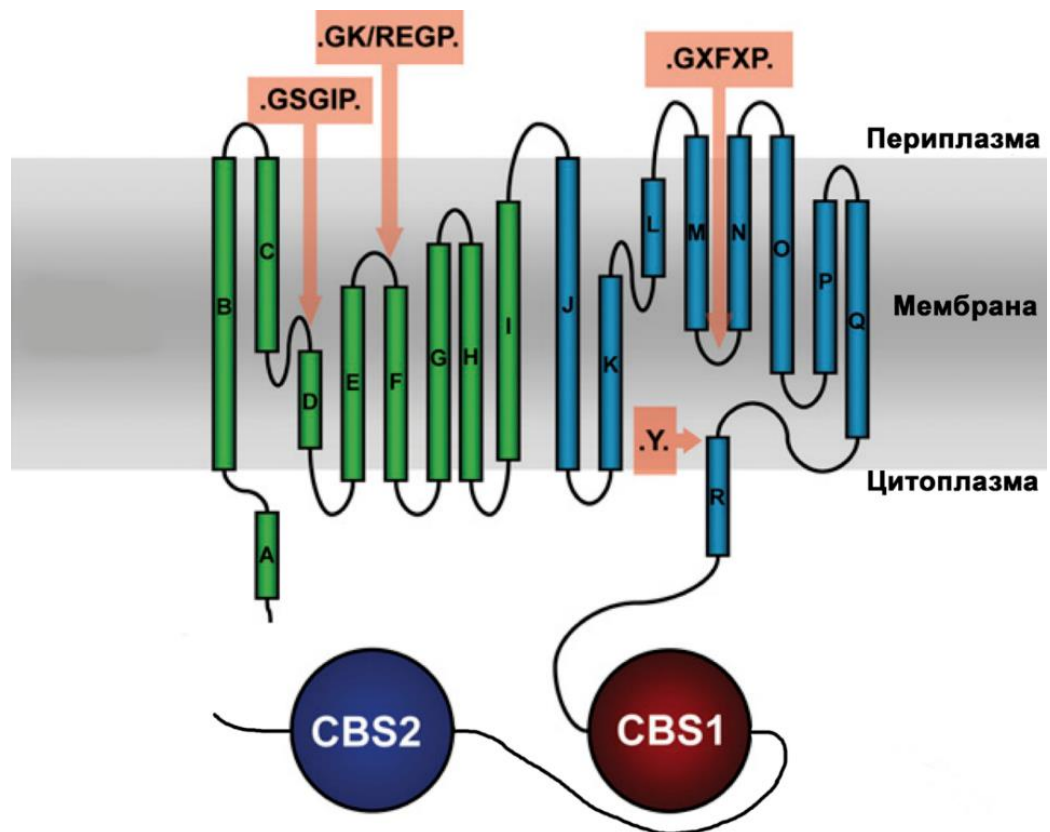


Рис. 16. Топология ClC-белка [45]. Восемнадцать α -спиралей обозначены буквами от А до R. Две похожие половины трансмембранной части (α -спирали В–I и J–Q), ориентированные в противоположных направлениях, окрашены в зеленый и голубой цвета соответственно. Районы, ответственные за селективный перенос хлорид-иона, отмечены стрелками, в них показаны консервативные последовательности. Два CBS-домена цитоплазматической части показаны красной и синей сферами.

Цитоплазматическая часть состоит из CBS-доменов, разделенных петлей. Они имеют необычную организацию (рис. 17) и образуют не диск-подобную структуру, а V-подобную, образованную за счёт плотно ассоциированных CBS2-доменов [46, 47]. Связывание лигандов не сказывается ни на структуре самих CBS-доменов, ни на их взаимном расположении.

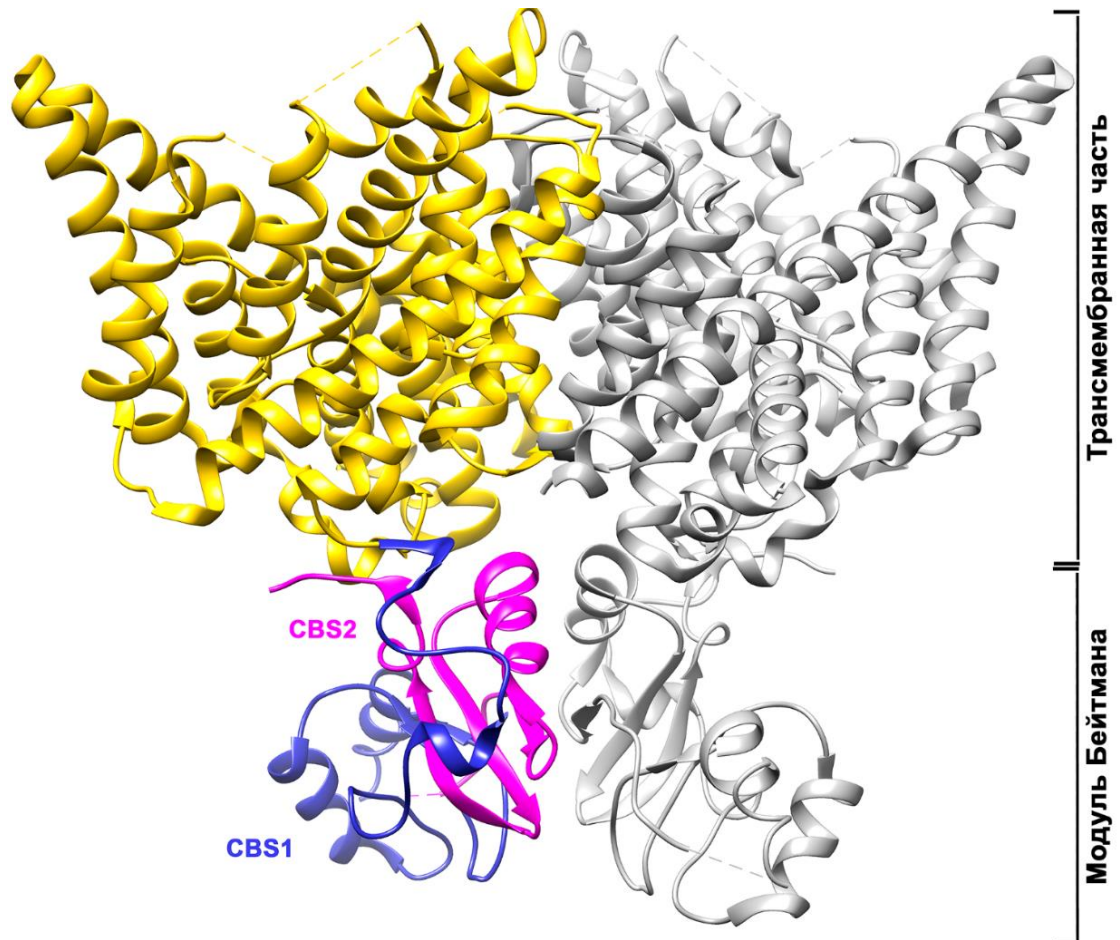


Рис. 17. Структура димера эукариотического хлоридного транспортера *Cyanidioschyzon merolae* (cmClC, гомолога hClC-5) без петли 600-656 (отмечена пунктиром) (код PDB: 3ORG). Трансмембранная часть окрашена в желтый цвет, домены CBS1 и CBS2 — в синий и розовый цвета соответственно.

Анализ имеющихся структур CBS-доменов ClC-белков показывает, что связывается одна молекула лиганда на димер CBS-доменов в каноническом центре связывания (S2). Однако, в связывании лиганда помимо аминокислотных остатков CBS-доменов скорее всего участвует остаток Lys180, находящийся перед мембранной спиралью αD — это видно при наложении кристаллических структур апо-формы фермента и регуляторной вставки, содержащей АТФ — остаток Lys180 может координировать олигофосфатную часть лиганда (рис. 18). Спираль αD оканчивается остатком Ser165, непосредственно участвующем в транспорте. Кроме этого, в транспорте также участвует остаток Tyr515 петли αR , за которой следует соединительный линкер CBS1-домена [10]. Таким образом, здесь могут существовать два пути передачи сигнала из

растворимой части CIC-белков в трансмембранную — через спираль αD (от Lys180 к Ser165) или через αR (от линкера к Tyr515).

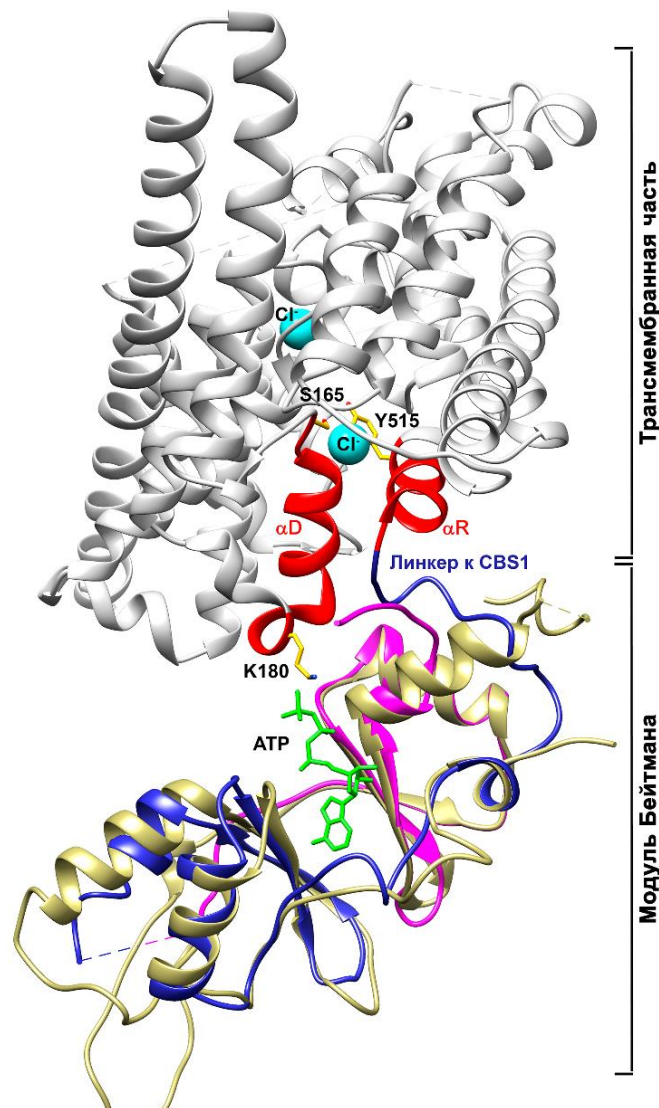


Рис. 18. TM-CBS интерфейс в *smCIC*. Трансмембранный домен окрашен в серый цвет, спирали αD , αR и начальный участок αE — в красный, CBS1-домен — в синий, CBS2-домен — в розовый. Наложенная структура регуляторной вставки *hCIC-5* со связанным АТФ (зеленый) окрашена в бежево-желтый цвет (код PDB: 2J9L). Выделенные аминокислотные остатки окрашены в желтый цвет для углеродной цепи, в красный и синий для гетероатомов. Хлорид-ионы окрашены в голубой цвет.

CIC-белки связывают ещё один тип лигандов CBS-доменов — динуклеотиды. Такой лиганд как никотинамидадениндинуклеотид (NAD^+) ингибирует активность CIC-1 (потенциал-зависимый хлоридный канал в мышцах), при этом, его восстановленная форма NADH ингибирует хуже, а $NADP^+$ (фосфорилированная форма NAD^+) совсем не ингибирует активность фермента [48]. Здесь, скорее всего, сказывается наличие фосфатной группы в 2' положении кольца рибозы, что предотвращает связывание в центре S2. Однако, механизм ингибирования пока не известен.

2.6. Растительные белки семейства CBSX

Как уже упоминалось, CBS-домены могут не только входить в состав белков, но являться самостоятельной структурой. Простейшим примером можно считать растительные белки CBSX_n (n от 1 до 6), впервые обнаруженные в растении резуховидка Таля (*A. thaliana*). Они состоят только из двух CBS-доменов и небольшой дополнительной последовательности между ними. Белки являются гомодимерами, образованными по типу голова-к-хвосту — С- и N-концы мономеров в димере находятся по разные стороны, так что сближенными оказываются CBS1-домен первой субъединицы и CBS2-домен второй субъединицы (рис. 19).

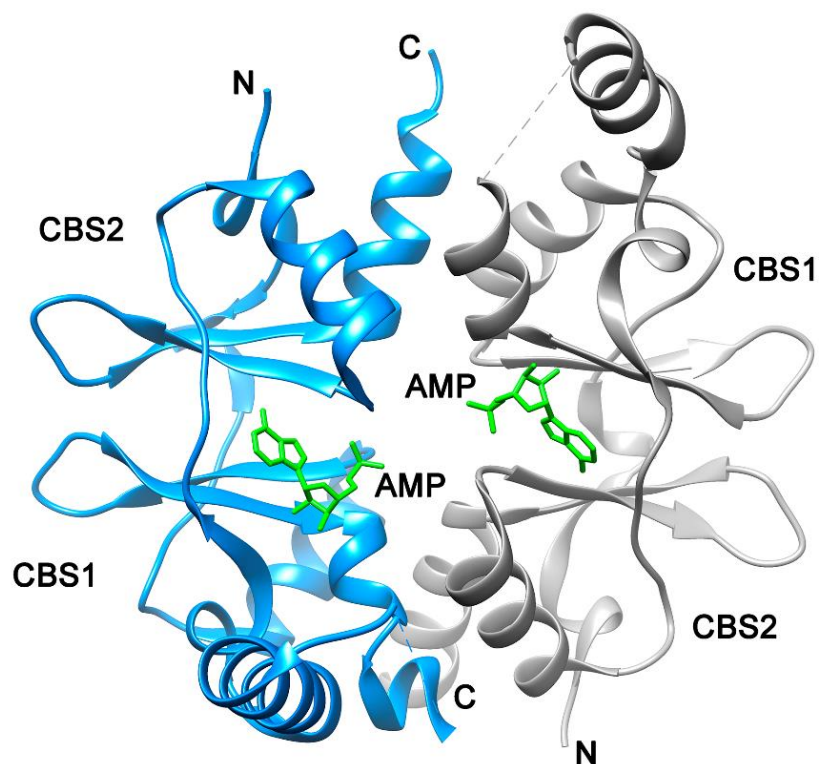


Рис. 19. Структура димера белка atCBSX2 (код PDB: 4GQY), образованного по типу голова-к-хвосту без петли 135–158 (показана пунктиром). Субъединицы окрашены в голубой и серый цвета, связанный AMP — в зеленый.

Два белка CBSX локализованы в хлоропластах, третий — в митохондриях, четвертый — в цитоплазме, а пятый и шестой — в эндоплазматическом ретикулуме [49]. Все они регулируют окислительно-восстановительный потенциал (гомеостаз) клетки через системы небольших белков тиоредоксинов (Trx), также шести типов [50]. Экспрессия белков CBSX увеличивается при окислительном стрессе. Они образуют функциональные гомодимеры, которые связывают AMP в центре S1 по молекуле на субъединицу. При этом немного изменяется структура белков: в свободном состоянии гомодимер деформирован (изогнут), но при связывании AMP он формирует диск-подобную структуру [15]. В таком состоянии они способны взаимодействовать

с белками Trx и активировать их. Последние в свою очередь, влияют на цикл Кальвина и разложение перекиси водорода (в хлоропластах) и клеточное дыхание (в митохондриях).

2.7. CBS-PPаза

PPаза является конститутивным ферментом, присутствующим в клетках всех организмов. Гидролизую пирофосфат, фермент сдвигает равновесие многих клеточных процессов, образующих пирофосфат как побочный продукт, в сторону продуктов (биополимеров, таких как ДНК, РНК, белки, сахара и других) [51]. Известны три негомологичных семейства растворимых PPаз — I, II и III [1]. Из них для нас интересно семейство II, потому что часть его представителей содержат в своей структуре CBS-домены. Поэтому интересно сравнить CBS-PPазы семейства II с их каноническими гомологами, в которых CBS-доменов нет.

2.7.1. Канонические PPазы семейства II

Эти ферменты относятся к семейству ДНН-гидролаз, названному по консервативному мотиву Asp-His-His. Мутация любой аминокислоты в данном мотиве приводит к практически полной потере ферментативной активности.

Структурно PPазы семейства II являются двудоменными белками (рис. 20А). Оба домена являются каталитическими, поскольку активный центр формируется на их границе и соединены гибким линкером, благодаря чему они могут двигаться друг относительно друга в процессе катализа. Интересно, что большинство бактерий, содержащих PPазы семейства II, являются патогенными.

Пирофосфатазы являются металлозависимыми ферментами, причём металлы нужны прежде всего для катализа [52]. Так, остатки His9, His97, Asp13, Asp15, Asp75 и Asp149 (нумерация по PPазе *Bacillus subtilis* (Bs-PPазе)) образуют центры M1 и M2 связывания ионов переходных металлов [53], в частности Mn^{2+} или Co^{2+} , в первом ДНН-домене (рис. 21). Для катализа необходимы ещё два иона Mg^{2+} в центрах M3 и M4. Три из этих ионов металла образуют уникальную структуру для активации связанной с ней нуклеофильной молекулы воды. Эта структура появляется только после связывания субстрата, поэтому атакующий нуклеофил (OH^-) генерируется непосредственно перед актом гидролиза.

Второй домен (ДННА2) функционирует как «крышка» [54], образуя закрытую конформацию со связанным пирофосфатом. Мутации или делеция последней α -спирали в домене ДННА2, которая содержит консервативный мотив SRKKQxxP (x — остатки гидрофобных аминокислот), отвечающий за взаимодействие с фосфатной группой P2 пирофосфата (рис. 21),

приводит к полной потере активности РРазы, хотя олигомерная структура (димер) сохраняется [55, 56].

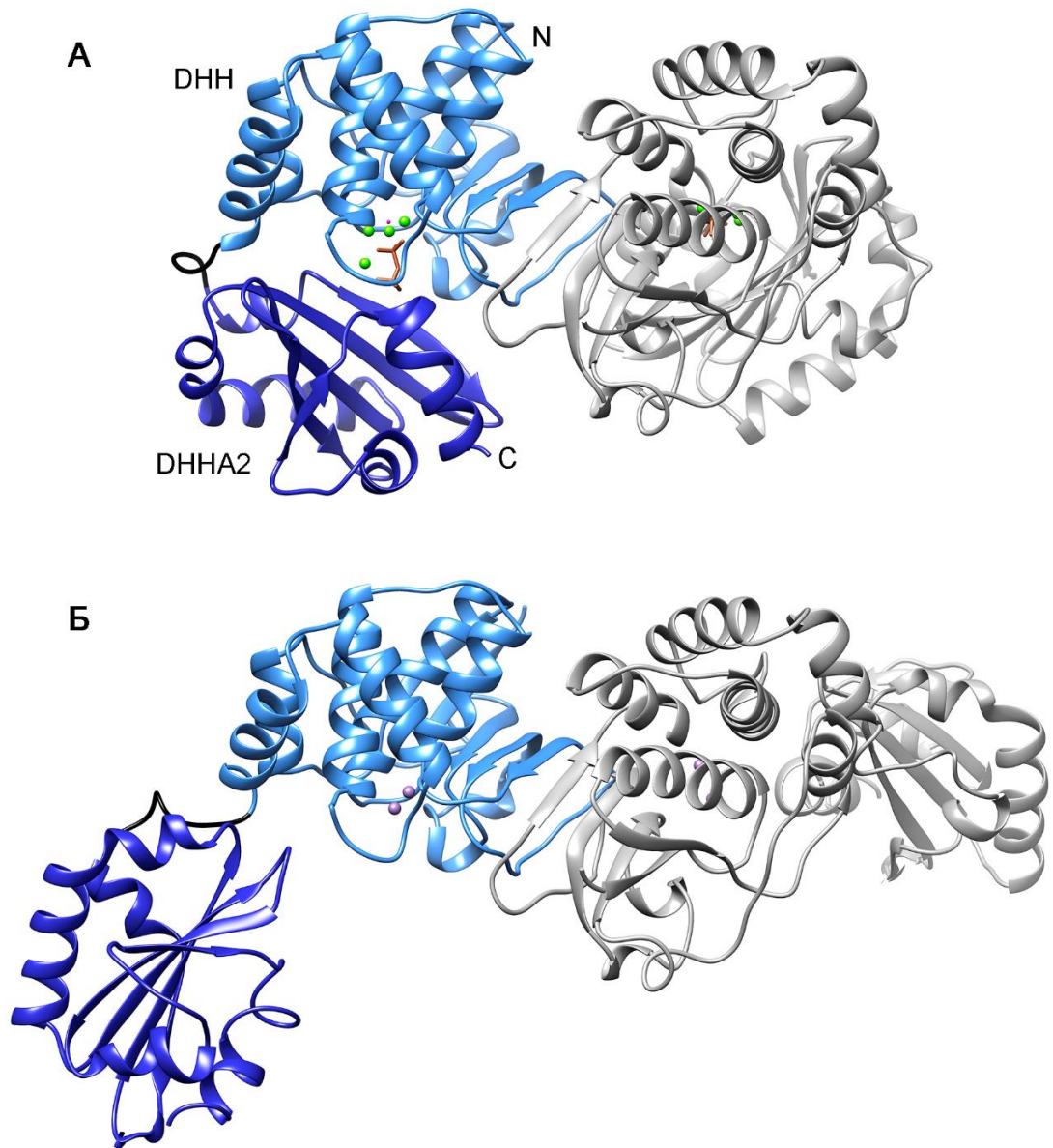


Рис. 20. Структура димера Bs-PPазы семейства II. (А) Закрытая конформация со связанным аналогом субстрата (PNP, окрашен в коричневый цвет), четырьмя ионами Mg^{2+} (окрашены в зеленый цвет) и ионом F^- (окрашен в розовый) вместо атакующей молекулы воды (код PDB: 2HAW). Домены DHH и DHNA2 одной субъединицы окрашены в голубой и синий цвета соответственно. Вторая субъединица окрашена в серый цвет. (Б) Открытая конформация в отсутствие субстрата (код PDB: 1K23). Обозначения и окрашивание доменов такие же, ионы Mn^{2+} окрашены в лиловый цвет.

Структура из трех ионов металла в DHH-домене выполняет несколько функций. Во-первых, ионы металла формируют и координируют атакующий нуклеофил (гидроксид-ион). Во-вторых, ионы металла экранируют отрицательный заряд кислородов фосфатной группы P1

пирофосфата, уменьшая отталкивание атакующего иона OH^- . В-третьих, взаимодействие с ионами металла обеспечивает искажение структуры субстрата, приближая ее к структуре переходного состояния. Потребность в ионе переходного металла объясняется тем, что в процессе катализа ион металла должен изменить свое координационное число с 6 до 5 [53], а с ионами Mg^{2+} это невозможно. Поэтому катализ в присутствии только ионов магния протекает очень медленно [52].

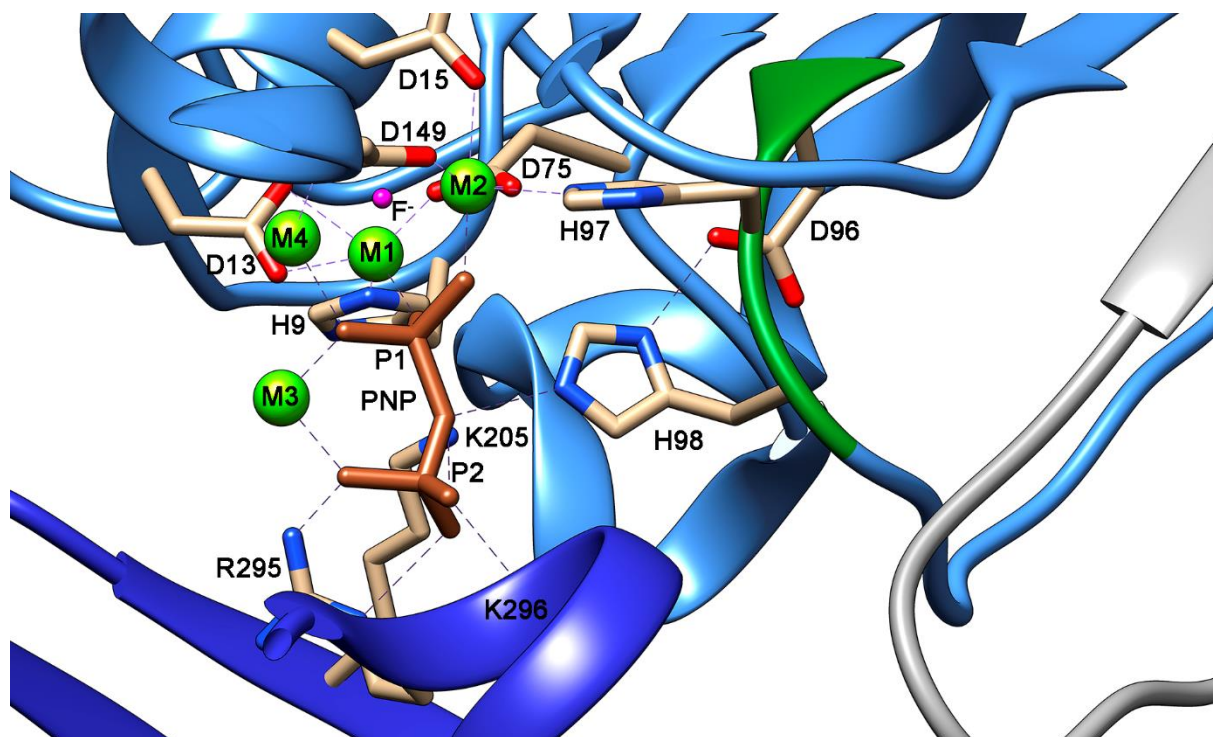


Рис. 21. Активный центр V8-PPазы. Обозначения и окрашивание доменов аналогично рис. 20А. Показаны каталитически важные аминокислотные остатки, консервативный мотив DHH окрашен в темно-зеленый цвет.

Кроме того, в реакции принимает участие протонированный аминокислотный остаток His98 мотива DHH. Он координирует мостиковый атом кислорода в пирофосфате, что также стабилизирует переходное состояние. Стоит отметить, что помимо упомянутого His98, два других остатка этого мотива также нужны для катализа: His97 участвует в связывании металла в центре M2, а Asp96 поляризует His98. Все эти факторы позволяют осуществлять реакцию нуклеофильного замещения, протекающую по $\text{S}_{\text{N}}2$ -механизму, а His98 обеспечивает общий кислотный катализ, протонируя уходящую фосфатную группу P2. В центрах M1 и M2 металлы связаны постоянно (рис. 20Б), а в центр M3 ион металла приходит в составе субстрата (MgPP_i), и наконец центр M4 заполняется из среды. Из последних двух центров, ионы металла уходят в виде комплексов MgPP_i , освобождая активный центр для нового каталитического акта.

Протекание реакции по вышеуказанному механизму предполагает несколько возможностей её ингибирования: заменой атакующего нуклеофила на изоэлектронный ион фтора [57], заменой иона металла на неактивный Zn^{2+} , Ca^{2+} [52, 58], заменой субстрата на его негидролизуемый аналог имидодифосфат (PNP) [59]. При этом другой аналог — метилендифосфонат (PCP), в котором мостиковый кислород заменен углеродом, не эффективен поскольку у него нет свободной электронной пары для взаимодействия с протоном His98.

2.7.2. CBS-PPаза

Кристаллическая структура полноразмерной CBS-PPазы неизвестна, однако, судя по сходству аминокислотных последовательностей каталитических доменов CBS-PPаз и канонических PPаз семейства II, их третичные структуры также должны быть похожи. Активный центр, по-видимому, также сформирован на границе двух каталитических доменов (ДНН и ДННА2) — CBS-PPаза содержит все консервативные заряженные аминокислотные остатки активного центра, найденные в канонических PPазах семейства II. Принципиальное различие состоит в том, что в ДНН-домен CBS-PPазы через одну из петель вставлена регуляторная часть, состоящая в подавляющем большинстве случаев из двух CBS и одного DRTGG-доменов (рис. 22). Приблизительно 10% CBS-PPаз содержат лишь два CBS-домена и не имеют DRTGG-домена. Два CBS-домена образуют межсубъединичные контакты в кристаллической структуре димера регуляторной части CBS-PPазы и формируют диск-подобную структуру [12] (рис. 22В,Г). Наличие DRTGG-домена между двумя CBS-доменами является уникальным для CBS-белков. В некоторых CBS-белках, описанных выше, присутствуют небольшие вставки (петля или спираль из 10-20 остатков) между CBS-доменами, но не целый домен размером в 120 остатков как в CBS-PPазе. DRTGG-домен не нарушает диск-подобную структуру CBS-модуля и также участвует в образовании межсубъединичных контактов. Можно отметить, что DRTGG-домен встречается и в белках, не содержащих CBS-домены. В качестве примера можно привести недавно охарактеризованную фосфотрансацетилазу класса II из *Phytophthora ramorum* (патоген растений, вызывающий заболевание «внезапная смерть дуба») [60].

Максимальную активность CBS-PPазы проявляют со связанными ионами кобальта, а не марганца, как это характерно для канонических PPаз семейства II. Наиболее изученными CBS-PPазами являются PPазы из *Clostridium perfringens* (Ср-PPаза) и *Moorella thermoacetica* (Mт-PPаза). До выполнения данной работы было известно, что они могут связывать АМР, АДР, АТР, причем АМР и АДР ингибируют фермент, а АТР активирует [61]; кроме того для Ср-PPазы также была показана активация под действием Ar_nA с $n > 2$ [62]. Для Mт-PPазы был проведен мутагенез CBS-доменов в области связывания лигандов, некоторые из которых активировали ее, а неко-

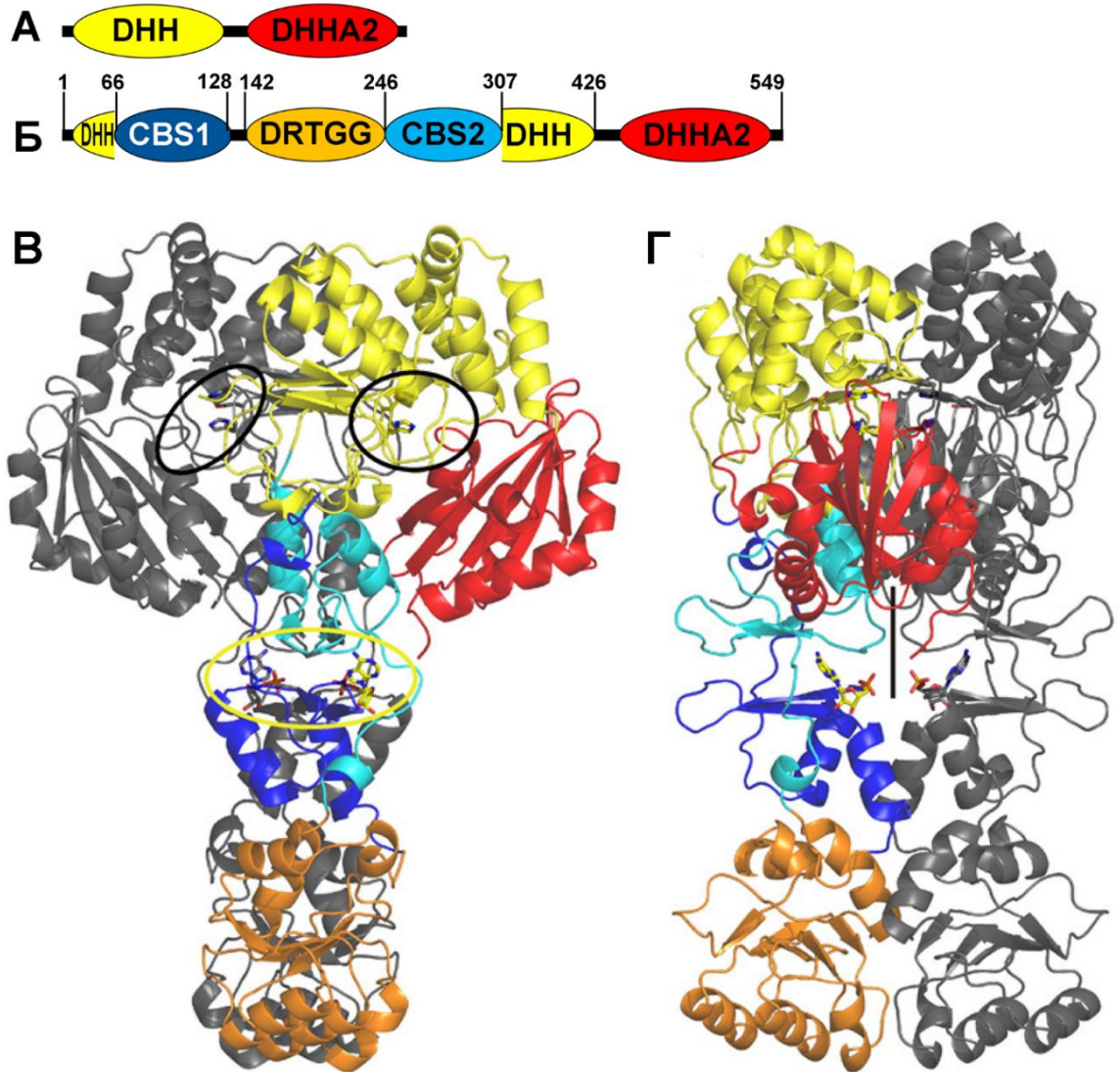


Рис. 22. Структура CBS-PPазы. (А) Топология доменов канонической РРазы семейства II. (Б) Топология типичной CBS-PPазы. Нумерация остатков относится к CBS-PPазе *S. perfringens* (Ср-PPазе). (В) и (Г) Две проекции предполагаемой трехмерной структуры димера CBS-PPазы в комплексе с АМР [12], «составленной» из известных структур канонической РРазы семейства II (код PDB: 2HAW) и регуляторных доменов Ср-PPазы (код PDB: 3L31). Окрашивание доменов аналогично Б, вторая субъединица окрашена в темно-серый цвет. Активные центры и центры связывания лигандов отмечены черными и желтым овалами.

торые даже изменяли эффект лиганда (из ингибирования в активацию) [63]. В этом отношении CBS-PPаза похожа на цистатионин- β -синтазу [18] и АМР-активируемую протеинкиназу [27, 64]. Для Ср-PPазы методом остановленной струи было показано, что связывание флуоресцентного аналога АМР происходит в две стадии [62], тогда как Мт-PPаза связывает этот лиганд в три стадии и значительно медленнее [65]. Было показано также, что ингибитор (АМР) повышает термическую устойчивость CBS-PPазы, в то время как активатор (Ар₄А) понижает [12].

Интересно, что в некоторых бактериях (например, *Clostridium novyi*, *Desulfotobacterium hafniense*, *Eggerthella lenta*) PP_i утилизируется одновременно присутствующими растворимой CBS-PPазой и мембраносвязанной PPазой [66]. В этом случае проблема регуляции растворимого фермента стоит ещё острее, поскольку в таких бактериях энергия пиррофосфата может быть направлена на перенос ионов H^+ и Na^+ через мембрану.

2.8. CBS-белки: Заключение

CBS-домены распространены во всех живых царствах, входят в состав как растворимых, так и мембранных белков, могут образовывать различные пространственные структуры, способны связывать различные типы лигандов. И интересно, что всё это возможно благодаря простому структурному мотиву — $\beta\alpha\beta\alpha$. Возникает несколько вопросов: (1) почему CBS-домены связывают в большинстве своем адениновые производные, а не гуаниновые или другие? (2) почему некоторые белки связывают две молекулы лиганда на димер CBS-доменов, а другие только одну? (3) почему одни белки могут связывать только простые адениновые производные — AMP, ADP, ATP, а другие более сложные — SAM, NAD^+ ?

CBS-домены работают только в парах, поскольку центры связывания образуются в интерфейсе двух CBS-доменов. Такой способ организации подразумевает наличие двух центров связывания на два CBS-домена ввиду существования оси симметрии второго порядка. За связывание отвечают сразу несколько элементов вторичной структуры CBS-доменов: для центра S1 — линкер между $\alpha 0'$ -спиралью и $\beta 1'$ -тяжом, $\beta 2'$ - и $\beta 3'$ -тяжи и первые два остатка $\alpha 2'$ -спирали; для симметричного центра S2 — линкер между $\alpha 0'$ -спиралью и $\beta 1'$ -тяжом, $\beta 2'$, $\beta 3'$ -тяжи и первые два остатка $\alpha 2'$ -спирали (рис. 1Б и 23) (нумерация центра связывания идет от номера CBS-домена, в котором связывается сахаро-фосфатный остов лиганда).

Для ответа на первый вопрос рассмотрим линкер перед $\beta 1'$ -тяжем (рис. 23 и 24). Для связывания и правильного расположения аденинового основания этот линкер должен быть закреплен с двух сторон: с одной стороны, через $\alpha 0'$ -спираль, которая может взаимодействовать с $\beta 2'$, $\beta 3'$ -тяжами и $\alpha 1'$ -спиралью CBS2-домена, с другой — через $\beta 1'$ -тяж, взаимодействующий с $\beta 2'$ -тяжем CBS1-домена). Далее, линкер содержит три аминокислотных остатка, обеспечивающих связывание именно адениновой группы. Остаток Thr/Ser или Arg/Lys в некоторых белках взаимодействует с гидроксильными группами кольца рибозы (желтый квадрат); второй остаток любой аминокислоты создает препятствие за счет карбонильного кислорода основной цепи рядом с атомом C2 кольца аденина (красный круг) для связывания NH_2 -группы гуаниновых производных; третий остаток, чаще всего остаток гидрофобной аминокислоты, образует водородную связь карбонильным кислородом с N6-экзоциклической аминогруппой и (или) с N7-

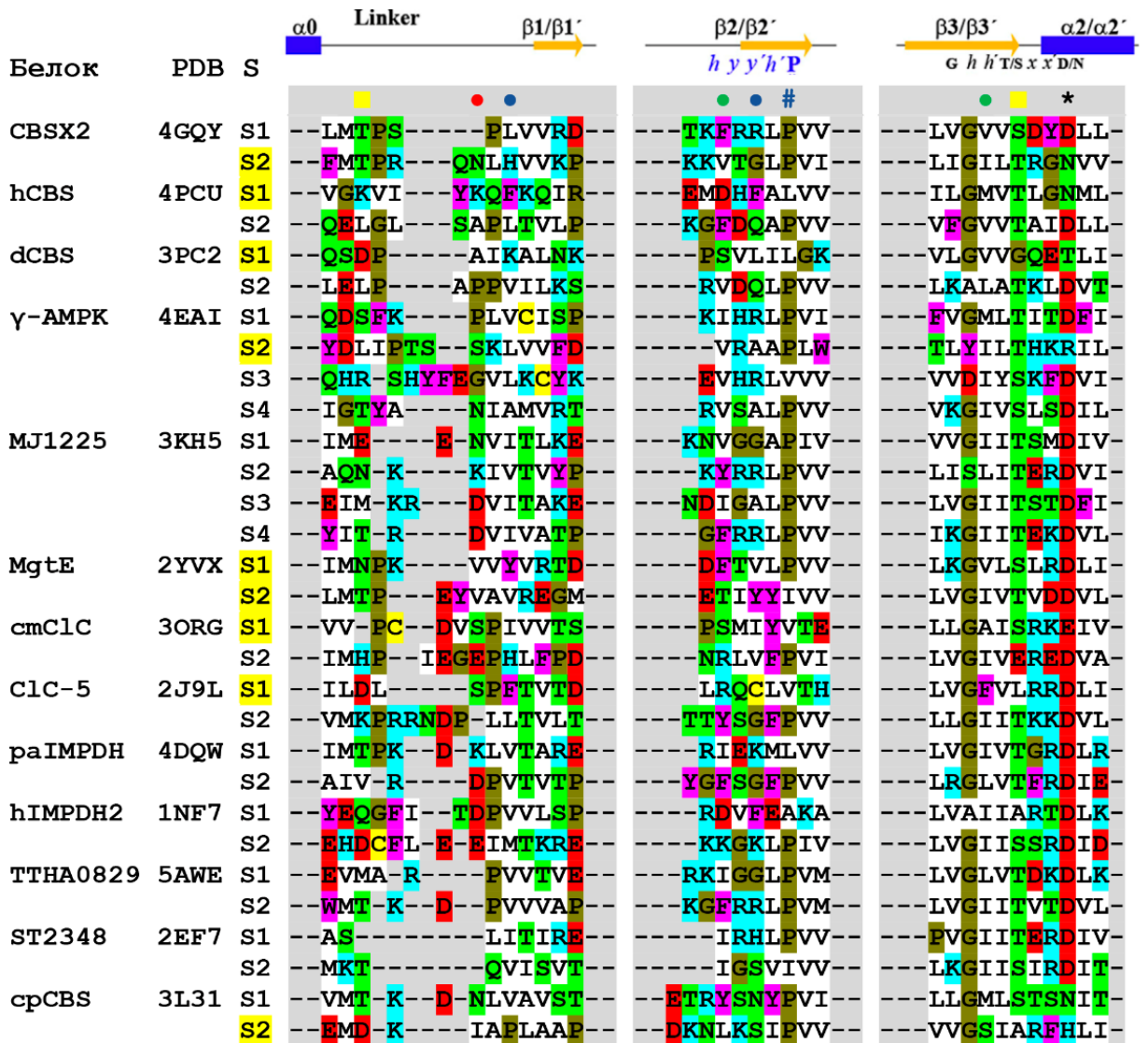


Рис. 23. Выравнивание последовательностей CBS-доменов в трех участках, образующих полость связывания в центрах S1 и S2 (а также, при наличии, S3 и S4): (а) линкере между $\alpha 0$ -спиралью и $\beta 1$ -тяжем, (б) короткой петле между $\alpha 1$ -спиралью и $\beta 2$ -тяжем и самим $\beta 2$ -тяжем; (в) $\beta 3'$ -тяже соседнего CBS-домена и первых двух остатков $\alpha 2'$ -спирали. Центры связывания расположены симметрично на противоположном участке модуля Бейтмана. Название белка, код структуры PDB и центр связывания указаны слева. В столбце с номерами центров связывания (S) желтым отмечены центры, в которых необходимая для связывания адениновых лигандов структура нарушена. Консервативный мотив h-y-y'-h'-P (h — остаток гидрофобной аминокислоты, y — остаток любой аминокислоты, P — пролин) во втором блоке способствует связыванию производных аденозина и предотвращает связывание производных гуанозина. Третий блок содержит AMP-связывающий мотив G-h-h'-T/S-x-x'-D/N (h — остаток гидрофобной аминокислоты, x — остаток любой аминокислоты), консервативный остаток аспарагиновой кислоты (помечен звездочкой) которого взаимодействует с 2'- и (или) 3'-гидроксильными группами рибозы. Выравнивание проводили в программе ClustalX (версия 2.1), представление выполнено в программе CINEMA

аминогруппой аденина (синий круг). Второй блок остатков, отвечающий за связывание адениновых производных находится в петле между $\alpha 1$ -спиралью и $\beta 2$ -тяжем (рис. 23 и 24) и содержит консервативный мотив h-y-y'-h'-P, включающий остаток гидрофобной аминокислоты,

вступающий в гидрофобное взаимодействие с кольцом аденина (h, зеленый круг) и остаток любой аминокислоты, карбонильным кислородом которой образует водородную связь с N6-экзоциклической аминогруппой и с N7-аминогруппой (y', синий круг).

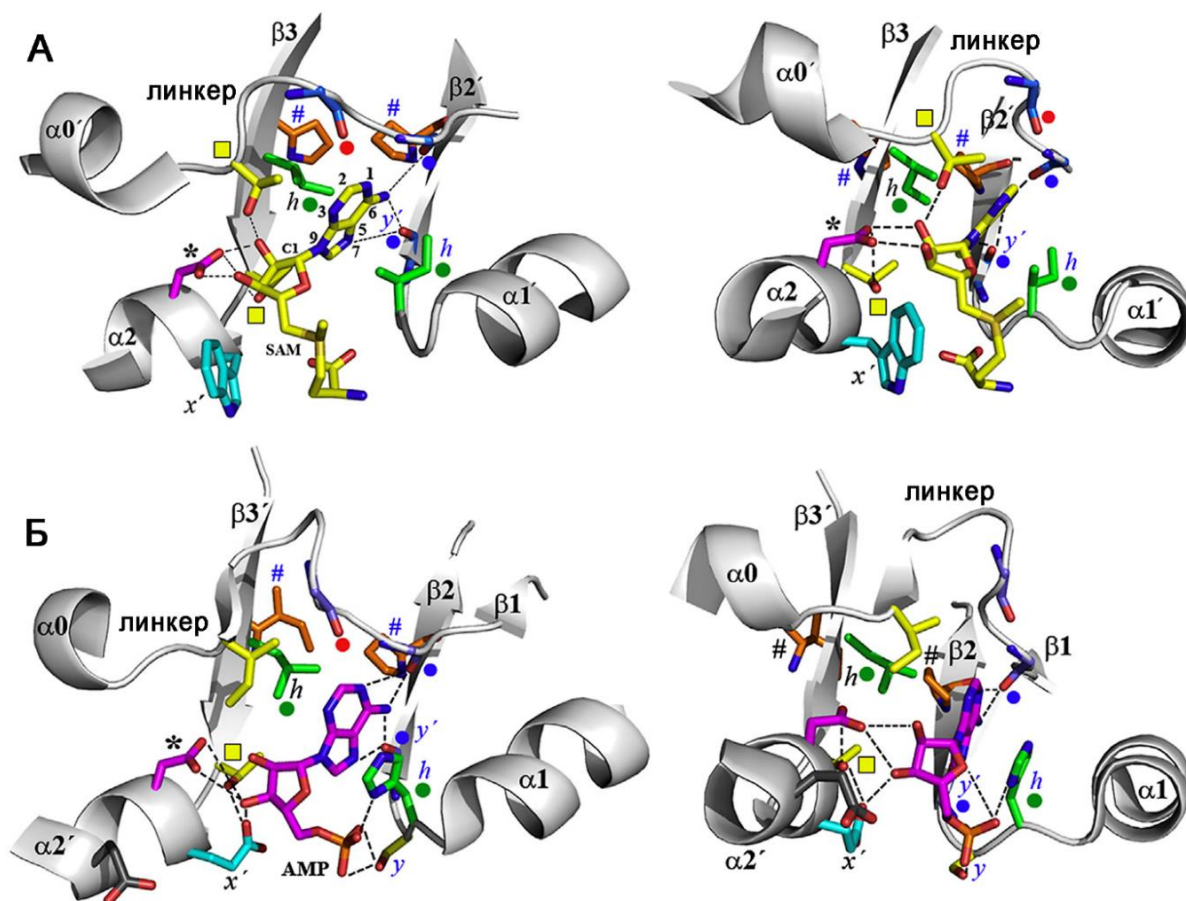


Рис. 24. Структура канонических центров связывания производных аденина в модуле Беймана [5]. (А) Два вида на центр связывания S1 модуля Беймана в белке MJ0100с (код PDB: 3KPC). Консервативный остаток треонина линкера, который, как правило, взаимодействует с 2'-гидроксильной группой рибозы, помечен желтым квадратом. Карбонильный атом кислорода, стерически предотвращающий связывание гуанозильной аминогруппы, помечен красным кругом. Гидрофобные остатки (h), взаимодействующие с адениновым кольцом, помечены зелеными кругами. Два карбонильных атома кислорода, связывающие производные аденина, помечены синими кругами. Физико-химические свойства остатка x', предшествующего консервативной аспарагиновой кислоте (отмечена звездочкой), имеют решающее значение в связывании определенного типа производных аденина, а также непосредственно влияют на конформацию лиганда. (Б) Два вида на центр связывания S2 модуля Беймана в белке CorC (код PDB: 4HG0). Окрашивание аналогично А. Отсутствие консервативного треонина в линкере (заменен на изолейцин — окрашен желтым цветом), отрицательно заряженный остаток x' вместе с серином (y) перед гидрофобным остатком мотива h-y-y'-h'-P или наличие объемистого гидрофобного остатка (h, отмечен зеленым кругом) в $\beta 3'$ -тяже могут вызвать вращение кольца рибозы вокруг гликозидной связи (C1'-N9) и индуцировать альтернативные способы связывания.

Данная схема связывания работает для большинства рассмотренных белков, кроме эукариотической (но не прокариотической) IMPDH, которая может связывать

гуаноинолигофосфаты. Дело здесь, как уже упоминалось в главе 2.3, в следующем: во-первых, более длинный линкер между $\alpha 0$ -спиралью и $\beta 1$ -тяжем обеспечивает большую гибкость и, как следствие, возможность разместить аминокислоту вблизи первого блока остатков; кроме того, во втором блоке остатков в центре S2 гидрофобная аминокислота прокариотического фермента заменена на лизин (рис. 25Б, K208), а глутаминовая кислота на глицин (рис. 25Б, G209), что обеспечивает стабилизацию фосфатных групп (рис. 25Б,В). В сумме это позволяет связаться производному гуанозина в центрах S1 и S2, хотя и в другой конформации, нежели производные аденозина. Судя по последовательности (рис. 23), центр S1 в IMPDH2 человека вырожден. Кроме того, у IMPDH есть ещё неканонический центр связывания производного гуанозина — в гидрофобной полости, образованной $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -спиралями CBS2-домена и входящей и выходящей петлями между каталитическим доменом и CBS-доменами (рис. 25А,Г). В данном случае неканонический центр также образован с участием элементов структуры, не входящих в CBS-домены.

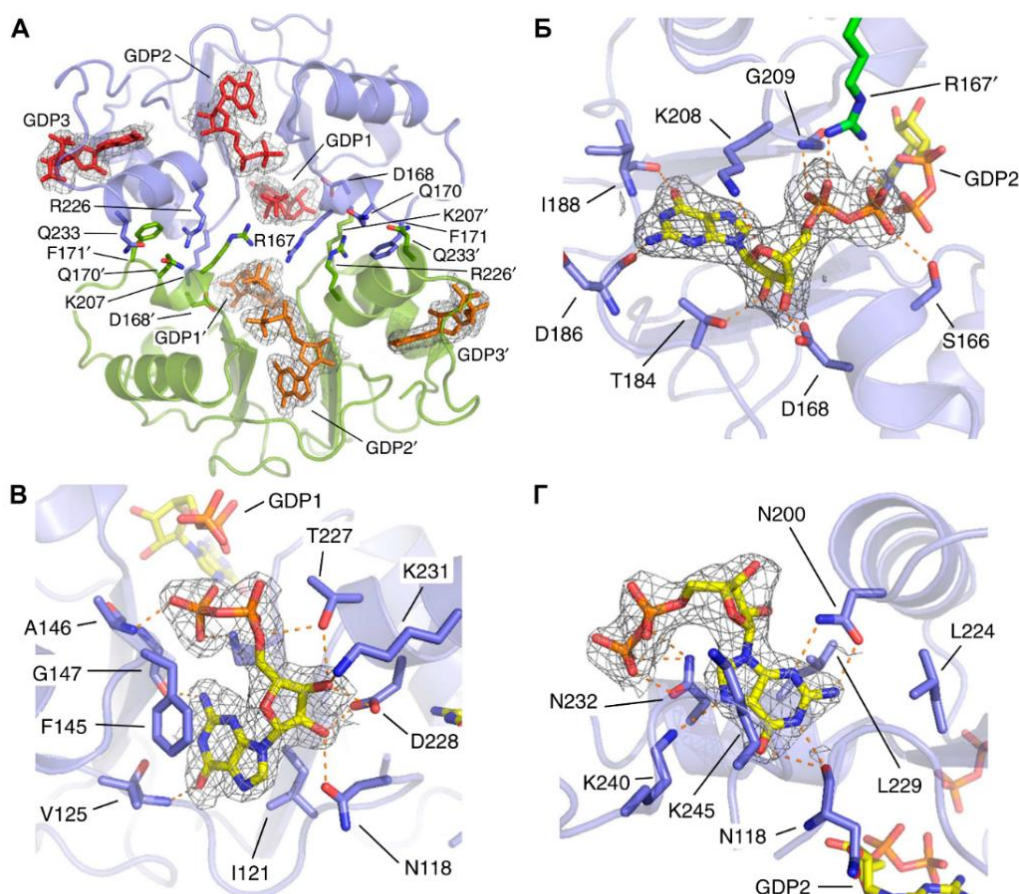


Рис. 25. Структура регуляторной вставки agIMPDH со связанным GDP [35]. (А) Общий вид. Субъединицы димера окрашены в синий и зеленый цвета, молекулы GDP — в красный и оранжевый цвета для разных субъединиц. (Б)–(Г) Детальный вид на канонические центры S1 (Б) и S2 (В) и неканонический центр (Г). Для GDP дополнительно показана электронная плотность.

Ещё одним исключением можно считать MgtE — этот белок не связывает какие-либо нуклеотиды из-за наличия сильно электроотрицательных областей в CBS-доменах (рис. 14Г). Так, во втором блоке присутствуют аспарагиновая и глутаминовая кислоты (при сохранении гидрофобной полости), в третьем блоке есть дополнительная аспарагиновая кислота перед консервативной аспарагиновой кислотой центра S2 и видны некоторые замены вне канонических центров связывания S1 и S2. Благодаря этому белок хорошо связывает катионы (в частности ион магния), но не связывает нуклеотиды, имеющие как положительно, так и отрицательно заряженные группы.

Причина разной стехиометрии связывания лигандов разными CBS-модулями кроется в третьем блоке остатков. Он образован $\beta 3'$ -тяжем и первыми двумя остатками $\alpha 2'$ -спирали (рис. 23 и 24) и содержит мотив G-h-h'-T/S-x-x'-D/N, похожий на так называемый рибозо-фосфат-связывающий G-h-x-T/S-x-T/S-D. Остаток аспарагиновой кислоты образует водородные связи с 2'- и/или 3'-гидроксильными группами рибозы. Потеря двух любых консервативных аминокислот в этом мотиве ухудшает связывание лиганда в соответствующем центре и изменяет общую стехиометрию связывания.

В центре S2 γ -АМПК, имеющей в своем составе четыре CBS-домена, консервативный остаток глицина в третьем блоке заменен на тирозин, а аспартат на аргинин (рис. 23, γ -АМПК S2). CBSX2, hCBS, dCBS, ClC-5 (cmClC) связывают лиганды лишь в одном центре (S1 в CBSX2 и S2 в остальных белках) по причине замен во втором и третьем блоках. Так консервативный пролин и гидрофобный остаток h второго блока заменены другой гидрофобной или заряженной аминокислотой. Кроме этого, в dCBS имеется замена консервативного аспартата в третьем блоке на треонин.

Ответ на третий вопрос (о природе специфичности) можно найти в строении третьего блока. Остаток х' перед остатком аспарагиновой кислоты (*) в рибозо-фосфат-связывающем мотиве может обеспечить селективный выбор производных аденина (фосфатные или нефосфатные) (рис. 24). Например, если остаток заряжен отрицательно или он большой и гидрофобный, то центр будет связывать нефосфатное производное. Так в hCBS перед консервативными остатком аспартата в центре S2 находится изолейцин, а в dCBS лейцин, поэтому оба белка связывают SAM. В CBSX2 перед аспартатом расположен глицин, а в IMPDH аргинин, что способствует связыванию фосфатных производных. Кроме этого, на конформацию связанного лиганда влияют второй (а именно, петля между $\alpha 1$ -спиралью и $\beta 2$ -тяжем) и третий блоки центра связывания.

В CBS-PPазе (рис. 23, cpCBS) первый блок центра S1 содержит Thr (■), Asn (●) и Val (●). Вторым блоком представлен Tyr (●) и Asn (●) из RYSN-мотива центра S1, а вот модификация первого и второго блоков в центре S2 CBS1-домена приводит к потере возможности связывания

в этом центре. В частности, в центре S2 мотив RYSN, отвечающий за связывание аденинового основания, отсутствует. Это касается и третьих блоков: присутствие аспарагина вместо аспартата (*) в третьем блоке в центре S1 CBS1-домена допустимо, а вот замена консервативных остатков треонина и аспартата на аланин и гистидин является фатальной для связывания в центре S2 Ср-РРазы. Наличие остатка серина перед консервативным остатком аспарагина (*) определяет природу лиганда - фосфатные производные аденозина. Ещё одной особенностью CBS-РРазы является наличие остатка лизина (K100) на месте RYSN-мотива в центре S2, который по кристаллографическим данным координирует фосфатную группу AMP (или мостика в случае Ар₄A).

В заключение следует отметить, что кроме регуляторной функции CBS-домены имеют и структурную — помимо различных димерных структур, CBS-домены способны образовывать и тетрамерные (димеры димеров) структуры. Прямое участие CBS-доменов в образовании тетрамерных структур или структур более высокого порядка было показано для hCBS и IMPDH. Белок ТТНА0829 (предполагаемая ацетондегидрогеназа) из *T. thermophilus* [11], имеющий на N-конце тандем двух CBS-доменов (модуль Бейтмана), образует тетрамер за счет двух типов контактов CBS-доменов (рис. 26). Первый тип — это образование диск-подобной структуры из CBS2-доменов по типу голова-к-голове в димере, а второй — взаимодействие CBS1-доменов соседних димеров. Такой способ тетрамеризации стал возможным, благодаря дополнительной α -спирале и петле между CBS-доменами. Кроме этого, CBS1-домены внутри димера раздвинуты. Подобное наблюдается и у регуляторной вставки MgtE, только там CBS2-домены раздвинуты при низкой концентрации ионов магния.

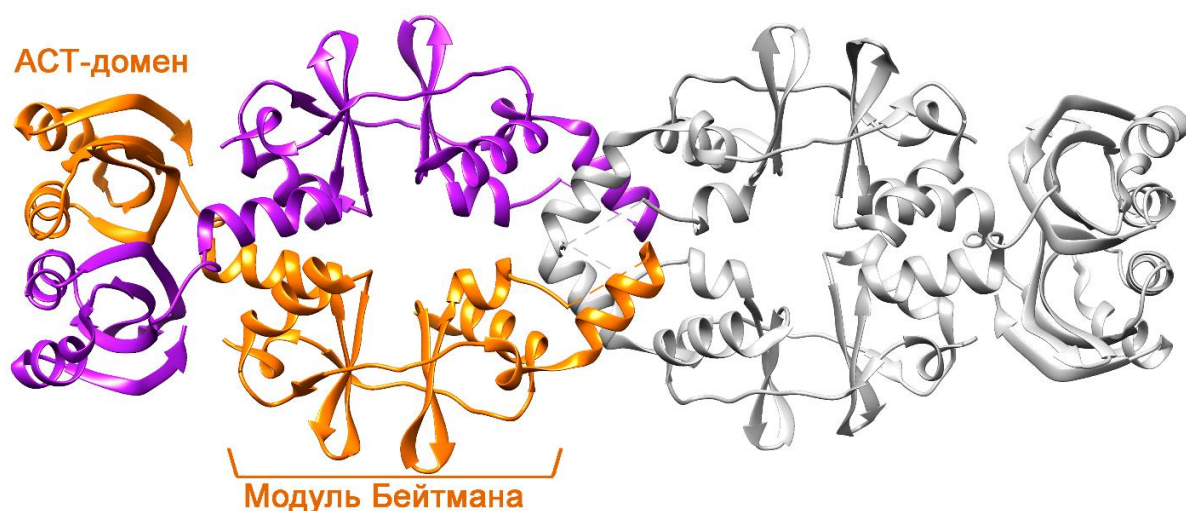


Рис. 26. Структура тетрамера белка ТТНА0829 (код PDB: 5AWE). Субъединицы одного димера окрашены в оранжевый и фиолетовый цвета, другого — в серый. Обозначены домены АСТ и пара CBS (модуль Бейтмана).

Но ещё лучше это видно на структуре белка ST2348 из *Sulfolobus tokodaii*, приведенной на рис. 27. Белок состоит только из двух CBS-доменов и также образует тетрамер (димер димеров, образованных по типу голова-к-голове), в котором также присутствует две группы контактов: первая — между CBS1-доменами в димере А–Б (или В–Г), и вторая - между CBS2-доменами в димере Б–В (или А–Г). При этом, образуется центральная пора размером 12 x 41 Å. В ST2348 нет никаких дополнительных элементов, а тетрамер образуется за счёт взаимодействия N- и C-концевых участков CBS-доменов (спирали $\alpha 1$, $\alpha 5$, $\alpha 6$), которые содержат в себе 15 заряженных аминокислотных остатков (Arg, Lys, Asp, Glu). Последние, кроме того, формируют области отрицательного заряда за счёт остатков Asp и Glu. Здесь снова можно провести параллель с MgtE, в котором CBS2-домены образуют контакт, а CBS1-домены разведены друг от друга и имеют сильно отрицательный заряд.

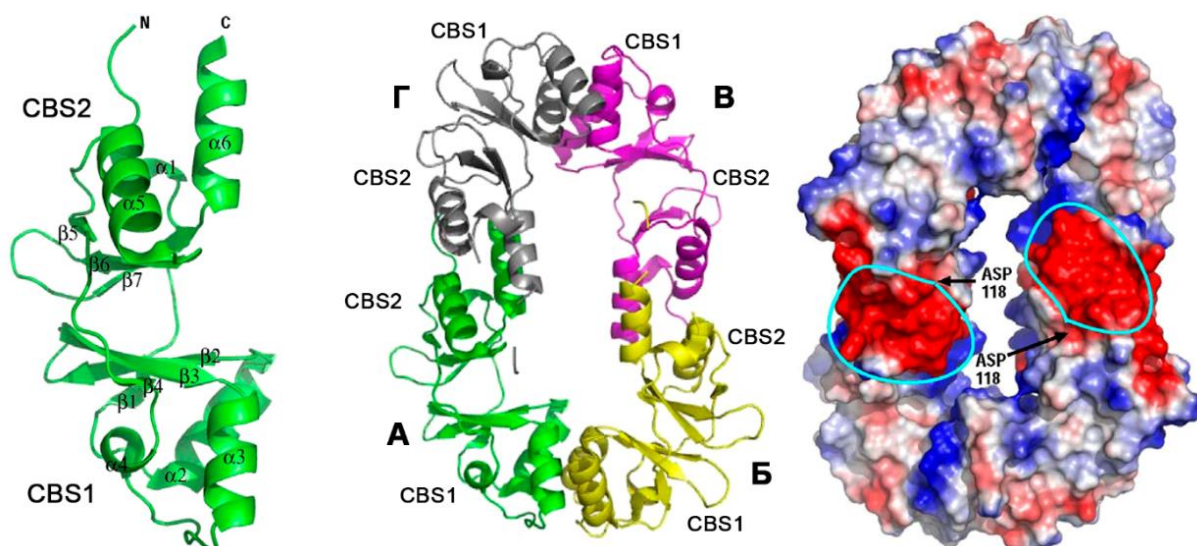


Рис. 27. Структура белка ST2348 [67] (код PDB: 2EF7). Слева: структура субъединицы белка; обозначены домены и элементы вторичной структуры. В центре: тетрамер ST2348; субъединицы обозначены и окрашены в различные цвета, также указаны CBS-домены. Справа: электростатическая поверхность тетрамера, электроотрицательные области окрашены в красный цвет, электроположительные — в синий, не заряженные или гидрофобные — в белый. Выделена электроотрицательная область на границе димеров и указано расположение консервативного остатка аспарагиновой кислоты мотива G-h-h'-T/S-x-x'-D/N.

Если предсказывать лиганды для ТТНА0829 или ST2348, то в обоих центрах это, скорее всего, будут фосфатные производные аденина, поскольку эти белки имеют (с некоторыми оговорками) в трех блоках все консервативные остатки, необходимые для такого связывания (рис. 23).

Можно отметить, что представленный список лигандов для CBS-доменов может быть неполным. Существуют данные о том, что белок MJ0729 *M. jannaschii* может связывать

двухцепочечную ДНК [68] с константой диссоциации порядка 10 мкМ, а для IMPDH *E. coli*, *T. foetus* и человека показано связывание одноцепочечной ДНК [69] (около 100 нуклеотидов на тетрамер, а после удаления CBS-доменов — 60) с наномолярным сродством. Эти данные позволяют предположить более широкие функции CBS-доменов.

Подводя итог, следует отметить, что несмотря на то, что с момента открытия CBS-белков прошло почти 20 лет, механизм передачи информации от CBS-доменов в активные центры ферментов и переносчиков остается в значительной степени неизвестным. Отчасти это связано с трудностью кристаллизации полноразмерных CBS-белков. Это усугубляется необходимостью получения кристаллов как свободного белка, так и его комплекса с лигандами, поскольку нужную информацию можно получить только сравнивая структуры с лигандом и без него. Очень мало изучены также особенности связывания лигандов и их функциональные последствия.

3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1. Материалы

В работе были использованы следующие реактивы: Трис, TES, MOPS, HEPES, Triton X-305, AMP, ADP, ATP, Ap₃A, Ap₄A, Ap₅A, ампициллин, канамицин, хлорамфеникол фирмы “Sigma” (США); Ap₆A фирмы “Jena Bioscience” (Германия); изопропил-1-тио-β-D-галактопиранозид (ИПТГ), ЭГТА, ЭДТА, краситель метиловый зелёный, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (TEMED), персульфат аммония (APS), додецилсульфат натрия (SDS), пирофосфат натрия, ортофосфорная кислота, акриламид, бисакриламид, агароза, ДТТ фирмы “Fluka” (Швейцария); хлорид магния (MgCl₂·6H₂O), молибдат аммония ((NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O) фирмы “Fisher Scientific” (США); β-меркаптоэтанол, бактоагар фирмы “Ferak” (Германия); бактотриптон, дрожжевой экстракт фирмы “Difco” (США). ATP (динатриевая соль) был перекристаллизован из этанола [70]. Остальные реактивы были отечественного производства квалификации не ниже “хч”.

Штаммы *E. coli* (BL21, BL21-DE3-RIL, C43), а также плазмиды с генами бактериальных неорганических пирофосфатаз (pET-28b: Dh-PPаза (и её вариант ΔCDC-Dh-PPаза) и Eh-PPаза; pET-36b: Cp-PPаза; pET-46b: Cn-PPаза и El-PPаза) были любезно предоставлены профессором Р. Лахти (университет г. Турку, Финляндия). Праймеры для сайт-направленного мутагенеза Dh-PPазы (TATACATATGTCAAAAAAAAAATCCATGTCGTAGG, TAATCTCGAGTTATTGAAGGAAATATTTTCGACAAGGG, GTGGATCACAGTGAATTTGGC и GCCAAATTCACCTGTGATCCAC) и Eh-PPазы (TATACATATGAGCCAGACAGTATATGTGACCG, TATGAGCTCTTACGAAAGTGCGCGGG, GTGGATCACAACGAGCGGAC и GTCCGCTCGTTGTGATCCAC) были произведены фирмой «Евроген» (Россия).

Запасные растворы готовили по навескам. Концентрации солей металлов уточняли комплексонометрическим титрованием с использованием металлоиндикатора Эриохром черный Т и дигидрата динатриевой соли ЭДТА в качестве первичного стандарта [71]. Концентрации нуклеотидов уточняли с использованием коэффициента экстинкции при рН 7 и длине волны 259 нм 15900 и 31800 М⁻¹см⁻¹ для мононуклеотидов [72] и динуклеотидов соответственно.

Необходимые значения рН устанавливали прибавлением растворов КОН или НСl. Большинство измерений проводили в цвиттерионных буферных системах (MOPS, TES), поскольку буферы на основе Трис оказывают существенное влияние на каталитические свойства РРазы (увеличивают K_m) [73]. Измерения, в которых использовался Co²⁺, проводили в буфере на основе MOPS, так как TES связывает этот ион металла [74]. Если в системе присутствовал только

Mg²⁺, то в буфер добавляли 0,5 мМ ЭГТА для маскирования ионов переходных металлов и Ca²⁺. Для приготовления всех растворов использовали дважды деионизованную воду с удельным сопротивлением не менее 18 МОм·см.

3.2. Методы

3.2.1. Биоинформатический анализ

Аминокислотные последовательности CBS-PPаз были получены с помощью BLAST-анализа баз данных NCBI [75] и KEGG GENES [76]. Множественное выравнивание последовательностей проводили в программе ClustalX (версия 2.1) с использованием стандартных параметров. Выравнивание было затем уточнено вручную путем удаления неполных и избыточных последовательностей, а также вставок и двусмысленно выровненных остатков.

3.2.2. Сайт-направленный мутагенез

3.2.2.1. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Состав реакционной смеси: 1-2 мкл раствора ДНК матрицы (плазмиды), по 5 мкл прямого и обратного праймеров, 5 мкл смеси всех дезоксирибонуклеотидов, 10 мкл Green HF буфера (x5) для Phusion-полимеразы (ThermoFisher Scientific, США), 0,5 мкл Phusion-полимеразы (ThermoFisher Scientific, США) и H₂O — до 50 мкл. В каждую пробирку добавляли по 50 мкл минерального масла. ПЦР проводили на многоканальном амплификаторе («Терцик», Россия) по следующей программе: денатурация ДНК 30 сек при 98°; 30 циклов денатурации ДНК при 98° 10 с/отжига праймеров при 60° 25 с/достройки цепей при 72° 20 с; достройка цепей при 75° 5 мин.

3.2.2.2. Электрофорез ДНК в агарозном геле

Разделение фрагментов ДНК проводили в 1% агарозном геле в трис-боратном буфере (ТВЕ). Для визуализации ДНК в гель добавляли 3 мкл бромистого этидия (10 мг/мл). Момент окончания электрофореза визуализировали по положению красителя и относительному положению полос ДНК при облучении длинноволновым ультрафиолетовым светом.

После разделения фрагментов ДНК в агарозном геле визуализировали местоположение полосы интересующего фрагмента облучением длинноволновым ультрафиолетовым светом. Вырезали нужный участок геля таким образом, чтобы его длина и ширина были немного больше длины и ширины полосы интересующего фрагмента. Переносили вырезанный фрагмент геля в пробирку и измельчали.

Дальнейшее выделение проводили с использованием набора для выделения ДНК (GeneJET Gel Extraction kit, ThermoFisher Scientific, США). К измельченному гелю добавляли равный объем буфера для связывания и инкубировали смесь при 50–60° в течении 10 мин, перемешивая смесь несколько раз. Затем переносили смесь на колонку и центрифугировали при 14000 g в течении 1 мин, фильтрат удаляли. Добавляли 700 мкл буфера для промывания и снова центрифугировали 14000 g в течении 1 мин, фильтрат удаляли. Повторяли центрифугирование при 14000 g в течении 1 мин, фильтрат удаляли. Заменяли пробирку на чистую, добавляли на колонку 50 мкл буфера для выделения и центрифугировали 14000 g в течении 1 мин. Фильтрат собирали и хранили при -20°.

3.2.2.3. Ферментативная обработка ДНК

Расщепление продуктов ПЦР и вектора (pET-28b) эндонуклеазами рестрикции (NdeI и XhoI для Dh-PPазы, и NdeI и SacI для Eh-PPазы) проводили в буферах, рекомендованных фирмой-производителем (ThermoFisher Scientific, США) при 37° в течении 3 ч. Полноту расщепления определяли при помощи электрофореза.

Лигирование фрагментов ДНК проводили в смеси объемом 20 мкл, содержащей 3 мкл вектора (20 нг), 3 мкл вставки (40 нг), 2 мкл буфера для T4 ДНК-лигазы (10x), 0,3 мкл T4 ДНК-лигазы (ThermoFisher Scientific, США), H₂O — до 20 мкл. Смесь инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Затем инактивировали лигазу нагреванием до 65° и инкубированием в течении 10 мин при этой температуре.

3.2.2.4. Подготовка компетентных клеток и трансформация

Заражали 1,5 мл стерильной среды Лурия-Бертани (LB) одной колонией клеток *E. coli* штамма XL-1 и культивировали 14–16 ч при 37°. Переносили 15 мкл полученной культуры в новую порцию LB среды (1,5 мл) и культивировали при 37° до достижения оптической плотности 0,3–0,4 при 600 нм. Обновленную культуру центрифугировали при 4000 g 4 мин, удаляли надосадочную жидкость и добавляли к осажденным клеткам 500 мкл охлажденного стерильного раствора 100 мМ CaCl₂, ресуспендировали. Снова центрифугировали при 4000 g 4 мин, удаляли

надосадочную жидкость и добавляли к осажденным клеткам 500 мкл охлажденного стерильного раствора 100 мМ CaCl₂, ресуспендировали. Инкубировали смесь во льду в течении 30 мин. Снова центрифугировали при 4000 g 4 мин, удаляли надосадочную жидкость и добавляли к осажденным клеткам 150 мкл охлажденного стерильного раствора 100 мМ CaCl₂, ресуспендировали.

Добавляли 2–3 мкл плазмидной ДНК и инкубировали смесь во льду в течении 30 мин. Затем инкубировали смесь при 42° в течении 1,5 мин. Снова инкубировали смесь во льду в течении 5 мин. Добавляли к смеси 1 мл LB среды и инкубировали 1 ч при 37°. Высевали 100-150 мкл смеси на чашку Петри с питательной средой LB (с агаром), содержащей антибиотик (50 мкг/мл канамицина для pET-28b и pET-36b) или 100мкг/мл ампицилина для pET-46b).

3.2.2.5. Выделение плазмидной ДНК

Заражали 1,5 мл стерильной среды LB, содержащей антибиотик, одной колонией трансформированных клеток и культивировали 14–16 ч при 37°. Полученную культуру центрифугировали при 5000 g 10 мин, удаляли надосадочную жидкость. Дальнейшее выделение плазмидной ДНК проводили с использованием набора для выделения ДНК (GeneJET Plasmid Miniprep Kit, ThermoFisher Scientific, США). К клеткам добавляли 250 мкл буфера для ресуспендирования и перемешивали. Добавляли 250 мкл буфера для лизиса и перемешивали 4–6 раз до прозрачности раствора. Добавляли 350 мкл буфера для нейтрализации и снова перемешивали 4–6 раз. Центрифугировали при 14000 g 5 мин. Наносили надосадочную жидкость на колонку и центрифугировали при 14000 g 1 мин, фильтрат удаляли. Добавляли 500 мкл буфера для промывания и центрифугировали при 14000 g 1 мин, фильтрат удаляли. Снова добавляли 500 мкл буфера для промывания и центрифугировали при 14000 g 1 мин, фильтрат удаляли. Снова центрифугировали (пустую колонку) при 14000 g 1 мин. Заменяли пробирку на чистую, добавляли на колонку 30 мкл буфера для выделения, инкубировали 2 мин и центрифугировали при 14000 g в течении 2 мин. Фильтрат собирали и хранили при -20°. Все генетические конструкции подтверждали секвенированием.

3.2.3. Работа с клетками *E. coli*

Для получения белков клетки *E. coli* выращивали в жидкой питательной среде LB, содержащей бактотриптон (10 г/л), дрожжевой экстракт (5 г/л), NaCl (10 г/л) и H₂O (до 1 л). Твердые питательные среды получали добавлением 1,5 % агара в среду LB. Все среды стерилизовали автоклавированием. При выращивании клеток в среду добавляли антибиотик — либо ампициллин (100 мкг/мл) для pET-46b, либо канамицин (50 мкг/мл) для pET-28b и pET-36b;

в случае работы с клетками штамма BL21-DE3-RIL дополнительно добавляли хлорамфеникол (34 мкг/мл).

Экспрессию генов белков проводили при 37° добавлением 1 мМ ИПТГ после достижения оптической плотности клеток A_{600} значения 0,6. После 2 ч индукции клетки осаждали центрифугированием (6000 g, 15 мин) и суспендировали в буфере для лизиса (50 мМ Трис-НСl, 500 мМ NaCl, 1 мМ MgCl₂, pH 7,8).

Разрушение клеток проводили с использованием ультразвукового дезинтегратора MSE (100 Вт), предварительно добавив минимально возможное количество ДНКазы I. Затем суспензию снова центрифугировали (20000 g, 30 мин), к надосадочной жидкости добавляли коктейль протеиназных ингибиторов.

Клеточный лизат наносили на колонку, содержащую 2 мл TALON Superflow (Co-NTA агароза) и уравновешенную с буфером для лизиса. Белки элюировали буфером с имидазолом (50 мМ Трис-НСl, 500 мМ NaCl, 1 мМ MgCl₂, 300 мМ Имидазол, pH 7,8). Выбор носителя был обусловлен более оптимальным связыванием белков, а также необходимостью ионов Co²⁺ для работы ферментов.

Из Dh-PPазы и её вариантов His₆-последовательность удаляли, поскольку это способствовало уменьшению агрегации белков. Для этого сначала удаляли имидазол пропусканием полученных фракций через колонку NiPrep 26/10 (GE Healthcare, США), уравновешенную буфером для лизиса. Затем последовательность отрезали действием 0,2 мг TEV-протеиназы (инкубировали ночь при комнатной температуре), после чего повторяли металлохелатную хроматографию с использованием колонки TALON Superflow для удаления His₆-пептидов.

Растворы белков затем пропускали через колонку Superdex 200 26/600 (GE Healthcare, США), уравновешенную с буфером (100 мМ MOPS-КОН, 150 мМ KCl, 2 мМ MgCl₂, 0,1 мМ CoCl₂, pH 7,2), для разделения смеси по массам белков. Для определения масс белков колонку предварительно калибровали смесью стандартных белков (Gel Filtration HMW Calibration Kit, GE Healthcare, США).

В случае Ср-PPазы выделение проводили на ионообменной колонке DEAE-Sepharose (GE Healthcare, США), уравновешенной с буфером (25 мМ Трис-НСl, 10 мМ MgCl₂, 1 мМ CoCl₂, pH 7,3), в линейном градиенте 0,05–0,7 М NaCl. Далее белок очищали с помощью гель-фильтрационной хроматографии на колонке Superdex 200 26/600. Полученные образцы белков замораживали и хранили при температуре ниже -40°.

3.2.4. Определение концентрации белков

Концентрации белков определяли спектрофотометрически, используя значения $A_{280}^{0.1\%}$ 0,478 для Dh-PPазы и её N312S-варианта, 0,419 для Dh-PPазы Δ CDC, 0,548 для Cp-PPазы, 0,426 для Cp-PPазы, 0,493 для E1-PPазы и 0,478 для Eh-PPазы и её S213N-варианта, рассчитанные из аминокислотного состава в программе ProtParam¹. Молярные концентрации были рассчитаны на основании молекулярных масс субъединиц (60,4, 34,5, 63,6, 60,8, 52,5 и 49,8 кДа соответственно).

3.2.5. ПААГ-электрофорез в денатурирующих условиях

Чистоту всех образцов контролировали с помощью ПААГ-электрофореза в денатурирующих условиях. Электрофорез осуществляли в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) в полиакриламидном геле с концентрацией рабочего геля 4–16 % в трис-глициновом буфере (приготовленного по методике Лэммли). Процедуру проводили при комнатной температуре на приборе “Mini Protein II” (BIO-RAD, США).

Гели фиксировали 20 мин в растворе, содержавшем 10 % уксусную кислоту и 25 % изопропанол, затем окрашивали 0,15 % раствором Кумасси G 250, содержащем 10 % уксусную кислоту, 30 % этиловый спирт и 0,024 % CuSO₄ (для увеличения контрастности), в течении 40 мин при комнатной температуре и отмывали раствором, содержавшим 15 % этиловый спирт и 5 % уксусную кислоту, до полного исчезновения фонового окрашивания.

3.2.6. Измерение скорости гидролиза PP_i

Ферментативную активность неорганической пирофосфатазы определяли по накоплению фосфата с помощью полуавтоматического анализатора фосфата [77]. Определение основано на сдвиге максимума поглощения комплекса Метилового зеленого с молибдат-ионом от 656 до 632 нм при связывании фосфата. Анализатор фосфата последовательно смешивает раствор образца с растворами 1 (12 г (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O и 38,5 мл концентрированной H₂SO₄ на 1 л) и 2 (75 мг Метилового зеленого и 3,4 г Triton X-305 на 1 л). Оптическую плотность раствора регистрировали при 660 нм на проточном спектрофотометре с самописцем. Чувствительность прибора составляла 2-50 мкМ P_i на шкалу самописца, исходный объем реакционной смеси 4–20 мл. Скорость гидролиза PP_i (в с⁻¹) определяли по начальному наклону кривых накопления P_i, используя уравнение (1):

¹ web.expasy.org/protparam

$$v = \frac{V \cdot k \cdot t g \alpha}{2 \cdot V_E \cdot [E]} \cdot \frac{M}{60}, \quad (1)$$

где V — объем реакционной смеси (мл); V_E — объем аликвоты фермента (мкл); $[E]$ — концентрация фермента (мг/мл); k — коэффициент пересчета, равный концентрации фосфата в мкМ, которая дает отклик самописца в 1 мм; $t g \alpha$ — измеряемая начальная скорость накопления фосфат-иона (мм/мин); M — молярная масса (в кДа) каталитически активной единицы фермента (в нашем случае одной субъединицы димерного белка).

Величину $t g \alpha$ в случаях нелинейного накопления фосфата $[P_i]$ определяли, используя уравнение $[P_i] = a + (t g \alpha / k_d) \cdot (1 - e^{-k_d t})$, где k_d - константа скорости инактивации фермента, t — время, a — фоновый сигнал.

3.2.7. Изотермическое калориметрическое титрование

Тепловые эффекты измеряли при 25° на калориметре VP-iTC (MicroCal Ltd). Ферменты и нуклеотиды были растворены в буфере 0,1 М MOPS/КОН (pH 7,2), содержащем 2 мМ MgCl₂, 0,1 мМ CoCl₂ и 150 мМ KCl. Титрование проводили последовательными инъекциями по 10 или 20 мкл 100 мкМ раствора мононуклеотида или 33 мкМ динуклеотида в 1,4 мл раствора CBS-PPазы (10–20 мкМ в расчёте на субъединицу); интервал между инъекциями составлял 5 мин. В величинах тепловых эффектов учтены эффекты разбавления.

3.2.8. Аналитическое ультрацентрифугирование

Скоростное аналитическое ультрацентрифугирование проводили при 25° на центрифуге Spinco E (Beckman Instruments, США), с компьютеризированным сбором данных, в ячейке объемом 400 мкл и длиной оптического пути 2 см при 60000 об/мин (261600 g). Запись профиля седиментации проводили при 280 нм. Расчёт коэффициентов седиментации $s_{20,w}$ и молекулярных масс проводили в программе SedFit². Все образцы содержали 10–20 мкМ раствор фермента в буфере (100 мМ MOPS-КОН, 150 мМ KCl, 2 мМ MgCl₂, 0,1 мМ CoCl₂, pH 7,2, если не оговорено иначе) и инкубировались при 25° не менее 6 ч до начала седиментации.

² www.analyticalultracentrifugation.com

3.2.9. Химическое сшивание белков

Сшивание белков осуществляли при их концентрации 10 и 20 мкМ при 25° действием глутарового альдегида или диметилсуберимидата. Реакционная смесь содержала 25 мМ буфер HEPES-KOH, pH 7,5. Реакцию с 0,5–2 мМ глутаровым альдегидом проводили 15 мин и останавливали добавлением 1/10 объема 1 М Трис-HCl, pH 7,5. Реакцию с 30 мМ диметилсуберимидатом проводили 10–30 мин и останавливали добавлением равного объема раствора 1М глицина. Запасной раствор диметилсуберимидата готовили на диметилсульфоксиде.

3.2.10. Расчёт концентраций ионов металлов

Для расчётов общих концентраций ионов металлов, требующихся для создания необходимых концентраций свободных ионов металлов, использовали следующие константы диссоциации комплексов ионов металлов с различными лигандами при pH 7,2: MgPP_i, 112 мкМ [78]; Mg₂PP_i, 2,84 мМ [78]; CoPP_i, 10 мкМ [79]; MgAMP, 10,5 мМ [79]; MgADP, 0,42 мМ [79]; и MgATP, 0,034 мМ [79].

3.2.11. Математическая обработка данных

Математическую обработку результатов производили с использованием программ для нелинейного регрессионного анализа “Scientist” (MicroMath, США) и “SigmaPlot” (Jandel Scientific, США). Данные изотермического калориметрического титрования анализировали, используя подпрограмму MicroCal для пакета Origin (OriginLab, США) версии 7,0.

3.2.12. Молекулярная динамика

Молекулярно-динамические расчёты димера Bs-PPазы, чья кристаллическая структура со связанным имидодифосфатом (PNP), ионами магния и фтором (PDB: 2HAW) была определена с разрешением 1,75 Å [57], проводили в программном пакете AMBER 14 [80]. Виртуальную замену Asn77Ser (соответствующую замене Asn312Ser в Dh-PPазе) производили в программе Coor версии 0.8.1 EL CCP4-6 [81]. Для учета измененной геометрии связанного PNP [57] по сравнению со свободным комплексом Mg₂PNP [82] (например, угол P–N–P на 15° больше в комплексе с Bs-PPазой) были изменены не только углы, но и увеличены их гармонические силовые постоянные: для углов P–N–P, N–P–O и O–P–O в 3, 5 и 5 раз соответственно, а торсионный барьер для

вращения вокруг связи P–N в 4 раза. Кратности усиления были подобраны эмпирически и являются минимальными, при которых наблюдалась стабильность комплекса в течении МД симуляции. Системы были гидrogenизированы в программе TLEAP пакета AMBER 14 [80] и последовательно сольватированы монослоем молекул воды с использованием программы 3D-RISM [83] пакета AMBER 14 [80], а затем ещё 8 Å TIP3P молекул воды в конечном объеме около 730000 Å³ с использованием функции SOLVATEOCT программы TLEAP, и наконец электронейтрализованы добавлением ионов калия в той же программе.

МД симуляции проводились с использованием программы PMEMD пакета AMBER 14 [80] и набором силовых полей ff14SB. Полное число атомов в симуляциях было приблизительно 65000. Системы были минимизированы, используя функцию SANDER (1000 шагов быстрого спуска и 2000 шагов сопряженных градиентов с ограничением 500 ккал·моль⁻¹·Å⁻² на атом белка). Системы постепенно нагревали до 300 К при постоянном объеме и ограничении 500 ккал·моль⁻¹·Å⁻² на атом белка, которые были постепенно удалены. Температура поддерживалась постоянной с помощью термостата Ланжевена. Симуляции проводили с 10 Å ограничением ячейки (от поверхности белка) в течении 650 нс с сохранением моментальных снимков каждые 10 пс. Водородные связи в полученных траекториях были предсказаны с помощью программы Hbondan [84], используя стандартные настройки. Другие анализы полученных траекторий проводились в программе CPPTRAJ [85] пакета AMBER 14 [80].

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Четвертичная структура CBS-PPазы и её значение для активности

В этой главе представлена информация о том, что CBS-PPазы являются гомодимерными белками. На примере Dh-PPазы будет показана способность фермента обратимо диссоциировать на субъединицы, а также описана стабилизация олигомерной структуры фермента лигандами регуляторного центра.

4.1.1. CBS-PPазы имеют димерную структуру

Для определения олигомерного состояния белка мы использовали три наиболее распространенных метода: гель-фильтрацию, ультрацентрифугирование и химическое сшивание с последующим электрофорезом в денатурирующем ПААГ.

Поскольку гель-фильтрация являлась одним из этапов выделения CBS-PPаз, то их молекулярные массы мы оценили уже при очистке белков, пропустив через колонку смесь стандартных белков. Гель-фильтрация очищенных препаратов дала аналогичные результаты (табл. 1). Таким образом, по результатам гель-фильтрационного анализа все объекты являются димерами. Однако, данный тип анализа не очень точен из-за зависимости объема выхода белка от формы его молекулы, поэтому мы обратились к другим методам.

Таблица 1. Молекулярные массы CBS-PPаз, оцененные методом гель-фильтрации. В скобках приведены теоретические значения масс димера, рассчитанные по аминокислотной последовательности.

Фермент	Мол. масса, кДа
Dh-PPаза	124 (120,8)
Δ CDC-Dh-PPаза	74 (69,0)
E1-PPаза	108 (105,0)
Eh-PPаза	105 (99,6)
Cn-PPаза	130 (127,2)
Cp-PPаза	126 (121,6)

Результаты сшивания двумя химическими агентами представлены на рис. 28. Рассмотрение удобно начать с Δ CDC-Dh-PPазы, т.е. Dh-PPазы с полностью удаленной регуляторной вставкой. Δ CDC-Dh-PPаза является таким образом аналогом канонических PPаз семейства II, которые представляют собой гомодимеры, диссоциирующие на субъединицы при удалении структурного иона металла с помощью ЭДТА. Сшивание Δ CDC-Dh-PPазы проводили

при двух концентрациях фермента действием глутарового альдегида переменной концентрации. После этого проводили SDS-электрофорез в ПААГ. В отсутствие сшивающего агента была видна одна полоса, по массе соответствовавшая мономерному белку (центральная дорожка на рис. 28В). После обработки сшивающим агентом наблюдалось появление второй полосы, соответствовавшей по массе димеру. Также видны слабые полосы форм более высоких масс, однако, это, скорее всего, следствие межмолекулярного сшивания фермента, поскольку интен-

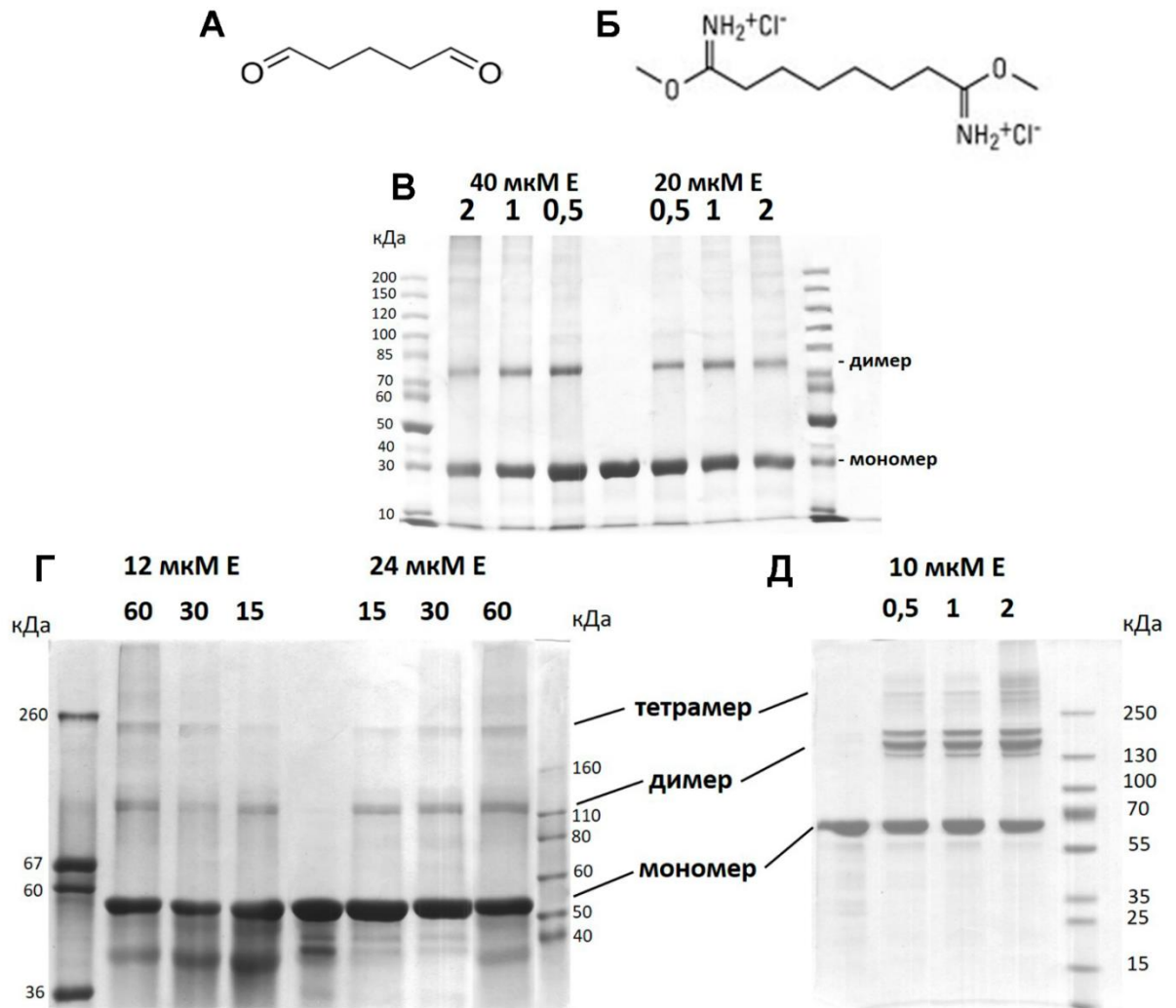


Рис. 28. Химическое сшивание CBS-PPаз с помощью сшивающих агентов: (А) Глутаровый альдегид. (Б) Диметилсуберимидат. (В) Сшивание Δ CDC-Dh-PPазы проводили обработкой 0,5, 1 или 2 мМ глутаровым альдегидом при двух концентрациях белка (20 и 40 мкМ в расчете на субъединицу). Центральная дорожка показывает несшитый фермент, крайние дорожки — маркеры молекулярных масс. (Г) Сшивание Eh-PPазы проводили обработкой 15, 30 или 60 мМ диметилсуберимидатом при двух концентрациях белка (12 и 24 мкМ в расчете на субъединицу). Центральная дорожка показывает несшитый фермент, крайние дорожки — маркеры молекулярных масс. (Д) Сшивание Dh-PPазы проводили обработкой 0,5, 1, 2 мМ глутаровым альдегидом при 10 мкМ белке в расчете на субъединицу. Крайняя левая дорожка показывает несшитый фермент, крайняя правая — маркеры молекулярных масс.

сивность данных полос, а также количество белка, не вошедшего в гель, увеличивались с ростом концентрации белка.

При анализе полноразмерных ферментов мы столкнулись с неоднозначностью результатов сшивания. Помимо полос мономера и димера мы видели ещё полосы в районе масс тетрамера, как показано для Eh-PPазы и Dh-PPазы на рис. 28Г,Д. Интенсивность этих полос мало зависела от концентраций белка и сшивающего агента, хотя глубина межмолекулярного сшивания должна была возрасти примерно в четыре раза при увеличении концентрации белка вдвое. Аналогичные результаты были получены для трех других CBS-PPаз.

Дополнительная информация была получена методом аналитического ультрацентрифугирования (скоростной седиментации). Мы получали зависимости поглощения образцов при 280 нм по длине ячейки от времени. В качестве примера на рис. 29А приведены данные для Dh-PPазы. Затем эти профили анализировали с помощью программы SedFit, на выходе из которой мы получали распределение частиц по коэффициентам седиментации s (рис. 29Б). Пики были проинтегрированы для получения величины процентной доли формы, и из пикового значения коэффициента седиментации ($s_{20,w}$) были рассчитаны молекулярные массы форм (табл. 2).

По результатам аналитического ультрацентрифугирования Δ CDC-Dh-PPаза является димером (что согласуется с данными по сшиванию), диссоциирующим в присутствии ЭДТА (табл. 2). Кроме того, данные седиментационного анализа показали, что три исследованные полноразмерные ферменты также являются димерами с небольшой примесью тетрамера и/или более высокомолекулярной формы (табл. 2). Как показано для Dh-PPазы, она также диссоциирует на субъединицы в присутствии ЭДТА. С другой стороны, в процессе инкубации с ЭДТА постепенно происходит агрегация белка до тетрамера и/или больших олигомеров.

Таким образом, полосы, соответствующие тетрамерному белку при химическом сшивании, относятся, вероятнее всего, к сшиванию ассоциатов/агрегатов белка. Этот вывод также подтверждается тем, что при хранении препаратов белков количество ассоциатов/агрегатов постепенно возрастало, что следовало из увеличения содержания высокомолекулярных форм по результатам аналитического ультрацентрифугирования и химического сшивания. Следует отметить, что агрегация не отражалась на кинетических параметрах ферментативной реакции, за исключением уменьшения уровня активности, что говорило об отсутствии активности у ассоциатов/агрегатов.

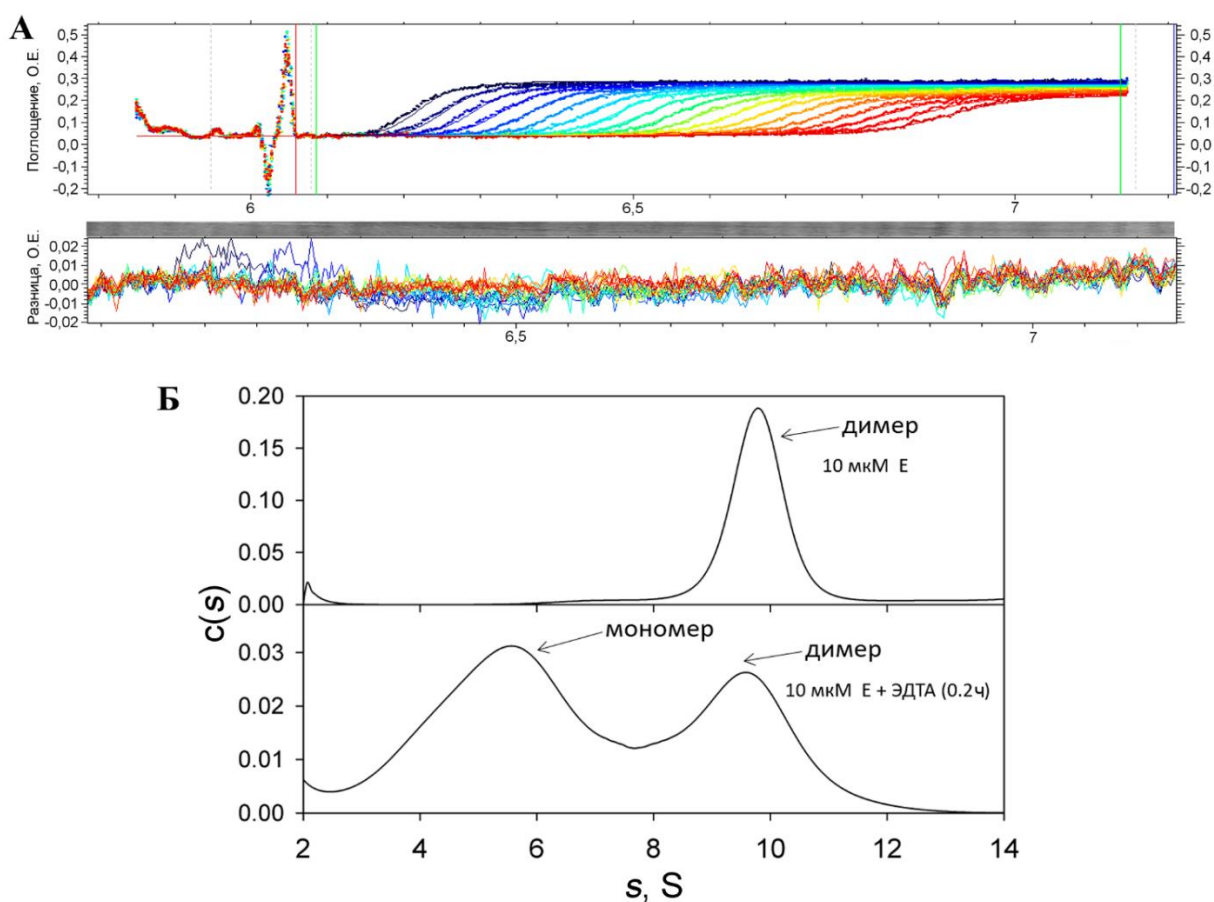


Рис. 29. Седиментационные профили Dh-PPазы. (А) Типичное распределение поглощения образца по длине центрифужной ячейки. Каждая кривая состоит из множества отдельных точек и соответствует определенному моменту времени. Красная горизонтальная линия соответствует базовой линии (нулевое поглощение), красная вертикальная линия — рассчитанному положению мениска, зеленые вертикальные линии обозначают границы обсчитываемого участка, синяя линия — дно ячейки, штриховые линии — границы поиска мениска и дна ячейки. Ниже приведен профиль распределения ошибок аппроксимации (разница между экспериментальными и рассчитанными значениями поглощения). (Б) Распределение коэффициентов седиментации для Dh-PPазы в отсутствие и в присутствии ЭДТА.

4.1.2. Обратимая диссоциация Dh-PPазы

Методы наблюдения за четвертичной структурой, использованные в описанных выше опытах, требуют довольно высокой концентрации белка (≥ 10 мкМ), при которой он преимущественно существует в виде димера. Определить условия его диссоциации на субъединицы оказалось возможным, измеряя его активность, что позволило расширить диапазон концентрации белка, особенно в сторону низких концентраций, на несколько порядков. Это стало возможным благодаря разной активности димерной и мономерной форм фермента.

Таблица 2. Коэффициенты седиментации и молекулярные массы разных форм CBS-PPаз. Измерения проводили в буфере 0,1 М MOPS-КОН, 150 мМ KCl, 0,1 мМ CoCl₂, 2 мМ MgCl₂, pH 7,2. Концентрация ЭДТА составляла 1 мМ, опыты без ЭДТА отмечены прочерком в столбце «Время инкубации с ЭДТА». В скобках приведена процентная доля каждой из форм.

Фермент	Концентрация, мкМ	Время инкубации с ЭДТА, ч	$s_{20,w}$, S / Масса, кДа (%)			
			Мономер	Димер	Тетрамер	Другие формы
ΔCDC-Dh-PPаза	20	-	-	4,7 / 63 (94)	-	-
		0,2	3,0 / 32 (81)	-	-	7,0 / 112 (11)
Dh-PPаза	10	-	-	9,9 / 144 (90)	-	(10)
		0,2	5,5 / 60 (55)	9,5 / 130 (35)	-	-
		1,5	6,0 / 68 (50)	9,6 / 136 (29)	14,0 / 242 (14)	-
		3	5,7 / 63 (42)	9,4 / 133 (29)	14,5 / 255 (22)	-
		6	5,5 / 60 (35)	9,3 / 131 (27)	13,7 / 233 (14)	16,9 / 321 (9)
EI-PPаза	10	-	4,8 / 54 (3)	8,8 / 120 (80)	12,7 / 230 (15)	(<2)
Eh-PPаза	10	-	5,5 / 65 (5)	9,2 / 129 (81)	13,2 / 247 (11)	(<3)

В первой серии опытов мы приготовили растворы Dh-PPазы и ее укороченного варианта различной концентрации и измерили их удельные активности после достижения равновесия. На рис. 30 видно, что удельная активность Dh-PPазы постепенно уменьшается при разбавлении фермента и близка к нулю при концентрации последнего 25 нМ. Эту зависимость можно было описать схемой 1 для диссоциации димерного белка. Система уравнений (2) и (3), выведенная для указанной схемы, описывает зависимость активности димера (E_2) от времени при диссоциации до субъединиц (E) и их обратную ассоциацию, а также равновесную активность (при $d\alpha_D/dt = 0$) как функцию концентрации фермента. В этих условиях, v_D и v_M — удельные активности димерной и мономерной форм фермента, соответственно, α_D — доля димерной формы фермента в момент времени t , $[E]_t$ — суммарная концентрация фермента, в расчете на субъединицу, k_d и k_a — константы скорости диссоциации и ассоциации соответственно.

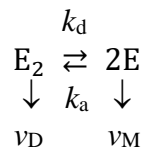


Схема 1. Равновесие мономер-димер.

$$v = v_M + (v_D - v_M)\alpha_D \quad (2)$$

$$\frac{d\alpha_D}{dt} = k_a[E]_t(1 - \alpha_D)^2 - k_d\alpha_D \quad (3)$$

Аппроксимация этой системой уравнений при $d\alpha_D/dt = 0$ зависимости для Dh-PPазы на рис. 30 показала, что активность мономерной формы равна нулю в пределах ошибки измерения и позволила также определить константу диссоциации димера ($K_D = k_d/k_a$) (табл. 3). Полноразмерный фермент более стабилен чем фермент без регуляторной ставки (разница в K_D немного больше порядка) и дополнительно стабилизируется лигандами регуляторного центра — АТР и Ар₄А, о чем свидетельствует сдвиг кривой в более низкие (на 0,5–1 порядка) концентрации фермента. Введение в систему ЭДТА приводило к полной дестабилизации полноразмерного фермента, делавшее невозможным определение величины K_D .

Измерение кинетики инактивации фермента после разбавления позволяет определить не только K_D (по конечной величине активности), но и константы скорости диссоциации (k_d) и ассоциации (k_a). Данный подход имеет несколько ограничений. Обе кинетические константы (k_a и k_d), а, следовательно, и их отношение ($K_D = k_d/k_a$), можно определить с достаточной достоверностью, если остаточная активность находится в диапазоне 5–85%. Если остаточная ак-

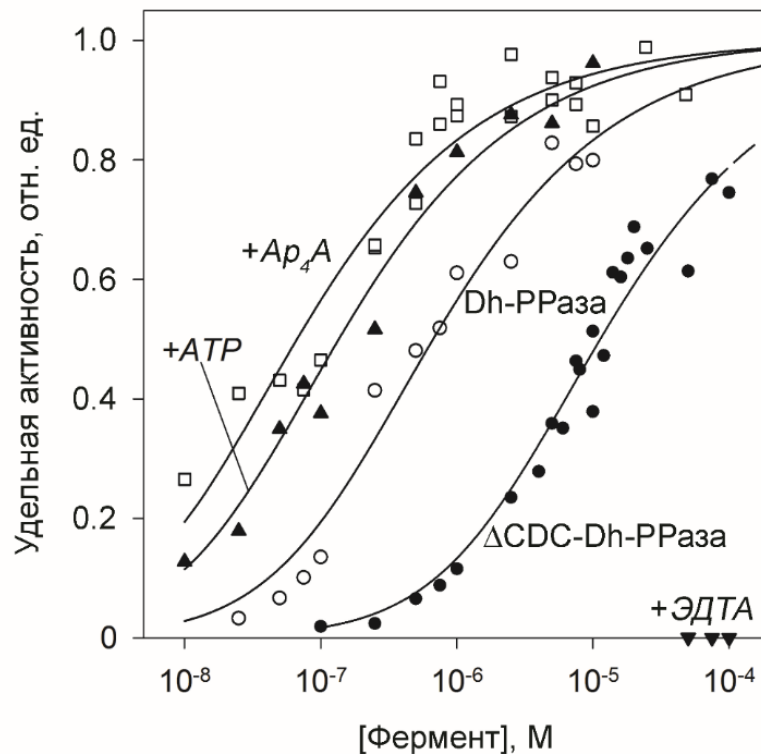


Рис. 30. Зависимость удельной активности CBS-PPазы от ее концентрации в состоянии равновесия³. Ферменты инкубировали в буфере 0,1 М MOPS-KOH, pH 7,2 с 0,1 мМ CoCl₂ и 2 мМ MgCl₂ при 25° (в опытах с ЭДТА ионы металлов не добавляли). Концентрации добавок были: 100 мкМ АТР, 5 мкМ Ар₄А и 1 мМ ЭДТА. Активность измеряли в буфере 0,1 М TES-KOH, pH 7,2 с 5 мМ Mg²⁺, 50 мкМ MgPP₁ при 25° после 2 ч инкубации. Линии соответствуют лучшим аппроксимациям системы уравнений (2) и (3).

тивность меньше 5%, то затруднено определение k_a , если она больше 85%, то обеих констант. Имея это в виду, мы работали при концентрации фермента близкой к K_D (0,8 мкМ для полноразмерного фермента и 2 мкМ для фермента без регуляторной вставки). Данные концентрации ферментов позволили достаточно точно определять величину K_D в диапазоне 0,4–30 и 0,1–70 мкМ соответственно.

Часть полученных данных приведена на рис. 31, табл. 3 суммирует все полученные значения параметров. Как видно, полноразмерный фермент стабилизируется (уменьшается значение K_D) лигандами регуляторного центра (фосфатными производными аденозина) — слабо под действием АМР, и сильно под действием Ар₄А. Обратимость диссоциации подтверждалась полным (или практически полным) восстановлением активности после добавления в инкубированный фермент стабилизирующего лиганда (Ар₄А). Здесь также видна дестабилизация ферментов в присутствии ЭДТА, причем она более выражена у фермента без регуляторной вставки по сравнению с полноразмерным. Производные аденозина не влияли на кинетику

³ Экспериментальные данные предоставлены Ану Сальминен (Университет г. Турку), анализ наш.

инактивации под действием ЭДТА (табл. 3). Понижение температуры до 0° уменьшало скорости диссоциации и ассоциации обеих форм Dh-PPазы в 1,5–2 раза.

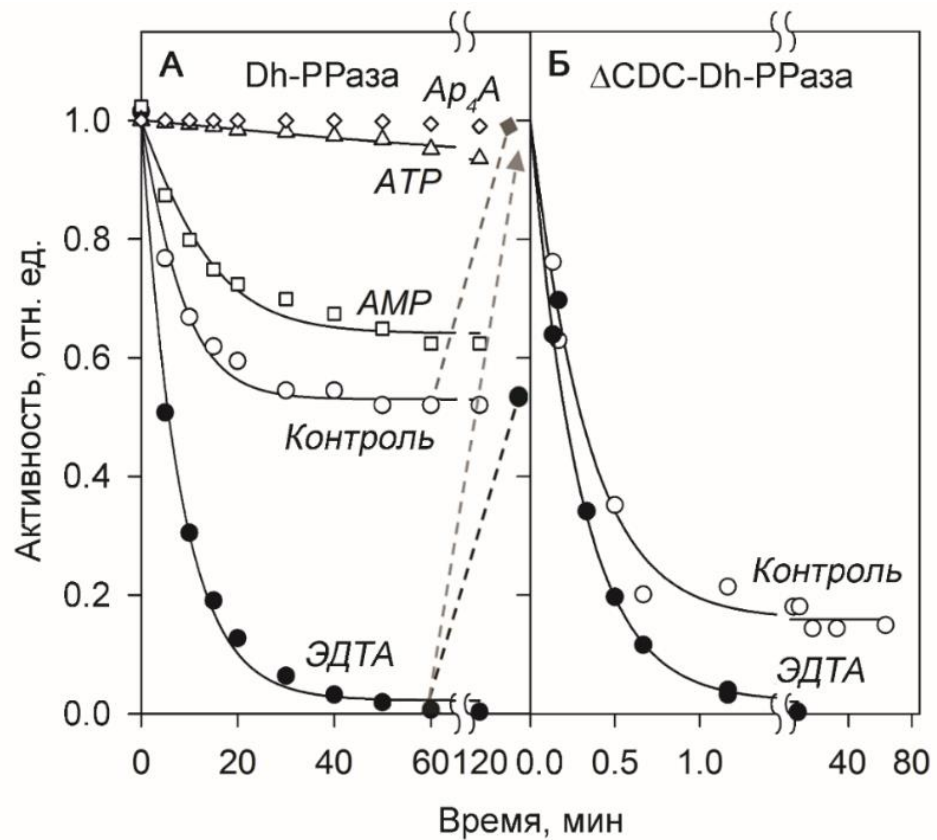


Рис. 31. Зависимость активности Dh-PPазы (А) и Δ CDC-Dh-PPазы (Б) от времени после разбавления с 70 и 100 мкМ до 0,8 и 2 мкМ соответственно. Условия инкубации и определения активности как на рис. 30. Стрелки указывают изменение активности Dh-PPазы после добавления 5 мкМ Ar_4A (---◆), удаления ЭДТА (заменой на Mg^{2+} -содержащий буфер) (---●) или удаления ЭДТА и одновременного добавления 100 мкМ АТР (---▲).

Удаление ЭДТА (заменой буфера на Mg^{2+} -содержащий с помощью ультрафильтрации) из раствора полноразмерного фермента приводило также к восстановлению активности до уровня, полученного в опыте без ЭДТА, а, если замещающий буфер дополнительно содержал АТР, то практически полностью (рис. 31). Опыты с восстановлением активности подтвердили, что падение активности при низких концентрациях фермента на рис. 30 является следствием диссоциации димера, а не неспецифической инактивации.

Таким образом, приведенные выше результаты свидетельствуют о том, что CBS-PPазы, как и канонические РРазы семейства II, являются гомодимерными белками несмотря на присутствие в них дополнительных, CBS- и/или DRTGG-доменов. Этот результат не является тривиальным ввиду того, что дополнительные домены двух субъединиц также взаимодействуют друг с другом в кристаллической структуре изолированной регуляторной вставки [12]. Прочность этого взаимодействия неизвестна, поэтому возникает вопрос, вносит ли оно вклад в

Таблица 3. Параметры системы уравнений (2) и (3), для Dh-PPазы и её варианта Δ CDC-Dh-PPазы. Значения K_D в скобках рассчитана как отношение k_d/k_a , без скобок — получены из рис. 30.

Фермент/лиганд	Температура, °	ν_D , с ⁻¹	k_d , ч ⁻¹	k_a , мкМ ⁻¹ ч ⁻¹	K_D , мкМ
Dh-PPаза					
нет		297 ± 3	2,7 ± 0,2	4,0 ± 0,4	0,67 ± 0,15
AMP ^a		295 ± 6	1,3 ± 0,2	2,5 ± 0,4	(0,52 ± 0,03)
ADP ^b		303 ± 2	1,14 ± 0,06	4,4 ± 0,3	(0,26 ± 0,01)
АТР ^c		454 ± 5	н.о. ²	н.о.	0,14 ± 0,03
Ar ₄ A ^d		566 ± 10	н.о.	н.о.	0,07 ± 0,01
ЭДТА ^e		289 ± 7	7,3 ± 0,4	<0,2	>70
ЭДТА + AMP		290 ± 6	6,9 ± 0,3	<0,2	>70
ЭДТА + АТР		449 ± 10	7,0 ± 0,3	<0,2	>70
ЭДТА + Ar ₄ A		540 ± 20	6,9 ± 0,4	<0,2	>70
нет	0	297 ± 13	1,8 ± 0,1	2,4 ± 0,5	(0,7 ± 0,2)
ΔCDC-Dh-PPаза					
нет	25	304 ± 6	144 ± 6	9 ± 3	17 ± 5
ЭДТА		296 ± 20	210 ± 20	<0,4	>500
нет	0	300 ± 10	70 ± 10	7 ± 2	(10 ± 2)

^a инкубация в присутствии 100 мкМ AMP.

^b инкубация в присутствии 100 мкМ ADP.

^c инкубация в присутствии 100 мкМ АТР.

² не определено.

^d инкубация в присутствии 5 мкМ Ar₄A.

^e инкубация в присутствии 1 мМ ЭДТА.

образование димера полноразмерной CBS-PPазы? Последние оказались склонны к образованию агрегатов/ассоциатов, что в меньшей степени выражено у канонических PPаз семейства II [52]. Существует возможность того, что димеризация полноразмерной CBS-PPазы происходит только за счет взаимодействия каталитических доменов, а регуляторные домены разных субъединиц не контактируют между собой. В пользу этого говорит тот факт, что стабильность димера CBS-PPазы не выше, а даже ниже, чем у канонической PPазы. В таком случае возможно, что ассоциаты образуются за счет взаимодействия между регуляторными доменами двух и более молекул димерной CBS-PPазы. С этим объяснением согласуется уменьшение склонности CBS-PPазы к агрегации после удаления регуляторной вставки.

Под действием ЭДТА CBS-PPаза обратимо диссоциировала на неактивные субъединицы, вероятнее всего, вследствие удаления «структурного» иона переходного металла (в канонических PPазах семейства II это Co²⁺ и Mn²⁺). Аналогичная диссоциация димера происходила при простом разбавлении раствора фермента. Связывание лигандов в регуляторном центре стабилизировало олигомерную структуру CBS-PPазы за счет уменьшения константы скорости диссоциации и увеличения константы скорости ассоциации.

Поскольку мономерная форма фермента неактивна, диссоциация CBS-PPазы могла бы вносить вклад в регуляцию ее активности в клетке. Чтобы оценить такую возможность, надо знать концентрацию CBS-PPазы в клетке. Для анаэробных бактерий класса *Clostridium* известно, что скорость синтеза пиррофосфата (а значит и скорость его гидролиза в условиях равновесия) составляет в среднем 50 мМ/мин [51]. Принимая удельную активность PPазы равной 400 с⁻¹ (фермент активирован АТР), а принимая внутренний объем клетки равным 1 мкл/мг белка можно рассчитать, что концентрация фермента в цитоплазме составляет примерно 0,5–1 мкМ. Если обратиться к рис. 29, при этой концентрации фермент будет диссоциирован примерно на 10-20 % в присутствии АТР. Это означает, что в условиях, когда АТР будет превращаться в АDP и АМР, которые в меньшей степени стабилизируют димер (табл. 3), произойдет частичная диссоциация фермента, что приведет к уменьшению его активности.

4.2. Кооперативность в катализе и регуляции CBS-PPазы

В этой главе мы покажем, что регуляторная часть, состоящая из двух CBS-доменов и/или одного DRTGG-домена, связывает фосфатные производные аденозина кооперативно и усиливает кинетическую кооперативность четырех CBS-PPаз. Мы обнаружили, что оба вида кооперативности зависят от концентрации ионов Mg²⁺. Эти выводы были подтверждены изучением генетически-модифицированного варианта Dh-PPазы, который не содержал регуляторную вставку.

4.2.1. Кооперативность гидролиза субстрата CBS-PPазами

Зависимость активности CBS-PPаз от концентрации субстрата в присутствии 5 мМ Mg²⁺ проявляла систематическое отклонение от уравнения Михаэлиса-Ментен. В качестве примера на рис. 32 приведены данные для Dh-PPазы. Коэффициент Хилла h , полученный для этой зависимости по уравнению (4), равен $1,37 \pm 0,02$, что говорило о положительной кинетической кооперативности.

$$v = \frac{k_{\text{cat}}[E]_0}{1 + \left(\frac{K_m}{[S]}\right)^h} \quad (4)$$

Анализ данной зависимости с помощью уравнения (5), полученного для схемы 2, позволил определить значения макроскопических констант Михаэлиса (K_{m1} и K_{m2}) для двух активных

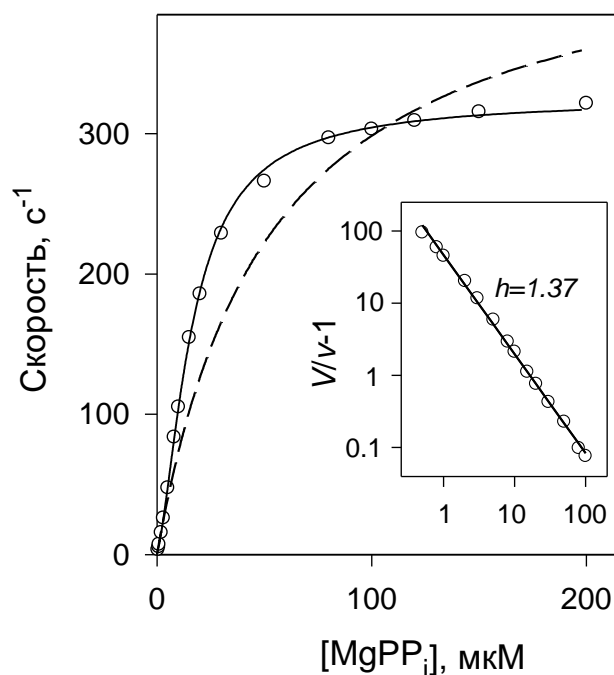


Рис. 32. Зависимость скорости гидролиза пирофосфата Dh-PPазы от концентрации субстрата в присутствии 5 мМ Mg²⁺. Концентрация фермента — 0,1–4 нМ. Линиями показаны лучшие аппроксимации для уравнения (5) для кооперативной кинетики (сплошная линия) и для простой схемы Михаэлиса-Ментен (штриховая линия). Вставка показывает график Хилла ($V = k_{\text{cat}}[E]_0$, обе оси логарифмические).

центров (приложение А). Такой подход улучшал качество описания экспериментальных данных в сравнении с уравнением Михаэлиса-Ментен (рис. 32): сумма квадратичных отклонений уменьшилась в 12 раз. Значения констант Михаэлиса K_{m1} и K_{m2} оказались равными 26 ± 1 и 10 ± 1 мкМ, соответственно, а отношение $4K_{m1}/K_{m2}$ равным 10. Как известно [86], отношение $4K_{m1}/K_{m2}$ (как и параметр β) равно единице для некооперативного (независимого) связывания, если его описывать схемой 2 и больше единицы в случае положительной кооперативности. Следовательно, Dh-PPаза проявляет положительную кинетическую кооперативность — связывание первой молекулы субстрата облегчает связывание второй в терминах константы Михаэлиса. Следует отметить, что кривые накопления фосфата (продукта) были строго линейны, а скорости реакции были строго пропорциональны концентрации фермента во всех случаях, что исключало возможность появления отклонений от простой кинетики Михаэлиса-Ментен в результате субстрат-зависимых изменений в олигомерной структуре фермента при разбавлении раствором субстрата.

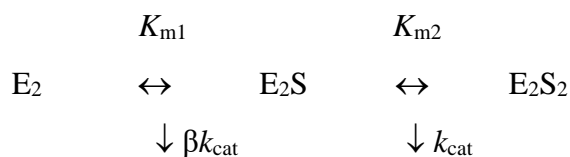


Схема 2. Связывание субстрата и его гидролиз CBS-PPазой (S = MgPP_i). β — относительный вклад первого центра в суммарную активность фермента.

$$v = \frac{k_{\text{cat}}[E]_0 \left(1 + \frac{\beta K_{m2}}{[S]}\right)}{1 + \frac{K_{m2}}{[S]} + \frac{K_{m1}K_{m2}}{[S]^2}} \quad (5)$$

Коэффициент Хилла (h), как и отношение $4K_{m1}/K_{m2}$ для Dh-PPазы оказывались больше единицы в диапазоне концентрации свободных ионов магния от 0,05 до 20 мМ включительно (рис. 33), однако, уменьшались с уменьшением концентрации последнего, что свидетельствовало об уменьшении кинетической кооперативности. Это являлось результатом уменьшения K_{m1} , при этом K_{m2} оставалась практически постоянной (рис. 33).

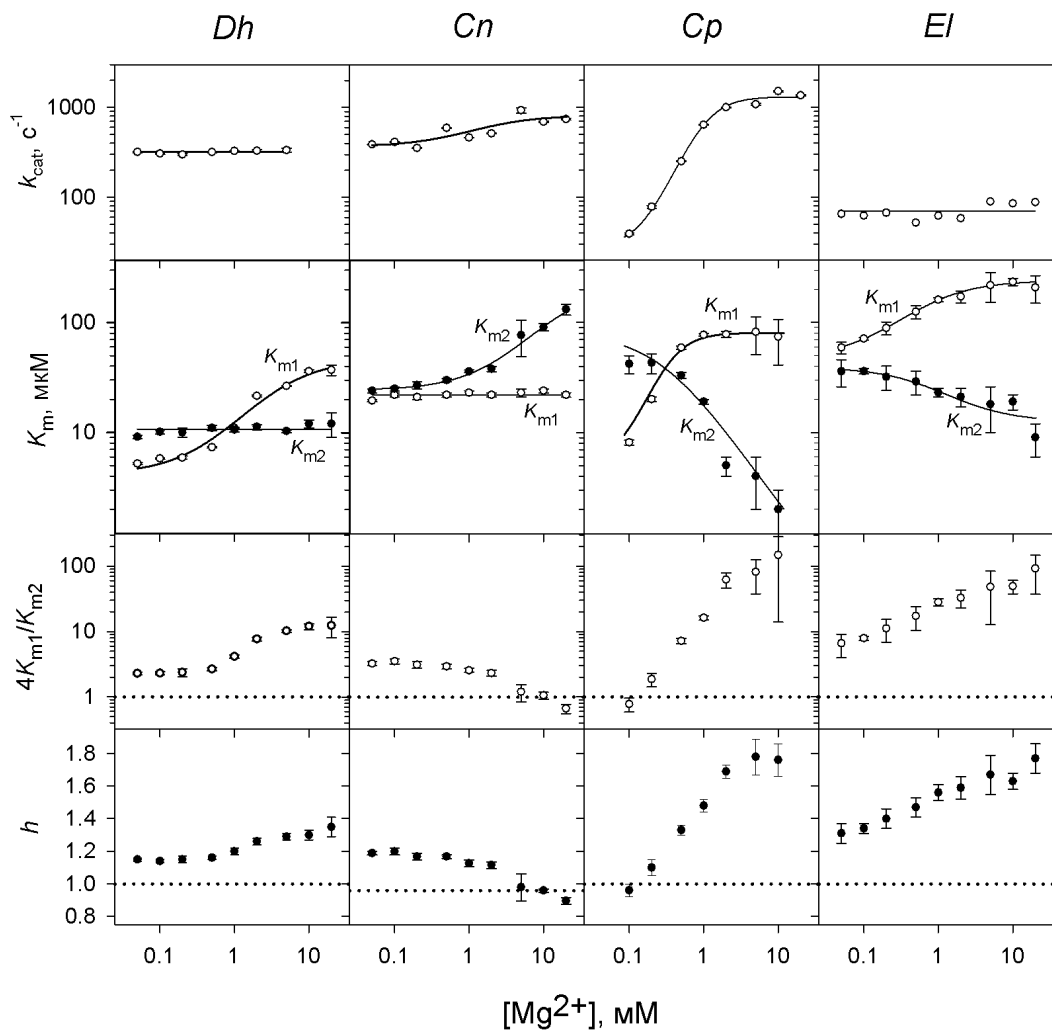


Рис. 33. Зависимость кинетической кооперативности четырёх CBS-PPаз от концентрации свободных ионов магния. Панели показывают (сверху вниз) каталитическую константу k_{cat} , константы Михаэлиса K_{m1} и K_{m2} , отношение констант Михаэлиса и коэффициент Хилла h . Происхождение белков обозначена сверху. Зависимости k_{cat} были аппроксимированы уравнением (7). Линии для K_{m1} и K_{m2} показывают наилучшие аппроксимации уравнением (6). Горизонтальные пунктирные линии ($4K_{m1}/K_{m2} = 1$ и $h = 1$) показывают границу между положительной и отрицательной кооперативностью. Значения K_m приведены в терминах комплекса MgPP_i .

Анализ зависимости констант Михаэлиса (K_m) от концентрации свободного магния с помощью уравнения (6), полученного для схемы 3, с параметрами $(K_m)_0$ и $(K_m)_M$, относящимся к константам Михаэлиса экстраполированным к нулевой и бесконечной концентрации свободных ионов магния, соответственно, позволил оценить константы связывания ионов магния (K_M). Так, полученные значения $(K_m)_0$, $(K_m)_M$ и K_M для K_{m1} оказались равными 4,7 мкМ, 60 мкМ и 0,6 мМ, соответственно (табл. 4). А вот значение каталитической константы k_{cat} для Dh-PPазы показало слабую зависимость от концентрации свободных ионов магния во всем диапазоне концентраций последнего (0,05–20 мМ) и было в пределах 300–350 с⁻¹.

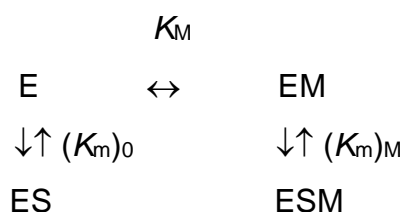


Схема 3. Модуляция связывания субстрата ионами магния.

$$K_m = \frac{(K_m)_0 \left(1 + \frac{[M]}{K_M}\right)}{1 + \frac{(K_m)_0 [M]}{(K_m)_M K_M}} \quad (6)$$

Такой же кинетический анализ был проведен для трех других CBS-PPаз. Его результаты суммированы на рис. 33 и в табл. 4. Для Sp-PPазы K_{m1} практически не зависела от концентрации свободных ионов магния, при этом K_{m2} увеличивалась при высокой концентрации последнего. Как следствие, ионы магния оказывали противоположное влияние на кооперативность в сравнении с Dh-PPазой, а коэффициент Хилла (h) снижался чуть ниже единицы при высоких концентрациях свободных ионов магния. Для Sp- и El-PPазы обе константы Михаэлиса зависели от концентрации свободных ионов магния, но в противоположных направлениях. При этом, уровень кооперативности возрастал с увеличением концентрации ионов магния. Наибольший эффект наблюдался для Sp-PPазы, которая демонстрировала значения h в диапазоне 1,0–1,8 в выбранном диапазоне концентраций свободных ионов магния.

Зависимость каталитической константы от концентрации ионов магния может быть описана уравнением (7), где $k_{cat,0}$ и $k_{cat,M}$ — значения k_{cat} , экстраполированные к нулевой и бесконечной концентрации свободных ионов магния, соответственно, K_M — константа связывания металла, и n — коэффициент Хилла для связывания ионов магния. Измеренная величина k_{cat} была практически постоянна во всём диапазоне концентрации свободных ионов магния для El-PPазы, но изменялась в 2 раза для Sp-PPазы и в 50 раз для Sr-PPазы (рис. 33). Для

Таблица 4. Кинетические параметры гидролиза субстрата, полученные из зависимостей k_{cat} , K_{m1} и K_{m2} от концентрации свободных ионов магния.

Фермент	Значение параметра								
	Зависимость k_{cat}			Зависимость K_{m1}			Зависимость K_{m2}		
	$k_{cat,0}$, с ⁻¹	$k_{cat,M}$, с ⁻¹	K_M , мМ	$(K_{m1})_0$, мкМ	$(K_{m1})_M$, мкМ	K_M , мМ	$(K_{m2})_0$, мкМ	$(K_{m2})_M$, мкМ	K_M , мМ
Dh-PPаза	-	320 ± 20	-	4,7 ± 0,5	60 ± 20	0,6 ± 0,2	-	11 ± 1	-
Cn-PPаза	370 ± 90	820 ± 120	~2	-	22 ± 2	-	24 ± 1	230 ± 80	2,1 ± 0,5
Cp-PPаза	27 ± 5	1310 ± 60	1,05 ± 0,05 ^a	<10	81 ± 3	н.о.	80 ± 50	<1	н.о.
El-PPаза	-	70 ± 14	-	47 ± 2.5	240 ± 10	0,14 ± 0,02	39 ± 3	13 ± 2	2,3 ± 1,3

^a Рассчитано в предположении, что связывание двух ионов металла происходит с одинаковыми константами связывания (см. уравнение (7)).

последнего фермента константа зависела от второй степени концентрации свободных ионов магния ($n = 2$ в уравнении (7)), указывая, что для перехода от $k_{cat,0}$ к $k_{cat,M}$ необходимо связывание двух ионов металла.

$$k_{cat} = k_{cat,0} + \frac{k_{cat,M} - k_{cat,0}}{1 + \left(\frac{K_M}{[M]}\right)^n} \quad (7)$$

Проведенный выше анализ был основан на предположении, что значение k_{cat} для E_2S составляет половину от величины для E_2S_2 в схеме 2 ($\beta = 0,5$). Если предположить нулевую активность в случае E_2S ($\beta = 0$), то мы получали увеличение суммы квадратичных отклонений в несколько раз. Предположение одинаковой активности для E_2S и E_2S_2 форм ($\beta = 1$) тоже ухудшало соответствие, но не так сильно. Однако, если параметр β не фиксировали, а давали ему возможность свободно изменяться, то наилучшее соответствие достигалось при значениях последнего около 0,5, а не 1. Таким образом, можно заключить, что схема 2 является простейшей схемой для описания экспериментальных данных, поскольку $\beta \neq 0,5$ подразумевают дополнительную положительную или отрицательную кинетическую кооперативность в фермент-субстратном комплексе.

4.2.2. Отсутствие кинетической кооперативности в $\Delta CDC-Dh-PPазе$

$\Delta CDC-Dh-PPазы$, являющаяся ферментом без регуляторной вставки, демонстрировала «михаэлисову» кинетику как при 5 мМ концентрации ионов магния, так и во всём диапазоне от 0,1 до 20 мМ включительно. Это видно по отношению констант $4K_{m1}/K_{m2}$ для схемы 2 и по коэффициенту Хилла (h), которые близки к единице (рис. 34). Значение микроскопической константы K_m , описывающей кинетику $\Delta CDC-Dh-PPазы$, показало небольшое изменение во всём диапазоне концентрации свободных ионов магния, и её значения (3,8–5,0 мкМ) были заметно меньше чем значения $\sqrt{K_{m1}K_{m2}}$ (геометрическое среднее из двух значений макроскопических констант) для $Dh-PPазы$ (рис. 34).

Значение каталитической константы k_{cat} для $\Delta CDC-Dh-PPазы$ было в пределах 100-120 с⁻¹ во всём диапазоне концентрации ионов магния. Меньшая активность фермента в сравнении с полноразмерной $Dh-PPазой$, скорее всего, связана с тем, что мутантная форма фермента частично диссоциировала до неактивных субъединиц в запасном растворе (концентрация белка в нем была 20 мкМ), как следует из рис. 31.

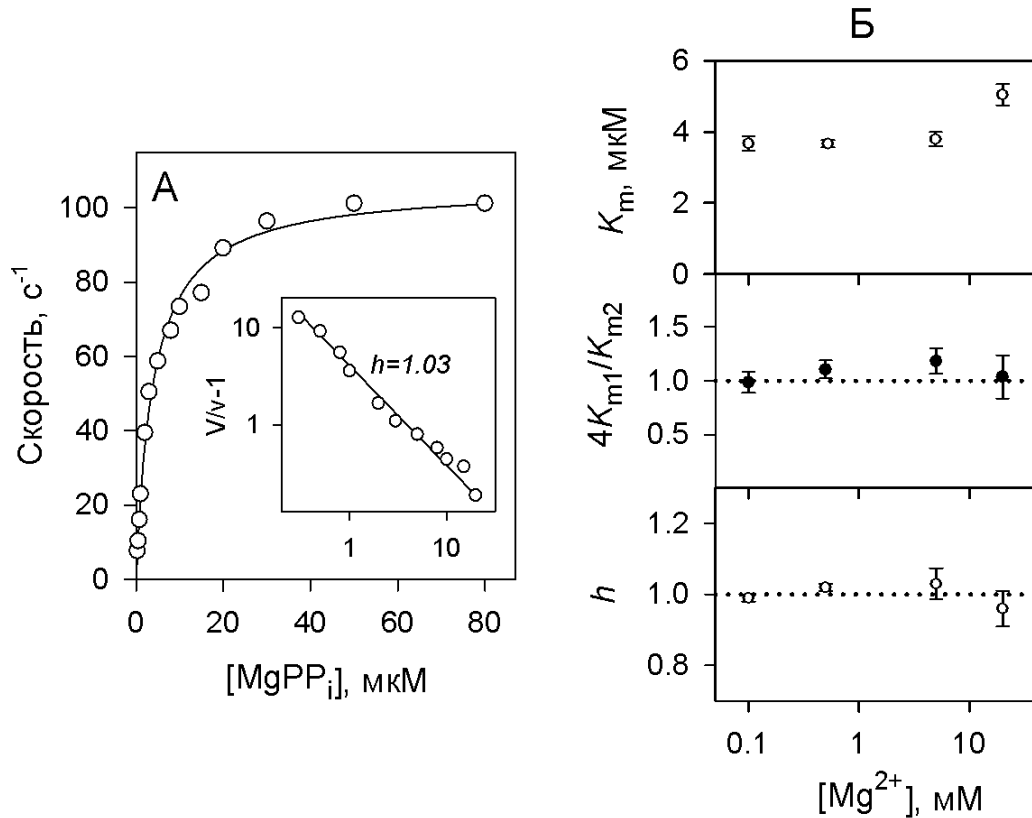


Рис. 34. Отсутствие кинетической кооперативности в Δ CDC-Dh-PPазе. (А) Зависимость скорости гидролиза от концентрации субстрата при 5 мМ концентрации ионов магния. Концентрация фермента — 0,1–4 нМ. Линией показана лучшая аппроксимация для простой схемы Михаэлиса-Ментен. Вставка показывает график Хилла; обе оси логарифмические. (Б), зависимость кинетических параметров от концентрации свободных ионов магния. Панели показывают (сверху вниз) константу Михаэлиса K_m , отношение констант Михаэлиса и коэффициент Хилла h . Горизонтальные пунктирные линии ($4K_{m1}/K_{m2} = 1$ и $h = 1$) показывают границу между положительной и отрицательной кооперативностью.

4.2.3. Кооперативность связывания аденозиолигофосфатов CBS-PPазами

На рис. 35 показано влияние концентрации аденозиолигофосфатов на активность CBS-PPаз при фиксированных концентрациях субстрата (MgPP_i) и свободных ионов магния. Микромолярные концентрации AMP и ADP ингибировали активность ферментов в большинстве случаев, а АТР действовал в качестве активатора. Качественно похожие эффекты были описаны ранее для Mт-PPазы [61].

Наиболее значимый результат заключается в том, что в большинстве случаев, когда величина эффекта позволяла провести количественный анализ, кривые плохо описывались в терминах модели простого связывания 1 : 1 (уравнение Хилла (8), при $h = 1$), но подчинялись этому уравнению с переменным параметром h и уравнению (9) для кооперативного связывания.

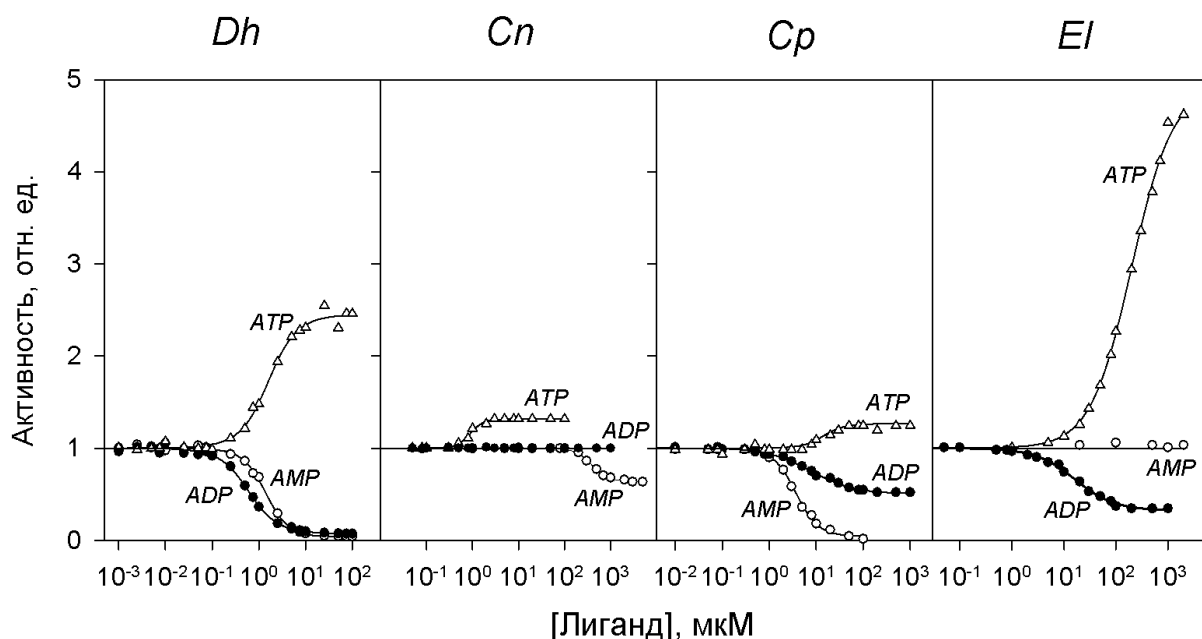


Рис. 35. Концентрационные зависимости влияния адеозинолигофосатов на активность четырёх CBS-PPаз, полученные при фиксированных концентрациях субстрата (50 мкМ MgPP_i) и свободных ионов магнии (5 мМ). Линии показывают наилучшие аппроксимации уравнения (9). Активности ферментов без лигандов (220, 350, 800 и 35 с⁻¹ для Dh-, Cn-, Cp- и Ei-PPаз, соответственно) были взяты за единицу.

вания лигандов в двух центрах с сопутствующей активацией или ингибированием. Степень совпадения экспериментальных и теоретических значений активности была мало чувствительна к значению $v_{1/2}$ на схеме 4, но лучшие аппроксимации наблюдались при $v_{1/2} = (v_0 + v_N)/2$ по сравнению с предельными случаями $v_{1/2} = 0$ или v_N .

$$v = v_0 + \frac{v_N - v_0}{1 + \left(\frac{K_N}{[N]}\right)^h} \quad (8)$$

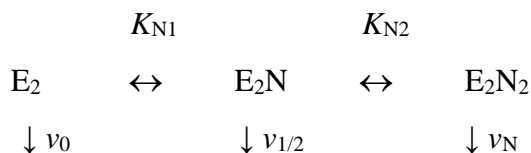


Схема 4. Модуляция активности CBS-PPазы лигандом N при постоянной концентрации субстрата.

$$v = \frac{v_N + \frac{(v_0 + v_N)K_{N2}}{2[N]} + \frac{v_0K_{N1}K_{N2}}{[N]^2}}{1 + \frac{K_{N2}}{[N]} + \frac{K_{N1}K_{N2}}{[N]^2}} \quad (9)$$

Для большинства кривых на рис. 35 значения макроскопических констант K_{N1} превышали K_{N2} независимо от значения $v_{1/2}$ и коэффициенты Хилла (h) были больше единицы (табл. 5). Таким образом, связывание аденозинолигофосфатов также показывало положительную кооперативность. Только в двух парах (Ср-РРазы/ADP и Е1-РРазы/АТР) проведенный анализ показал незначительную кооперативность.

Интересно, что ADP не влиял на активность Ср-РРазы, и AMP был неэффективен с Е1-РРазой (рис. 35) во всем диапазоне концентрации свободных ионов магния от 0,05 до 20 мМ включительно. Чтобы подтвердить факт связывания этих лигандов с ферментами были проведены эксперименты по конкурентному связыванию (рис. 36А). В обоих случаях, «функционально молчащий» лиганд обращал активирующий эффект АТР, что свидетельствовало о способности первого связываться с ферментами. Кроме того, хотя сам по себе AMP не эффективен, он синергически усиливал эффект ADP на Е1-РРазу, сдвигая профиль ингибирования в более низкие концентрации ADP и уменьшая значение активности, экстраполированное к бесконечной концентрации ADP (рис. 36Б,В). Сдвиг профиля соответствовал трёхкратному уменьшению величины K_{N1} для ADP в присутствии 100 мкМ AMP (табл. 5).

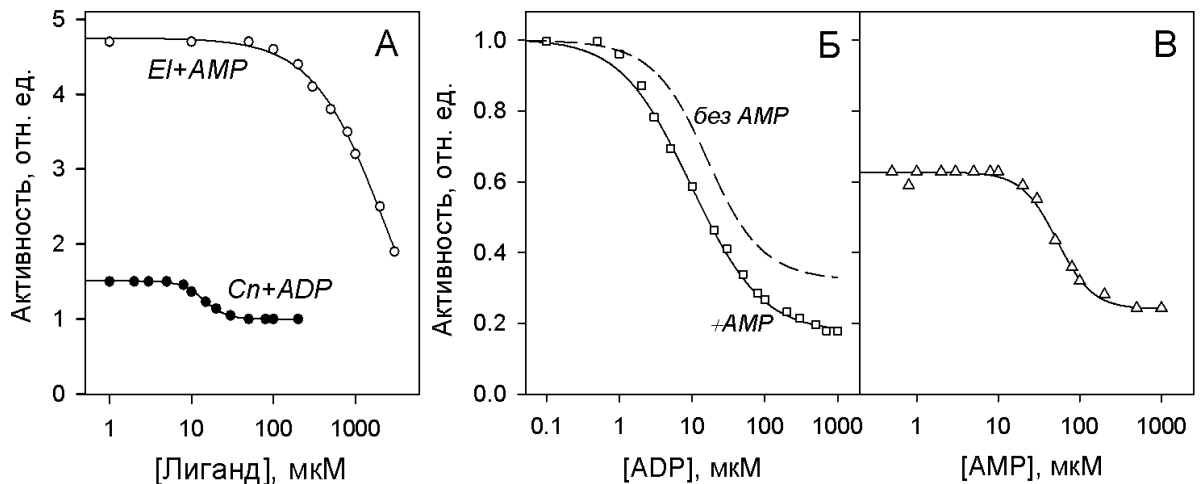


Рис. 36. «Функционально молчащие» лиганды как модуляторы влияния «функционально активных» аденозинолигофосфатов в CBS-РРазах. (А) Инактивация АТР-активированной Ср-РРазы под действием ADP и инактивация АТР-активированной Е1-РРазы под действием AMP. Концентрация АТР была зафиксирована на уровне 10 и 500 мкМ, соответственно. (Б) Ингибирование Е1-РРазы с помощью ADP в присутствии 100 мкМ AMP. Зависимость в отсутствие AMP (штриховая линия) взята из рис. 35. (В) Ингибирование Е1-РРазы под действием AMP в присутствии 20 мкМ ADP. Реакционная смесь во всех случаях содержала 50 мкМ $MgPP_i$ и 5 мМ Mg^{2+} . Активность в отсутствие лигандов была принята за единицу. Линии показывают лучшие аппроксимации уравнением (9).

Очевидно, что связывание AMP в одном центре значительно увеличивало сродство ADP ко второму центру при образовании смешанного комплекса фермент–AMP–ADP с низкой актив-

Таблица 5. Параметры, описывающие влияние аденозинолигофосфатов на четыре CBS-PPазы, полученные из рис. 35 и 36, и аналогичных данных для Dh-PPазы, полученных при других концентрациях субстрата.

Фермент	Лиганд	[MgPP _i], мкМ	v_N/v_0^a	K_{N1} , мкМ	K_{N2} , мкМ	$4K_{N1}/K_{N2}$	$\sqrt{K_{N1}K_{N2}}$, мкМ	h
Dh-PPаза	AMP	5	$0,13 \pm 0,02$	3 ± 2	$0,3 \pm 0,2$	40 ± 30	$0,95 \pm 0,05$	$1,75 \pm 0,14$
	AMP	50	$0,037 \pm 0,001$	$4,8 \pm 0,7$	$0,41 \pm 0,04$	48 ± 10	$1,39 \pm 0,04$	$1,68 \pm 0,04$
	AMP	400	$0,035 \pm 0,006$	$6,7 \pm 1,5$	$0,5 \pm 0,1$	53 ± 13	$1,83 \pm 0,05$	$1,74 \pm 0,05$
	ADP	5	$0,23 \pm 0,01$	$0,38 \pm 0,05$	$0,14 \pm 0,02$	11 ± 3	$0,24 \pm 0,01$	$1,51 \pm 0,05$
	ADP	50	$0,09 \pm 0,01$	$0,99 \pm 0,09$	$0,90 \pm 0,08$	$4,4 \pm 0,8$	$0,95 \pm 0,02$	$1,34 \pm 0,03$
	ADP	400	$0,05 \pm 0,01$	$1,4 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,4$	$1,72 \pm 0,04$	$1,23 \pm 0,04$
	ATP	5	$3,2 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,3$	$0,63 \pm 0,08$	13 ± 3	$1,14 \pm 0,02$	$1,55 \pm 0,04$
	ATP	50	$2,5 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,8$	$1,5 \pm 0,1$	6 ± 2	$1,9 \pm 0,2$	$1,45 \pm 0,13$
	ATP	400	$2,1 \pm 0,1$	4 ± 1	$1,7 \pm 0,5$	9 ± 5	$2,5 \pm 0,1$	$1,48 \pm 0,10$
Cn-PPаза	AMP	50	$0,63 \pm 0,01$	>2000	<80	>100	390 ± 20	$2,3 \pm 0,2$
	ADP	50	1,00	-	-	-	-	-
	ATP	50	$1,32 \pm 0,02$	н.о.	н.о.	н.о.	$0,92 \pm 0,07$	н.о.
	ADP ^b	50	$0,98 \pm 0,02$	н.о.	н.о.	н.о.	14 ± 1	н.о.
Cp-PPаза	AMP	50	$0,035 \pm 0,015$	12 ± 5	$1,1 \pm 0,5$	40 ± 20	$3,7 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,1$
	ADP	50	$0,50 \pm 0,02$	$3,2 \pm 0,4$	18 ± 3	$0,7 \pm 0,2$	$7,7 \pm 0,6$	$0,92 \pm 0,06$
	ATP	50	$1,26 \pm 0,02$	>70	<3	>100	14 ± 2	$2,2 \pm 0,5$
E1-PPаза	AMP	50	1,00	-	-	-	-	-
	ADP	50	$0,32 \pm 0,01$	$11,1 \pm 1,6$	24 ± 4	$1,85 \pm 0,6$	16 ± 1	$1,14 \pm 0,07$
	ATP	50	$5,2 \pm 0,3$	123 ± 14	380 ± 70	$1,3 \pm 0,4$	220 ± 40	$1,07 \pm 0,07$
	AMP ^c	50	$1,00^c$	1100 ± 200	1700 ± 300	$2,3 \pm 0,7$	1350 ± 50	$1,22 \pm 0,06$
	ADP ^d	50	$0,17 \pm 0,01$	$3,9 \pm 0,5$	24 ± 3	$0,65 \pm 0,15$	10 ± 1	$0,92 \pm 0,05$
	AMP ^e	50	$0,24 \pm 0,01$	>250	<10	>100	52 ± 3	$2,2 \pm 0,2$

^a Значения v_N и v_0 активности являются экстраполированными к бесконечной и нулевой концентрации лиганда, соответственно.

^b Измерены в присутствии 10 мкМ АТР.

^c Измерены в присутствии 500 мкМ АТР.

^d Фиксированное значение параметра.

^e Измерены в присутствии 100 мкМ АТР.

^f Измерены в присутствии 20 мкМ АТР.

ностью в этих условиях. Значения в последней строке табл. 5 показывают, что связывание АМР с Е1-РРазой высококооперативно: первая молекула лиганда связывалась довольно слабо, но средняя константа связывания ($\sqrt{K_{N1}K_{N2}}$) сравнима с таковой для других аденозинолигофосфатов. Маловероятно, что чрезвычайно высокие значения $4K_{N1}/K_{N2}$ и h для АМР, которые близки к своим предельным значениям для двухцентрового связывания [87], так или иначе связаны с присутствием АDР в системе, поскольку последний проявляет слабый уровень кооперативности при связывании с Е1-РРазой (табл. 5).

Описанный выше анализ проводили в условиях половинного насыщения фермента субстратом. Поскольку сам субстрат также связывался кооперативно, кажущаяся кооперативность связывания аденозинолигофосфатов могла возникнуть в результате воздействия последних на кооперативность связывания субстрата. Поэтому, измерения были расширены на области низкой и высокой концентраций субстрата, при которых фермент (Dh-РРаз) преимущественно существовал в свободной форме или в виде фермент-субстратного комплекса соответственно. Как видно из табл. 5, кооперативность связывания АМР и АТР характеризуемая параметрами $4K_{N1}/K_{N2}$ и h , несущественно зависела от концентрации субстрата и умеренно изменялась лишь в случае связывания АDР. Таким образом, наблюдавшаяся кооперативность связывания аденозинолигофосфатов не индуцировалась связанным субстратом или за счёт модуляции связывания последнего. В отличие от этого, относительная конечная активность, экстраполированная к бесконечной концентрации аденозинолигофосфата (v_N/v_0), уменьшалась с увеличением концентрации субстрата во всех случаях, при этом значения средней константы связывания ($\sqrt{K_{N1}K_{N2}}$) значительно увеличивались.

Для АМР, АDР и АТР (Dh-РРаз) и АМР (Ср-РРаз) были определены зависимости связывания от концентрации свободных ионов магния (рис. 37). Эти ферменты и аденозинолигофосфаты были выбраны по причине сильного воздействия на активность, которое позволяло провести точный анализ кривых связывания. Несмотря на довольно сильное влияние АТР на Е1-РРазу, последние не были включены в анализ, поскольку АТР обладает довольно высоким сродством к ионам магния [79], что вносило большую неточность в расчеты концентрации свободных ионов магния при ее низких значениях. Изменение концентрации ионов магния в анализе приводило к изменению значений констант K_{N1} и K_{N2} для связывания АМР с Dh- и Ср-РРазой в противоположных направлениях (рис. 37). В результате, отношение $4K_{N1}/K_{N2}$, коэффициент Хилла i , как следствие, степень кооперативности возрастали с увеличением концентрации ионов магния. Для АТР, K_{N1} , но не K_{N2} , зависела от концентрации магния. В результате наблюдался аналогичный, хоть и меньший эффект. Для АDР, обе константы связывания изменялись параллельно без изменения отношения $4K_{N1}/K_{N2}$ и коэффициента Хилла.

Стоит отметить, что активность Dh-PPазы при насыщающих концентрациях АТР не зависела от концентрации ионов магния и составляла $470 \pm 10 \text{ с}^{-1}$.

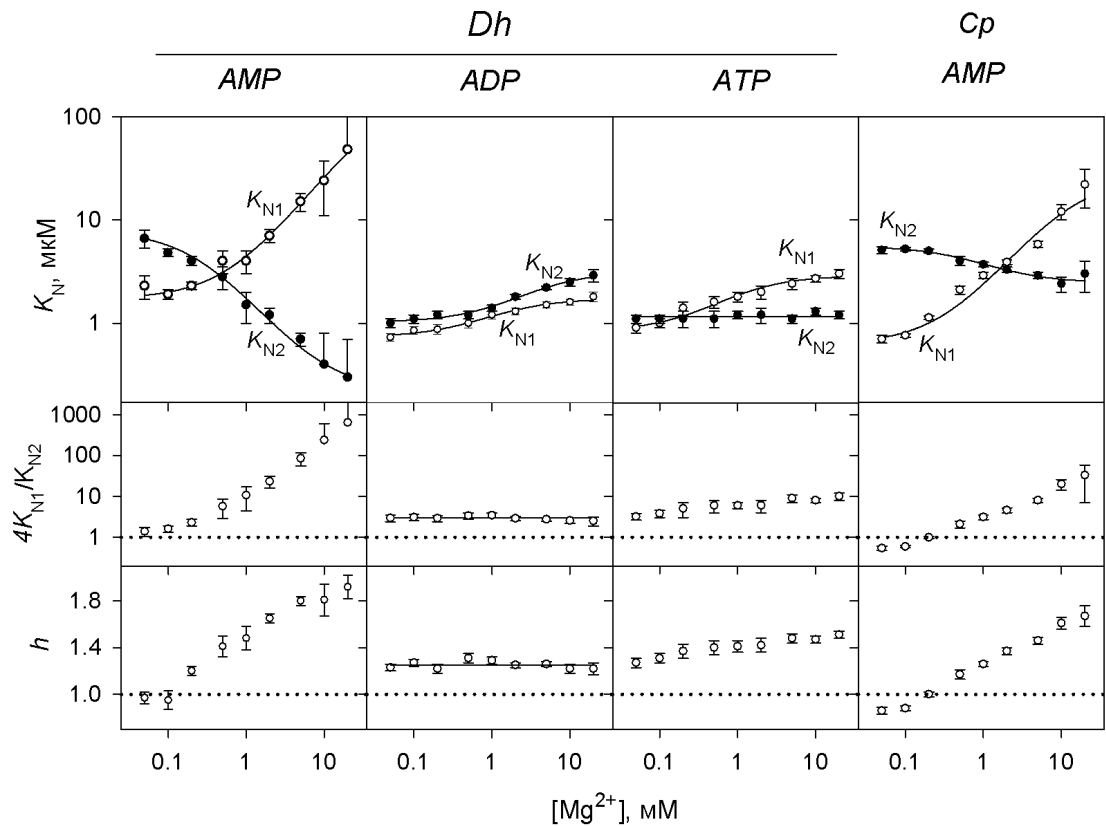


Рис. 37. Зависимость кооперативности связывания аденозинолигофосфатов с Dh- и Cp-PPазой от концентрации свободных ионов магния. Панели показывают (сверху вниз) константы связывания K_{N1} и K_{N2} , отношение констант и коэффициент Хилла h . Происхождение белков и обозначения аденозинолигофосфатов указаны сверху. Линии для K_{N1} и K_{N2} показывают наилучшие аппроксимации уравнением (6). Горизонтальные пунктирные линии ($4K_{N1}/K_{N2} = 1$ и $h = 1$) показывают границу между положительной и отрицательной кооперативностью.

Зависимости значений макроскопических констант K_{N1} и K_{N2} от концентрации свободных ионов магния подчинялись уравнению (6), полученному для модели простого связывания, которая предполагает, что связывание металла характеризуется константой диссоциации K_M и смещает константу диссоциации комплекса фермент–лиганд от $(K_N)_0$ до $(K_N)_M$. Полученные значения этих параметров приведены в табл. 6. Интересно, что значения K_M не зависели существенно от природы аденозинолигофосфата и используемого фермента, и хорошо коррелировали с величинами K_M , полученными из кинетики гидролиза субстрата для Dh-PPазы (а также для других CBS-PPаз) (табл. 6). Кроме того, во всех случаях значения K_M , полученные из зависимостей K_{N2} были больше аналогичных значений, полученных из зависимостей K_{N1} ; в обоих случаях, их отношение не отличалось от 4, ожидаемого для некооперативного связывания металла в двух идентичных центрах.

Таблица 6. Кинетические параметры для модуляции аденозиолигофосфатами активности CBS-PPаз, полученные из зависимостей K_{N1} и K_{N2} от концентрации свободных ионов магния при 50 мкМ $MgPP_i$ (рис. 37).

Фермент	Лиганд	Значение параметра					
		Зависимость K_{N1}			Зависимость K_{N2}		
		$(K_{N1})_0$, мкМ	$(K_{N1})_M$, мкМ	K_M , мМ	$(K_{N2})_0$, мкМ	$(K_{N2})_M$, мкМ	K_M , мМ
Dh-PPаза	AMP	$1,7 \pm 0,1$	190 ± 100	$0,6 \pm 0,1$	7 ± 3	$0,9 \pm 0,3$	$1,4 \pm 0,9$
	ADP	$0,73 \pm 0,03$	$1,73 \pm 0,06$	$0,5 \pm 0,1$	$1,02 \pm 0,04$	$3,2 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,2$
	ATP	$0,83 \pm 0,07$	$2,9 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,1$	-	-	-
Cp-PPаза	AMP	$0,6 \pm 0,1$	26 ± 11	$0,3 \pm 0,1$	$5,6 \pm 0,2$	$2,4 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,5$

4.2.4. Влияние аденозинолигофосфатов на кинетическую кооперативность

В табл. 7 приведены результаты анализа влияния аденозинолигофосфатов на кинетику гидролиза пиррофосфата при 5 мМ концентрации ионов магния. Общая тенденция заключается в том, что аденозинолигофосфаты снижали уровень кинетической кооперативности, который характеризовали значениями коэффициента Хилла h . В случае Сп-РРазы, которая не проявляла кинетическую кооперативность при этой концентрации ионов магния (рис. 33), АТР приводил к появлению слабой отрицательной кооперативности ($h = 0,86 \pm 0,02$). Другой общей тенденцией являлось то, что АТР повышал значения k_{cat} до двух раз и снижал значения $K_m (\sqrt{K_{m1}K_{m2}})$ до трёх раз для всех CBS-РРаз, кроме Ср-РРазы, для которой последний параметр увеличивался в присутствии АТР (также практически в три раза). Это приводило к тому, что АТР ингибировал, а не активировал Ср-РРазу при низких концентрациях субстрата.

Таблица 7. Влияние лигандов на кинетические параметры гидролиза пиррофосфата в присутствии 5 мМ концентрации свободных ионов магния, рассчитанные с использованием уравнения (5).

Фермент	Лиганд	k_{cat}, c^{-1}	$K_{m1}, \text{мкМ}$	$K_{m2}, \text{мкМ}$	$\sqrt{K_{m1}K_{m2}}, \text{мкМ}$	h
Dh-РРазы	нет	350 ± 20	26 ± 1	10 ± 1	20 ± 1	$1,29 \pm 0,02$
	АТР (10 мкМ)	450 ± 10	10 ± 1	11 ± 1	10 ± 1	$1,24 \pm 0,02$
Сп-РРазы	нет	540 ± 40	23 ± 2	80 ± 30	44 ± 3	$1,02 \pm 0,08$
	АМР (2 мМ)	400 ± 10	25 ± 1	65 ± 4	42 ± 1	$1,07 \pm 0,01$
	АДР (1 мМ)	540 ± 30	20 ± 1	80 ± 20	44 ± 5	$0,95 \pm 0,04$
	АТР (100 мкМ)	670 ± 10	$5,1 \pm 0,1$	45 ± 3	15 ± 1	$0,86 \pm 0,02$
Ср-РРазы	нет	1080 ± 30	80 ± 30	4 ± 2	18 ± 1	$1,8 \pm 0,1$
	АДР (500 мкМ)	1080 ± 40	122 ± 19	28 ± 7	60 ± 7	$1,50 \pm 0,09$
	АТР (500 мкМ)	1700 ± 40	63 ± 5	32 ± 5	47 ± 4	$1,35 \pm 0,06$
ЕI-РРазы	нет	89 ± 4	220 ± 70	18 ± 8	63 ± 3	$1,7 \pm 0,1$
	АМР (1 мМ)	88 ± 4	170 ± 20	39 ± 9	87 ± 10	$1,47 \pm 0,08$
	АДР (500 мкМ)	21 ± 1	$7,0 \pm 0,3$	32 ± 5	15 ± 1	$0,98 \pm 0,03$
	АТР (1 мМ)	180 ± 10	38 ± 4	32 ± 7	36 ± 4	$1,27 \pm 0,08$

Из трех случаев ингибирования, зафиксированных в табл. 7, один (Сп-РРазы/АМР) происходил исключительно из-за уменьшения величины k_{cat} (неконкурентное ингибирование), и один (Ср-РРазы/АДР) в результате увеличения $\sqrt{K_{m1}K_{m2}}$ (конкурентное ингибирование). В последнем случае (ЕI-РРазы/АДР), ингибитор снижал как k_{cat} , так и $\sqrt{K_{m1}K_{m2}}$ в одинаковой степени (бесконкурентное ингибирование). «Функционально молчащие» аденозинолигофосфаты (АДР для Сп-РРазы и АМР для ЕI-РРазы, см. рис. 35) существенно не изменяли кинетические параметры.

Подобный анализ, однако, не мог быть проведен в случае наиболее эффективных ингибиторов (AMP и ADP для Dh-PPазы и AMP для Cp-PPазы). Эти пары показывали весьма низкие (хотя и ненулевые) активности комплекса фермент–лиганд, что приводило к значительному относительному вкладу в активность свободного от лиганда фермента даже при высоких концентрациях аденозинолигофосфатов.

4.2.5. Активность CBS-PPаз как функция отношения ADP:ATP

Отношение ADP:ATP является важнейшим фактором, определяющим энергетическое состояние клетки, которое регулирует многие метаболические пути. Рисунок 38 показывает, как зависела активность четырех CBS-PPаз от данного параметра. Сумма концентраций ADP и ATP была зафиксирована на уровне 0,5 мМ. Хотя это значение на порядок меньше, чем в клетке это не сильно повлияло на зависимости, поскольку концентрации ADP и ATP превышали соответствующие значения $\sqrt{K_{N1}K_{N2}}$ (табл. 5) в большинстве случаев. Концентрация субстрата была зафиксирована на уровне 50 мкМ. Поскольку ATP является активатором, а ADP ингибитором или инертным лигандом, активность фермента уменьшалась с увеличением отношения ADP:ATP во всех случаях. Тем не менее, чувствительность CBS-PPаз к этому параметру значительно различалась: от высокочувствительной Dh-PPазы до низкочувствительной Cp-PPазы.

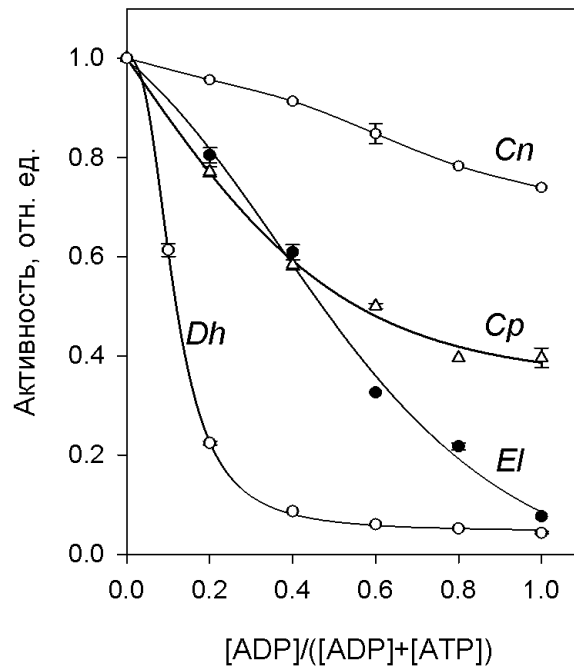


Рис. 38. Активности CBS-PPаз как функции отношения ADP:ATP. Реакционная смесь содержала 50 мкМ $MgPP_i$, 5 мМ Mg^{2+} и различные концентрации ADP и ATP, так что их суммарная концентрация была равна 0,5 мМ. Активности в присутствии 0,5 мМ ATP были приняты за единицу.

Таким образом, наличие регуляторной вставки из CBS-доменов в CBS-PPазе приводит к появлению положительной кооперативности двух типов в механизме регуляции активности. Положительная кооперативность обеспечивает возможность модуляции активности CBS-PPазы в более узких диапазонах концентраций лигандов и субстрата. Например, для снижения активности Dh-PPазы с 90 до 10 % от максимальной при постоянной концентрации субстрата необходимо было изменить концентрацию АМР всего в 16 раз, тогда как при некооперативном связывании для этого потребовалось бы 81-кратное изменение концентрации АМР [88]. То же самое относится и к зависимости активности от концентрации субстрата.

Ионы магния являются дополнительным фактором регуляции, поскольку они, кроме прямого влияния на активность, изменяли степень кооперативности при связывании субстрата и нуклеотидов. Близость величин константы связывания иона магния, контролирующего кинетику гидролиза субстрата и связывание аденозиолигофосфатов, позволяет говорить о наличии одного центра связывания, контролирующего оба типа кооперативности. Примечательно, что кристаллическая структура регуляторной вставки Ср-PPазы со связанным АМР, полученная в присутствии ионов магния, не содержит связанных двухвалентных ионов металлов [12]. В противоположность этому, канонические РРазы семейства II, аналогичные каталитической части CBS-PPаз, связывают три или четыре ионов магния в отсутствие субстрата [52] и до пяти ионов металла в его присутствии [57]. Все ионы металла локализованы в активном центре, но один из них не нужен абсолютно для проявления активности, а лишь модулирует ее. Этот ион металла и является наиболее вероятным кандидатом на роль модулятора кооперативности в CBS-PPазах.

Стоит отметить, что каталитическая константа k_{cat} на порядок ниже, а константа Михаэлиса на порядок выше в CBS-PPазах по сравнению с каноническими РРазами семейства II, что может свидетельствовать об «автоингибировании» CBS-PPаз регуляторными доменами. Идею об автоингибиторной роли CBS-доменов ввели Яносик и др. [89] для объяснения активации цистатионин- β -синтазы (CBS) при связывании SAM. Согласно этой теории, CBS-домены действуют в качестве «внутреннего ингибитора», делая каталитическую или транспортную функцию белка чувствительной к структурным изменениям, вызванным связыванием лиганда, которые могут приводить как к активации (уменьшение автоингибирования), так и ингибированию фермента. Таким образом, РРазы, содержащие CBS-домены, полностью согласуются с этой теорией — удаление регуляторных доменов в Dh-PPазе приводило к уменьшению величины K_{m1} (табл. 7). Удаление CBS-доменов в цистатионин- β -синтазе приводило к увеличению k_{cat} , но не влияло на K_m [19, 90].

В отличие от других известных CBS-белков, рассмотренные нами Dh-PPаза, Cn-PPаза и Ср-PPаза содержат дополнительный DRTGG-домен внутри пары CBS-доменов. Результаты данного этапа работы не пролили свет на функцию этого дополнительного домена, поскольку мы

не наблюдали каких-либо принципиальных различий в поведении этих CBS-PPаз по сравнению с EI-PPазой, которая не имеет DRTGG-домен в своей структуре.

4.3. Диаденозинполифосфаты как регуляторы CBS-PPазы

В дополнение к аденозинолигофосфатам мы обнаружили ещё одну группу лигандов CBS-PPаз — диаденозинполифосфаты (рис. 39). В этом разделе мы покажем, что Ar_nA связываются с тремя DRTGG-содержащими CBS-PPазами с наномолярной аффинностью и модулируют их каталитическую активность и кооперативное взаимодействие. Наши данные идентифицируют CBS-PPазы как важную мишень для Ar_nA в клетке.

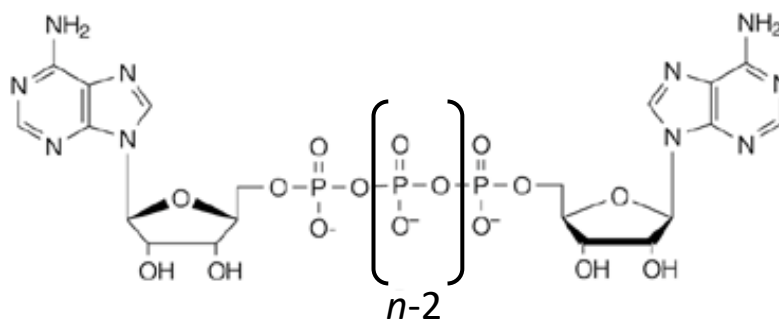


Рис. 39. Структура диаденозинполифосфатов (Ar_nA).

4.3.1. Влияние Ar_nA на активность CBS-PPаз при постоянной концентрации свободных ионов магния

На рис. 40 приведена концентрационная зависимость влияния четырех Ar_nA ($n = 3-6$) на активность трех CBS-PPаз, при постоянных концентрациях субстрата и свободных ионов магния (50 мкМ и 5 мМ, соответственно). Примечательно, что наномолярные концентрации Ar_nA активировали все CBS-PPазы (за исключением Ср-PPазы, для которой Ar_3A был эффективен при микромолярной концентрации).

Анализ зависимостей, показанных на рис. 40, а также аналогичных зависимостей для других концентраций субстрата (1 и 300 мкМ) был произведен с использованием уравнения Хилла (8). Значения коэффициента Хилла были практически неотличимы от единицы ($1 \pm 0,05$) при всех концентрациях субстрата для Ar_nA с $n = 4-6$. В противоположность этому, Ar_3A связывался кооперативно ($h = 1,4-1,7$) при тех же концентрациях субстрата. Поэтому данные для Ar_3A были дополнительно проанализированы по уравнению (9). Значения полученных параметров суммированы в табл. 8 и 9.

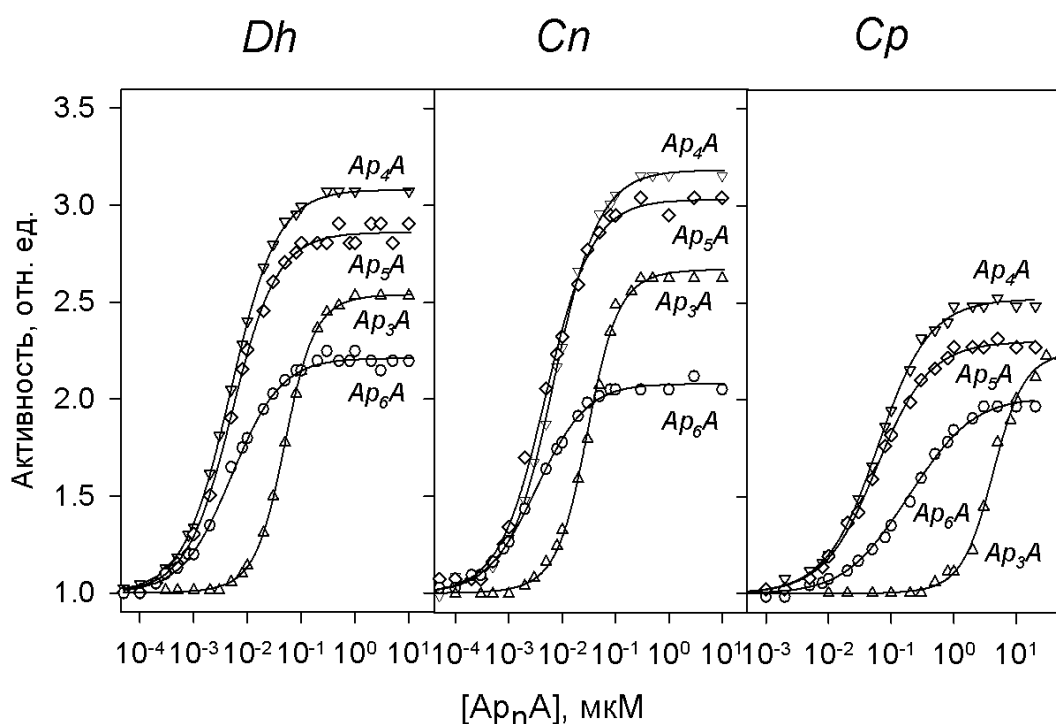


Рис. 40. Зависимости влияния Ar_nA на активность трех CBS-PPаз от концентрации лигандов при постоянных концентрациях субстрата (50 мкМ $MgPP_i$) и свободных ионов магния (5 мМ Mg^{2+}). Происхождение белков указано сверху. Линии показывают наилучшие аппроксимации уравнения (8) или (9) (см. текст). Активности в отсутствие Ar_nA (220, 350 и 800 s^{-1} для Dh-, Cn- и Cp-PPаз, соответственно) были приняты за единицу.

Значения фактора активации (v_N/v_0) и его тенденция при переходе к полифосфату с большим n или другой концентрации субстрата были похожи для трёх ферментов. Однако, значение v_N/v_0 было больше при малых значениях субстрата, чем при больших. При 300 мкМ субстрате (что исключает влияние константы Михаэлиса), v_N/v_0 было около 2,0 во всех случаях.

Таблица 8. Кинетические параметры активации трёх CBS-PPаз под действием Ar_3A в присутствии 5 мМ Mg^{2+} .

Фермент	$[MgPP_i]$, мкМ	v_N/v_0^a	K_{N1} , нМ	K_{N2} , нМ	$\sqrt{K_{N1}K_{N2}}$, нМ	$4K_{N1}/K_{N2}$	h
Dh-PPаза	1	32 ± 6	460 ± 80	100 ± 20	213 ± 5	18 ± 7	$1,60 \pm 0,05$
	50	$2,54 \pm 0,01$	82 ± 6	30 ± 2	$50,0 \pm 0,4$	$10,8 \pm 1,4$	$1,51 \pm 0,02$
	300	$1,78 \pm 0,03$	12 ± 4	4 ± 1	$7,1 \pm 0,4$	12 ± 8	$1,50 \pm 0,10$
Cn-PPаза	1	$5,1 \pm 0,1$	19 ± 1	12 ± 1	$14,8 \pm 0,3$	7 ± 1	$1,42 \pm 0,04$
	50	$2,67 \pm 0,05$	41 ± 8	22 ± 4	30 ± 1	7 ± 3	$1,43 \pm 0,07$
	300	$1,77 \pm 0,01$	55 ± 9	22 ± 4	$35,2 \pm 0,9$	$6,3 \pm 1,6$	$1,40 \pm 0,04$
Cp-PPаза	1	$6,8 \pm 0,1$	26000 ± 4000	3400 ± 600	9000 ± 300	31 ± 10	$1,66 \pm 0,06$
	50	$2,25 \pm 0,05$	12000 ± 5000	1500 ± 700	4200 ± 200	31 ± 29	$1,69 \pm 0,12$
	300	$2,24 \pm 0,02$	1800 ± 200	700 ± 100	1130 ± 30	10 ± 3	$1,50 \pm 0,05$

^a v_N и v_0 - активности, экстраполированные к бесконечной и нулевой концентрации Ar_3A , соответственно.

Кажущиеся константы связывания Ar_nA ($n = 4-6$) (K_N) могут быть сравнены с геометрическим средним констант связывания ($\sqrt{K_{N1}K_{N2}}$) для Ar_3A . Как следует из табл. 8 и 9, сродство Ar_3A при 50 мкМ субстрате было заметно ниже чем для других Ar_nA для всех CBS-PPаз. Удлинение полифосфатного мостика (увеличение n) не влияло на сродство к Dh-PPазе, немного улучшало его для Cn-PPазы и ухудшало для Cp-PPазы. Увеличение концентрации субстрата имело противоположные эффекты на сродство Ar_3A и Ar_4A к Dh- и Cp-PPазам (сродство увеличивалось) и Cn-PPазе (сродство уменьшалось). Следует отметить, что Cp-PPаза связывала диаденозинполифосфаты с меньшим сродством в сравнении с другими CBS-PPазами.

Удивительно, что ни один из диаденозинполифосфатов в концентрации до 10 мкМ не влиял на активность E1- и Mt-PPаз при 50 мкМ субстрате. Эти CBS-PPазы отличаются от вышеописанных отсутствием DRTGG-домена в регуляторной части, которая сформирована только парой CBS-доменов. Более того, 10 мкМ Ar_4A в опытах по конкурентному связыванию (аналогичных описанным в параграфе 4.2.3) не восстанавливал активность ADP-ингибированных E1- и Mt-PPаз, вследствие неспособности Ar_4A связываться с ADP-связывающим центром.

Таблица 9. Кинетические параметры активации трёх CBS-PPаз под действием Ar_nA ($n = 4-6$) при 5 мМ концентрации свободных ионов магния.

Фермент/лиганд	[MgPP _i] мкМ	v_N/v_0^a	K_N^b нМ
Dh-PPаза			
Ar ₄ A	1	18 ± 1	12,1 ± 0,3
	50	3,0 ± 0,1	4,9 ± 0,2
	300	1,91 ± 0,02	4,3 ± 0,2
Ar ₅ A	50	3,32 ± 0,06	5,5 ± 0,2
Ar ₆ A	50	2,58 ± 0,06	4,4 ± 0,3
Cn-PPаза			
Ar ₄ A	1	6,0 ± 0,3	3,9 ± 0,1
	50	3,14 ± 0,05	7,0 ± 0,2
	300	1,51 ± 0,01	16,5 ± 0,7
Ar ₅ A	50	3,03 ± 0,08	4,9 ± 0,3
Ar ₆ A	50	2,08 ± 0,03	3,3 ± 0,2
Cp-PPаза			
Ar ₄ A	1	14,7 ± 0,4	293 ± 5
	50	2,52 ± 0,03	62 ± 2
	300	2,04 ± 0,02	33 ± 1
Ar ₅ A	50	2,30 ± 0,03	58 ± 2
Ar ₆ A	50	2,04 ± 0,02	187 ± 9

^a v_N и v_0 — активности, экстраполированные к бесконечной и нулевой концентрации диаденозинполифосфата, соответственно.

^b Этот параметр эквивалентен $\sqrt{K_{N1}K_{N2}}$ в табл. 8.

4.3.2. Зависимость уровня активации CBS-PPаз от концентрации свободных ионов магния

Поскольку кооперативность у CBS-PPаз зависела от концентрации свободных ионов магния, для Ар₃А и Ар₄А (как ярко различающихся по влиянию динуклеотидов) измерения, аналогичные представленным на рис. 40, были также проведены при других концентрациях ионов магния (в диапазоне 0,05–20 мМ) и фиксированной концентрации субстрата (50 мкМ MgPP_i). Результаты этих опытов (рис. 41) показали, что Ар₃А связывался с положительной кооперативностью, в то время как Ар₄А связывался некооперативно со всеми тремя CBS-PPазами во всем диапазоне концентраций свободных ионов магния. Только в одном случае (Dh-PPаз с Ар₃А) уровень кооперативности, характеризуемый отношением констант $4K_{N1}/K_{N2}$ и коэффициентом Хилла (h), оказался зависим в значительной степени от концентрации свободных

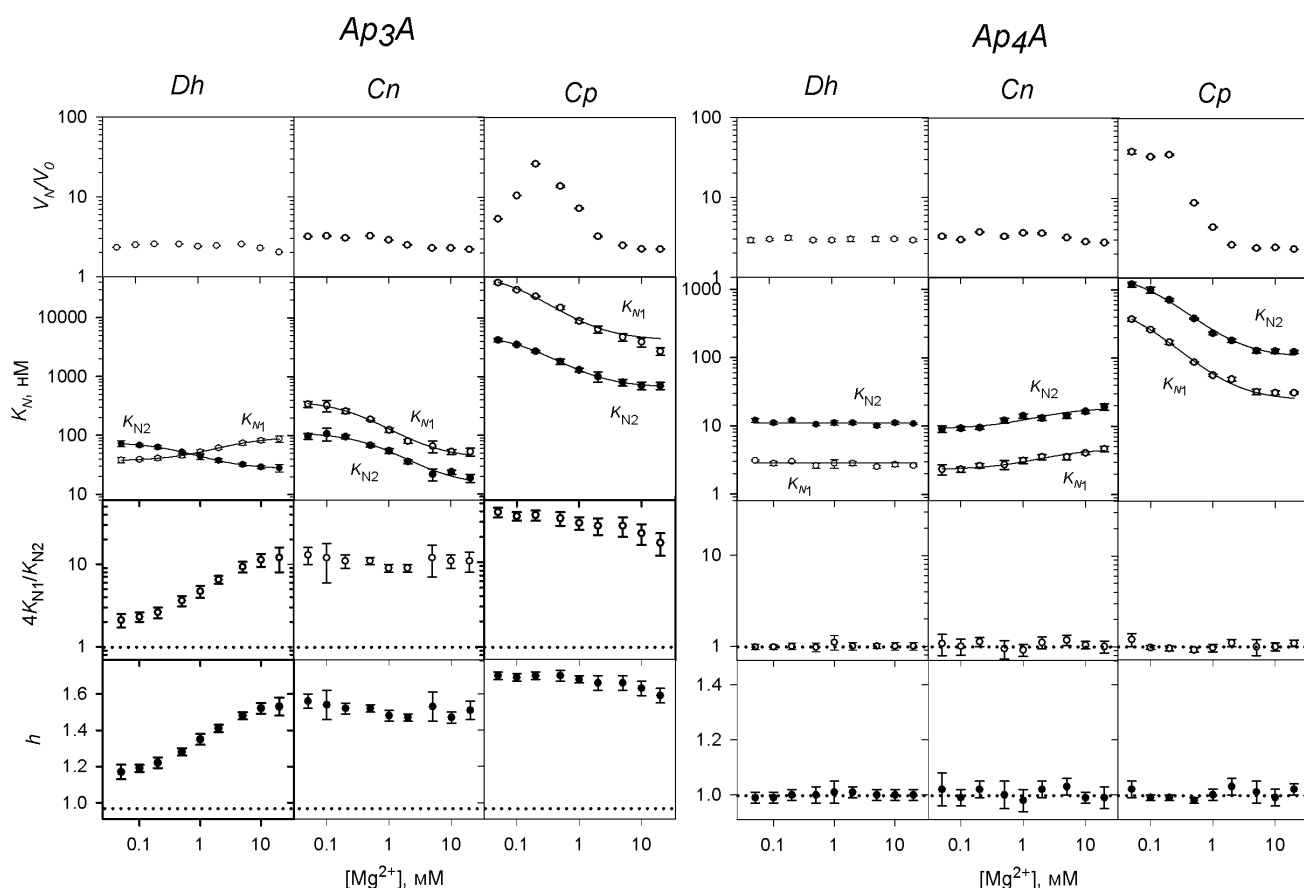


Рис. 41. Зависимость активации CBS-PPаз под действием Ар₃А (слева) и Ар₄А (справа) от концентрации свободных ионов магния. Панели показывают (сверху вниз) степень активации, константы связывания K_{N1} и K_{N2} , отношение констант и коэффициент Хилла h . Происхождение белков указано сверху. Линии для K_{N1} и K_{N2} показывают наилучшие аппроксимации уравнением (6). Горизонтальные пунктирные линии ($4K_{N1}/K_{N2} = 1$ и $h = 1$) показывают границу между положительной и отрицательной кооперативностью.

ионов магния, из-за противоположного влияния последнего на константы связывания K_{N1} и K_{N2} (рис. 41). В остальных случаях K_{N1} и K_{N2} изменялись в одном направлении и практически в одинаковой степени, из-за чего уровень кооперативности практически не изменялся. Как было сказано выше, отношение констант $4K_{N1}/K_{N2}$ равное единице соответствует некооперативному (независимому) связыванию, а большее единицы — положительной кооперативности [86].

В большинстве случаев (за исключением Dh-PPазы с Ar₄A), ионы магния модулировали связывание диаденозинполифосфатов в зависимости от природы как лиганда, так и CBS-PPазы (рис. 41). Ионы магния стимулировали связывание Ar₃A, за исключением Dh-PPазы, для которой значение K_{N1} наоборот увеличивалось. Влияние ионов магния на связывание диаденозинполифосфатов было описано уравнением (6), рассчитанные параметры которого представлены в табл. 10. Значения константы связывания ионов магния (K_M) оказались в миллимолярном диапазоне концентраций, и были весьма похожими для кооперативного связывания Ar₃A и независимого связывания Ar₄A со всеми тремя CBS-PPаз.

Степень активации (v_N/v_0) для Dh-PPазы и Cn-PPазы под действием Ar₃A и Ar₄A была практически постоянна во всем диапазоне концентраций свободных ионов магния (рис. 41). В противоположность этому, активация Cr-PPазы имела либо колоколообразную зависимость (Ar₃A), либо снижалась (Ar₄A) при увеличении концентрации свободных ионов магния.

4.3.3. Анализ активации CBS-PPаз по уравнению Михаэлиса-Ментен

Как было показано ранее в параграфе 4.2.1, скорость гидролиза субстрата плохо описывалась простой схемой Михаэлиса-Ментен и требовала использование более сложного уравнения (5) с двумя константами Михаэлиса. Отношение констант $4K_{m1}/K_{m2}$ и коэффициент Хилла (h) были больше единицы, указывая на положительную кинетическую кооперативность.

Удивительно, что Ar₃A и Ar₄A полностью снимали или заметно снижали уровень кинетической кооперативности в Dh-PPазе, Cn-PPазе и Cr-PPазе, о чем свидетельствовала близость коэффициента Хилла (h) к единице (табл. 11). Значение коэффициента Хилла большее единицы для Cr-PPазы в присутствии Ar₃A может быть объяснено неполным насыщением фермента лигандом, который связывается гораздо хуже с CrPPазой, чем с двумя другими CBS-PPазами, особенно при низкой концентрации субстрата (табл. 8).

Таблица 10. Кинетические параметры активации трёх CBS-PPаз, полученные из зависимостей K_{N1} и K_{N2} для Ар₃А и K_N для Ар₄А от концентрации свободных ионов магния (рис. 41).

Фермент	Значение параметра								
	Ар ₃ А						Ар ₄ А		
	Зависимость K_{N1}			Зависимость K_{N2}			Зависимость K_N		
	$K_{N1,0}$, нМ	$K_{N1,M}$, нМ	K_M , мМ	$K_{N2,0}$, нМ	$K_{N2,M}$, нМ	K_M , мМ	$K_{N,0}$, нМ	$K_{N,M}$, нМ	K_M , мМ
Dh-PPаза	$35,4 \pm 1,9$	96 ± 3	$0,7 \pm 0,2$	$75,1 \pm 1,3$	$24,2 \pm 1,2$	$2,8 \pm 0,5$	$5,5 \pm 0,5$	$5,5 \pm 0,5$	-
Cn-PPаза	394 ± 12	41 ± 6	$3,2 \pm 0,7$	112 ± 6	14 ± 4	5 ± 3	$4,3 \pm 0,3$	$8,6 \pm 0,5$	$0,8 \pm 0,3$
Cp-PPаза	59000 ± 5000	4200 ± 700	$1,4 \pm 0,4$	5600 ± 200	640 ± 50	$1,1 \pm 0,2$	1200 ± 200	55 ± 3	$1,4 \pm 0,2$

Таблица 11. Кинетические параметры гидролиза пирофосфата в присутствии 50 мкМ Ар3А и 5 мМ концентрации свободных ионов магния, полученные из уравнений (4) и (5).

Фермент	k_{cat} , с ⁻¹	K_{m1} , мкМ	K_{m2} , мкМ	$\sqrt{K_{m1}K_{m2}}$, мкМ	$4K_{m1}/K_{m2}$	h
Dh-PPаза	565 ± 4	$1,47 \pm 0,03$	$5,8 \pm 0,3$	$2,94 \pm 0,08$	$1,01 \pm 0,07$	$1,00 \pm 0,02$
Cn-PPаза	1120 ± 20	$5,0 \pm 0,4$	18 ± 3	$9,5 \pm 0,6$	$1,1 \pm 0,2$	$1,02 \pm 0,04$
Cp-PPаза	3090 ± 20	$12,9 \pm 0,4$	$16,0 \pm 1,0$	$14,5 \pm 0,4$	$3,2 \pm 0,3$	$1,23 \pm 0,02$

Исследование активации гидролиза субстрата в присутствии Ар4А было также проведено при других концентрациях свободных ионов магния (0,05–20 мМ). Результаты (рис. 42) показали, что присутствие активатора в концентрации 10 мкМ увеличивало каталитическую константу (k_{cat}), уменьшало константу Михаэлиса (K_m) и устраняло кинетическую кооперативность. И в этом случае наиболее значительные эффекты наблюдались для Cp-PPазы. Они более детально исследованы ниже.

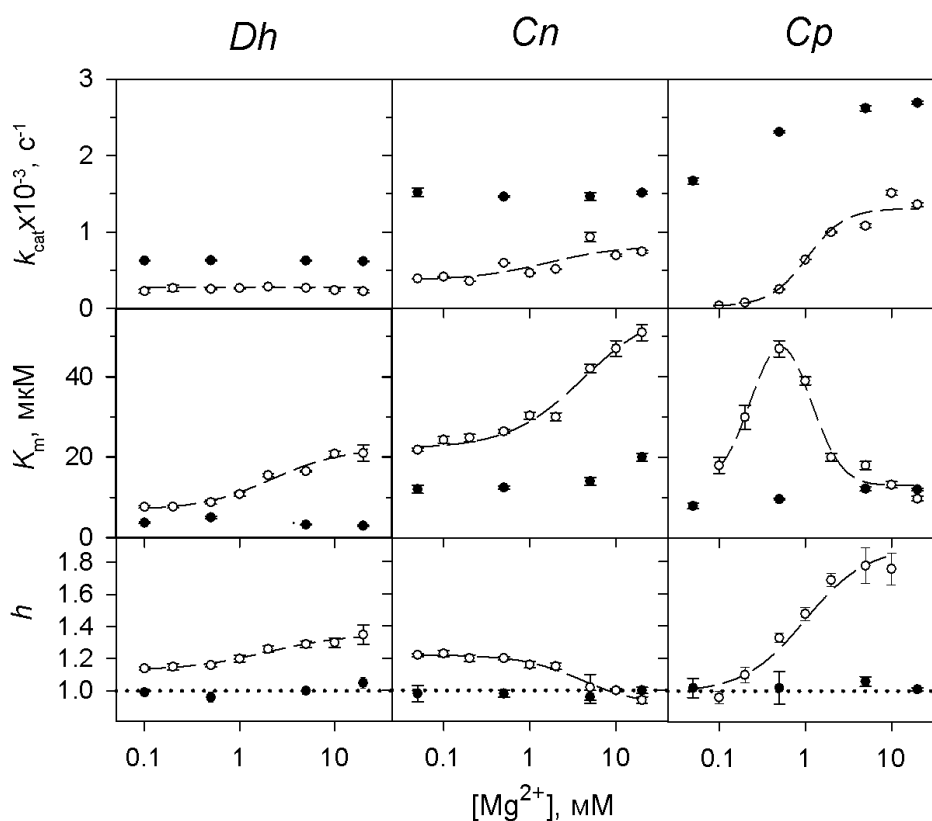


Рис. 42. Потеря кинетической кооперативности CBS-PPаз под действием 10 мкМ Ар4А. Панели показывают (сверху вниз) каталитическую константу k_{cat} , константу Михаэлиса K_m и коэффициент Хилла h . Происхождение белков обозначено сверху. Штриховые линии и белые точки показывают параметры в отсутствие Ар4А и перенесены с рис. 33; K_m в данном случае соответствует геометрическому среднему $\sqrt{K_{m1}K_{m2}}$. Горизонтальная пунктирная линия ($h = 1$) показывают границу между положительной и отрицательной кооперативностью. Значения K_m приведены в терминах комплекса $MgPP_i$.

Влияния четырех Ar_nA ($n = 3-6$) на зависимость каталитической константы (k_{cat}) Ср-РРазы были качественно похожи (рис. 43А). Для перехода от малоактивной к высокоактивной форме Ср-РРазы при увеличении концентрации свободных ионов магния в присутствии Ar_nA и в их отсутствие требовалось присоединение двух ионов магния, о чем свидетельствовала зависимость k_{cat} от квадрата концентрации последнего в уравнении (7). Все четыре активатора увеличивали предел каталитической константы при бесконечной концентрации свободных ионов магния ($k_{cat,M}$) и уменьшали константу связывания ионов магния (K_M) в два раза (табл. 12). Менее ожидаемым оказалось увеличение каталитической константы при экстраполяции данных к нулевой концентрации свободных ионов магния ($k_{cat,0}$). Из всех диаденозинполифосфатов Ar_4A сильнее всего активировал Ср-РРазу как при низкой, так и при высокой концентрации свободных ионов магния в сравнении с активностью в его отсутствие (рис. 43А).

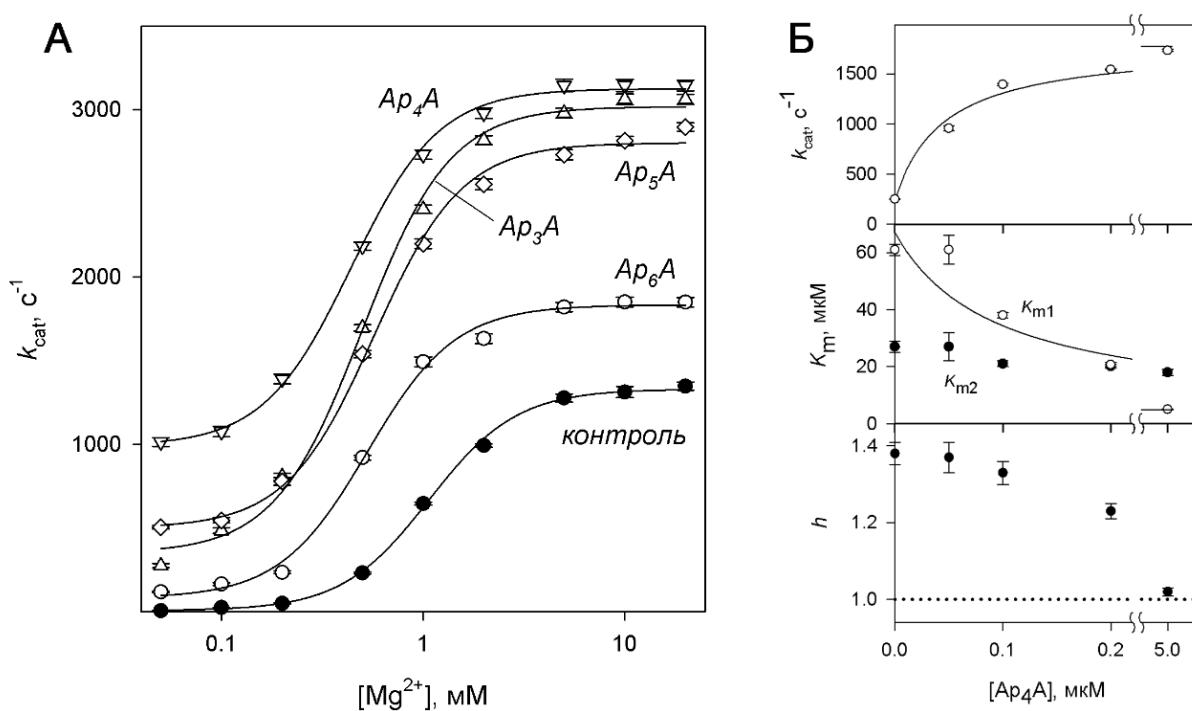


Рис. 43. Активация Ср-РРазы под действием Ar_nA ($n = 3-6$). (А) Зависимость каталитической константы Ср-РРазы в присутствии 50 μM Ar_3A или 10 μM Ar_nA ($n = 4-6$) от концентрации свободных ионов магния. Линии наилучшей аппроксимации проведены по уравнению (7). (Б) Зависимость кинетической кооперативности Ср-РРазы от концентрации Ar_4A в присутствии 0,5 мМ концентрации свободных ионов магния. Обозначения как на рис. 42. Линия k_{cat} соответствует наилучшей аппроксимации уравнением (7) с $n = 1$. Линия для K_{m1} соответствует наилучшей аппроксимации уравнением (6). Горизонтальная пунктирная линия ($h = 1$) показывают границу между положительной и отрицательной кооперативностью.

Рисунок 43Б показывает переход от положительной кинетической кооперативности к ее отсутствию при увеличении концентрации Ar_4A в присутствии 0,5 мМ свободных ионов магния.

Значение каталитической константы $k_{\text{кат}}$ возрастало в 7,5 раз (с 240 ± 100 до $1800 \pm 100 \text{ с}^{-1}$), значение константы Михаэлиса K_{m1} уменьшалось в 18 раз (с 70 ± 10 до $4 \pm 1 \text{ мкМ}$), а K_{m2} практически не изменялась при увеличении концентрации Ar_4A с 0 до 5 мкМ. Константы связывания Ar_4A , полученные из зависимостей $k_{\text{кат}}$ и K_{m} , составили $0,04 \pm 0,01$ и $1,7 \pm 1,0 \text{ мкМ}$ соответственно. Так как зависимости K_{m} и $k_{\text{кат}}$ относятся к связыванию Ar_4A со свободным ферментом и фермент-субстратным комплексом, соответственно, вероятнее всего, Ar_4A и первая молекула связанного субстрата взаимно стабилизируют связывание друг друга с Ср-РРазой в 20–40 раз.

Таблица 12. Кинетические параметры, описывающие влияние концентрации свободных ионов магния на каталитическую константу Ср-РРазы в присутствии диаденозинполифосфатов.

Ar_nA	$k_{\text{кат},0}, \text{с}^{-1}$	$k_{\text{кат},\text{M}}, \text{с}^{-1}$	$K_{\text{M}}, \text{мМ}$
-	6 ± 13	1330 ± 10	$1,07 \pm 0,03$
Ar_3A (50 мкМ)	350 ± 50	3020 ± 40	$0,50 \pm 0,03$
Ar_4A (10 мкМ)	990 ± 30	3130 ± 20	$0,44 \pm 0,02$
Ar_5A (10 мкМ)	500 ± 40	2800 ± 30	$0,57 \pm 0,03$
Ar_6A (10 мкМ)	80 ± 40	1830 ± 30	$0,53 \pm 0,03$

4.3.4. Термодинамика и стехиометрия связывания фосфатных производных аденозина с CBS-РРазами

Использование метода изотермической калориметрии (ИТС) позволило прямо измерить изменения свободной энергии (ΔG), энтальпии (ΔH) и энтропийного фактора ($T\Delta S$) при связывании фосфатных производных аденозина с CBS-РРазами. Типичный профиль титрования представлен на рис. 44А. Результаты проведенных аналогичных титрований с различными CBS-РРазами и лигандами суммированы на рис. 44Б и табл. 13.

Одним из важных результатов являлось отсутствие какого-либо сигнала при титровании Е1-РРазы и М1-РРазы (CBS-РРаз, у которых отсутствует DRTGG-домен), вплоть до 10 мкМ Ar_4A или Ar_3A и неспособность последних активировать эти CBS-РРазы и модулировать их ингибирование под действием ADP. Как было показано в параграфе 4.2.3, отсутствие влияния лиганда на активность фермента не исключает возможность связывания с последним. А поскольку данные изотермического калориметрического титрования характеризуют энергетический аспект реакции связывания, то они независимо подтверждают отсутствие образования комплекса между Ar_nA и CBS-РРазами, не содержащими DRTGG-домен. Аналогичные измерения с AMP, ADP и ATP (табл. 13) обнаружили изменения энтальпии не

только в случаях, когда они изменяли активности ферментов, но и в случаях «молчащих» лигандов (E1-PPаза с AMP и Cn-PPаза с ADP, соответственно), в которых влияние на активность не наблюдалось (см. параграф 4.2.3). В совокупности эти данные позволяют заключить, что DRTGG-домен требуется для связывания диаденозинполифосфатов, но не аденозинолигофосфатов с CBS-PPазами. Неспособность E1-PPазы связывать AMP не является следствием отсутствия DRTGG-домена, так как другая CBS-PPаза, с отсутствующим DRTGG-доменом, Mt-PPаза, ингибировалась AMP и, следовательно, связывала его [61].

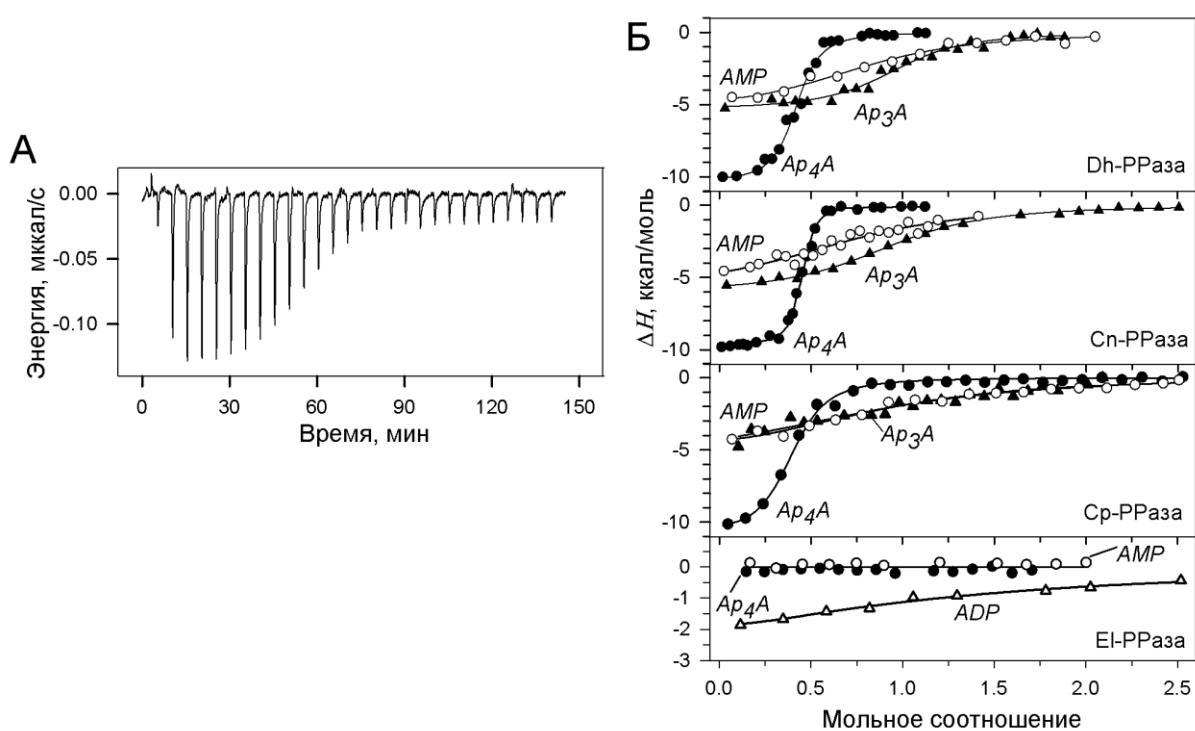


Рис. 44. ИТС–измерения связывания аденозиновых производных с CBS-PPазами. (А) Типичные исходные данные титрования Dh-PPазы раствором Ap₄A. (Б) Интегрированные данные титрования четырех CBS-PPаз выбранными лигандами с учетом разбавления. Концентрация ферментов была 4, 5, 3,5 и 2,5 мкМ для Dh-, Cn-, Cp- и E1-PPазы, соответственно. Линиями показаны лучшие аппроксимации для модели связывания в центрах одного типа.

Еще один важный вывод, заключался в том, что величина ΔH , в расчете на моль лиганда, была почти в два раза больше для Ap₄A и Ap₅A, чем для Ap₃A и аденозинолигофосфатов в титрованиях, DRTGG-содержащих CBS-PPаз. Это различие коррелировало с вдвое более низкой стехиометрией связывания для Ap₄A и Ap₅A по сравнению с таковой для аденозинолигофосфатов и Ap₃A.

Из-за очень высокой стабильности комплексов, значения $T\Delta S$ не могли быть оценены с достаточной точностью в большинстве титрований Ap_nA из-за невозможности определить K_N . Там, где значения K_N (и, следовательно, ΔG) были определены, в изменении свободной энергии

при связывании лиганда доминировала ΔH со значительным вкладом $T\Delta S$, вероятно, из-за гидрофобного эффекта. Значения K_N , полученные из измерений ИТС, находятся в удовлетворительном согласии с результатами, полученными из влияний аденозинолигофосфатов на активность CBS-PPаз (см. параграф 4.2.3. и табл. 8). Следует отметить, что измерения с использованием ИТС не позволяют идентифицировать положительную кооперативность связывания и дают среднее значение ΔH для всех центров связывания.

Таблица 13. Термодинамические параметры связывания лигандов с CBS-PPазами, полученные с помощью изотермической калориметрии (ИТС).

Фермент/лиганд	K_N , мкМ	n	ΔH , ккал/моль	$-T\Delta S$, ккал/моль
Dh-PPаза				
AMP	$0,8 \pm 0,3$	$0,79 \pm 0,05$	$-5,6 \pm 0,5$	$-2,7 \pm 0,6$
ADP	$1,0 \pm 0,2$	$0,85 \pm 0,04$	$-5,9 \pm 0,4$	$-2,4 \pm 0,5$
ATP	$1,2 \pm 0,1$	$0,80 \pm 0,02$	$-5,8 \pm 0,2$	$-2,4 \pm 0,2$
Ar ₃ A	$0,12 \pm 0,05$	$0,97 \pm 0,02$	$-5,3 \pm 0,2$	$-4,0 \pm 0,3$
Ar ₄ A	н.о.	$0,41 \pm 0,01$	$-10,4 \pm 0,3$	н.о.
Ar ₅ A	н.о.	$0,41 \pm 0,01$	$-10,3 \pm 0,3$	н.о.
Cn-PPаза				
AMP	$0,9 \pm 0,4$	$0,80 \pm 0,08$	$-5,9 \pm 0,9$	$-2,4 \pm 1,0$
ADP	5 ± 1	$0,91 \pm 0,08$	$-3,0 \pm 0,6$	$-4,1 \pm 1,0$
ATP	$0,6 \pm 0,2$	$0,89 \pm 0,07$	$-5,8 \pm 0,7$	$-2,8 \pm 1,1$
Ar ₃ A	н.о.	$0,94 \pm 0,01$	$-6,1 \pm 0,1$	н.о.
Ar ₄ A	н.о.	$0,44 \pm 0,01$	$-9,7 \pm 0,3$	н.о.
Cp-PPаза				
AMP	$0,97 \pm 0,03$	$0,87 \pm 0,06$	$-6,0 \pm 0,6$	$-2,3 \pm 0,7$
ADP	$2,6 \pm 0,5$	$0,94 \pm 0,09$	$-6,0 \pm 0,8$	$-1,6 \pm 0,3$
ATP	$0,23 \pm 0,06$	$1,00 \pm 0,03$	$-5,6 \pm 0,3$	$-3,6 \pm 0,9$
Ar ₃ A	$0,7 \pm 0,3$	$0,97 \pm 0,11$	$-5,7 \pm 1,1$	$-2,7 \pm 1,2$
Ar ₄ A	н.о.	$0,42 \pm 0,01$	$-10,4 \pm 0,3$	н.о.
Ei-PPаза				
AMP	-	-	$\leq 0,1$	-
ADP	9 ± 4	$0,95 \pm 0,11$	$-4,5 \pm 1,6$	$-2,4 \pm 2,0$
ATP	5 ± 1	$1,0 \pm 0,4$	-8 ± 4	$-0,5 \pm 0,3$
Ar ₃ A	-	-	$\leq 0,1$	-
Ar ₄ A	-	-	$\leq 0,1$	-

Таким образом: а) диаденозинполифосфаты (Ar_nA с $n = 3-6$) связываются с наномолярным средством с тремя CBS-PPазами и активируют их *in vitro*; б) Ar_nA активируют только CBS-PPазы, содержащие DRTGG-домен в регуляторной части; в) в отличие от аденозинолигофосфатов Ar_nA полностью снимают ($n > 3$) или значительно снижают ($n = 3$) кинетическую кооперативность CBS-PPаз, значительно уменьшая константу Михаэлиса и

увеличивая каталитическую константу не менее, чем в два раза; г) Ar_nA ($n > 3$) связываются некооперативно. Ещё одним отличием от аденозинолигофосфатов являлась стехиометрия связывания: Ar_nA с $n > 3$ связывались со стехиометрией 1 : 1 в расчете на димер CBS-PPазы, в отличие от 2 : 1 для Ar_3A и аденозинолигофосфатов.

Необходимость дополнительного DRTGG-домена для связывания Ar_nA с CBS-доменами предоставляет весьма интересное наблюдение. В структуре регуляторной вставки, как и в моделированной структуре полноразмерной Cp-PPазы, DRTGG-домен и пара CBS-доменов участвуют в образовании зоны контакта субъединиц в димерном ферменте [12]. Присутствие DRTGG-домена в CBS-PPазах, по-видимому, увеличивает полость связывания регуляторных лигандов или повышает гибкость CBS-доменов за счет их меньшего участия в образовании контакта между субъединицами, что позволяет им разместить объемные молекулы Ar_nA . Эта интерпретация подтверждается данными, показывающими, что E1-PPаза (параграф 4.2.3) и Mt-PPаза [61], не содержащие DRTGG-домен, связывают ATP на 1–2 порядка хуже, чем менее объемные AMP и ADP. В противоположность этому, такой дискриминации не наблюдается в DRTGG-содержащих CBS-PPазах (параграф 4.2.3). Следует отметить, что аминокислотные последовательности CBS-доменов в не содержащих DRTGG-домен CBS-PPазах (рис. 45) не содержат специфических мутаций, которые предотвращали бы связывание Ar_nA в CBS-доменах. Несмотря на то, что, как правило, аминокислотные остатки в CBS-доменах обладают низкой консервативностью, все остатки, участвующие в связывании лигандов, встречаются, по меньшей мере, в одной из не содержащих DRTGG-домен CBS-PPаз. Исходя из этих соображений, вряд ли можно ожидать связывание Ar_nA с сопоставимым сродством с многочисленными другими CBS-белками, в которых отсутствует DRTGG- или другой дополнительный домен между CBS-доменами.

Можно полагать, что связывание Ar_nA *in vivo* приводит к существенному изменению активности CBS-PPазы, особенно в условиях энергетического дефицита, когда концентрация альтернативного активатора, ATP, оказывается низкой. Хотя в норме внутриклеточные концентрации Ar_nA на четыре порядка ниже, чем концентрации аденозинолигофосфатов, концентрации Ar_nA могут возрасти на два порядка в условиях стресса [91, 92]. Кроме того, принимая во внимание их чрезвычайно высокое сродство, можно ожидать, что Ar_nA будут при этом эффективно конкурировать с аденозинолигофосфатами за связывание с CBS-PPазами. Повышение активности CBS-PPазы под действием Ar_nA , приведет к снижению концентрации PP_i и таким образом уменьшит его ингибирование многочисленных биосинтетических реакций, в которых PP_i является побочным продуктом [51]. Сродство CBS-PPаз к Ar_nA значительно превышает сродство любого из известных Ar_nA -связывающих белков и позволяет предположить, что CBS-PPаза является главной мишенью, связываясь с которой, Ar_nA

4.4.1. Eh-PPаза содержит мутацию в консервативном мотиве

Поиск в базе данных генов KEGG по состоянию на ноябрь 2015 года выявил 183 бактериальных и 8 архейных последовательностей CBS-PPаз, состоящих из 423–581 остатка. Все гены, как ожидается, кодируют активные PPазы, поскольку они содержат все полярные аминокислотные остатки, найденные в активных центрах канонических PPаза семейства II (рис. 46А) [93, 54]. Во всех найденных CBS-PPазах имеется регуляторная вставка в ДНН-домен, в большинстве CBS-PPаз состоящая из двух CBS-доменов и одного DRTGG-домена (рис. 46В). Стоит отметить, что 4 гена CBS-PPаз, найденных в базе данных генов KEGG, и 19 генов CBS-PPаз, найденных в базе данных белков NCBI, в том числе из *E. harbinense*, *M. thermoacetica* и *E. lenta*, содержат два CBS-домена, без DRTGG-домена в своей структуре (рис. 46Б).

Сравнение аминокислотной последовательности Eh-PPазы с пятью CBS-PPазами, описанными ранее, выявило два других важных различия (рис. 46Д). Во-первых, некоторые мутации в Eh-PPазе затрагивают остатки, соответствующие лиганд-связывающим остаткам в структуре комплекса регуляторной части Ср-PPазы с АМР или А_р4А [12]. Так, Lys100 Ср-PPазы (взаимодействует с Р^α производного аденозина) заменен глицином в Eh-PPазе. Кроме того, Val258 Ср-PPазы и петля RYRN, которые участвуют во взаимодействии (через стекинг, гидрофобные взаимодействия и водородные связи) с кольцом аденина, заменяются аспарагиновой кислотой и SAGR в Eh-PPазе. Хотя CBS-домены обычно имеют низкую консервативность остатков между видами, эти замены включают функционально важные остатки, и поэтому, как ожидается, могли серьезно повлиять на связывание лигандов с Eh-PPазой. Во-вторых, высококонсервативный мотив DHNE, обнаруженный в каталитической части пяти других CBS-PPаз на рис. 46Д и в большинстве других предполагаемых CBS-PPазах заменен на DHSE в Eh-PPазе. Подобная замена наблюдается только в CBS-PPазах из *Holdemania filiformis* и *Rubrobacter xylanophilus*. Интересно, что мутация аспарагин/серин является гораздо более распространенным в канонических PPазах семейства II, у которых отсутствует регуляторная часть, и встречается примерно у половины из почти 400 обнаруженных последовательностей PPаз семейства II.

4.4.2. Eh-PPаза не проявляет кинетическую кооперативность и не регулируется адениновыми производными

Как и ранее при исследовании CBS-PPаз (параграф 4.2.1.), мы использовали два типа параметров для характеристики кинетической кооперативности: коэффициент Хилла (*h*) и макро-

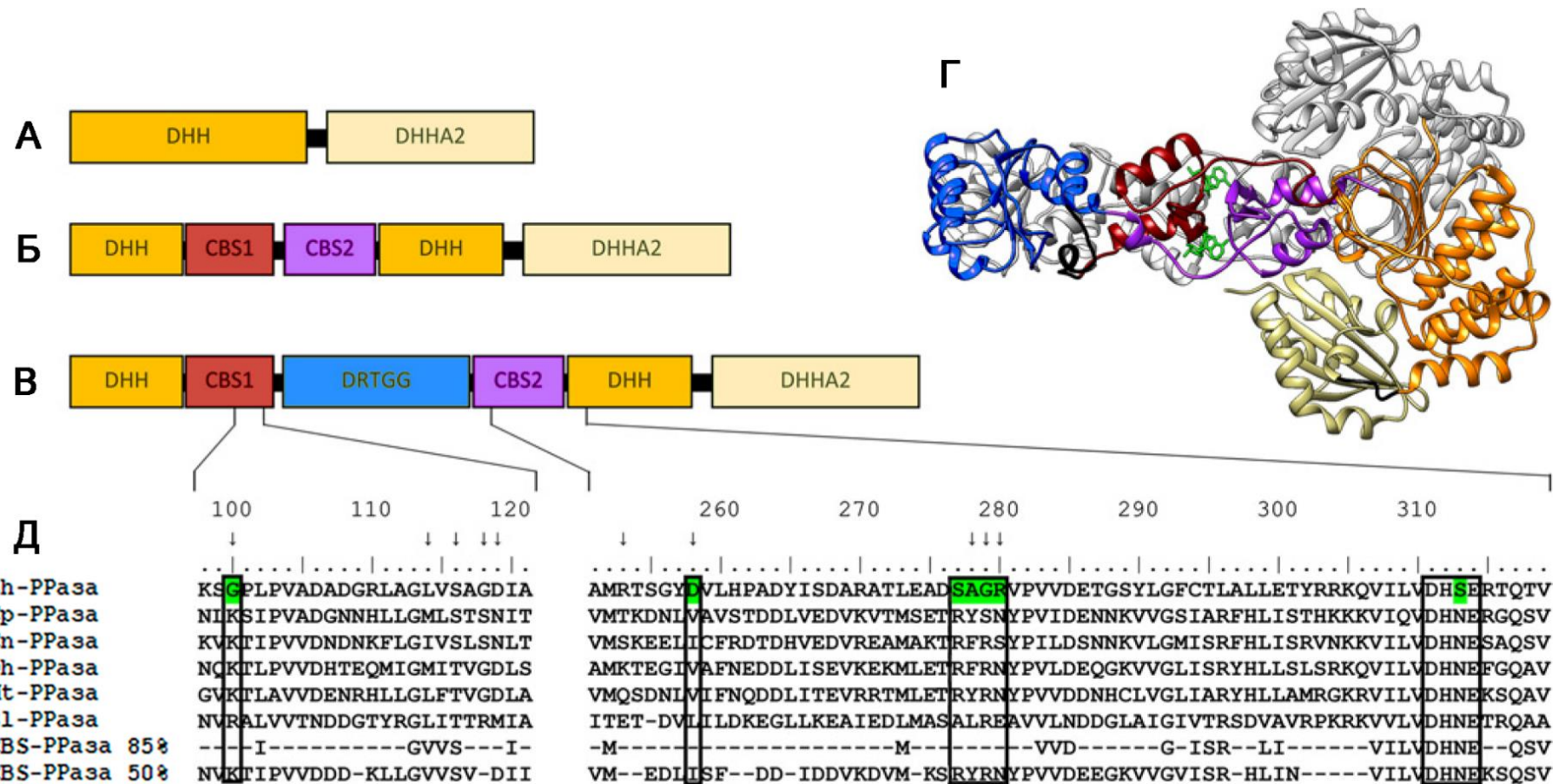


Рис. 46. Структурные аспекты пирофосфатаз семейства II. (А)–(В) Топология доменов канонических пирофосфатаз семейства II (А), Eh-PPазы (Б) и типичной CBS-PPазы, например Dh-PPазы (В). DHH и DHHA2 — каталитические домены; CBS1, CBS2 и DRTGG — домены, формирующие регуляторную часть внутри DHH домена. Последовательности соединительных линкеров показаны черным. (Г) Модель пространственной структуры димера CBS-PPазы [12], основанная на структурах гомологичных каталитических доменов канонической пирофосфатазы семейства II и регуляторной части CBS-PPазы. Домены одной субъединицы окрашены как на (В); вторая субъединица окрашена в серый цвет. Связанный АМР показан зеленым цветом. Д) Частичное выравнивание последовательностей шести CBS-PPаз. Номера остатков относятся к последовательности Ср-PPазы. Домены CBS1 и CBS2 образованы аминокислотными остатками 70–122 и 247–303, соответственно; остатки 311–319 относятся к DHH-домену. Остатки, отвечающие за связывание эффекторов, идентифицированные в структуре регуляторной вставки Ср-PPазы [12] помечены стрелками; важные заряженные остатки и мотивы выделены прямоугольниками. Важные отличия в первичной структуре Eh-PPазы отмечены зеленым цветом. Консенсусные последовательности, основанные на 85 и 50% идентичности 191 CBS-PPазы, указаны внизу.

скопические константы Михаэлиса K_{m1} и K_{m2} . С учетом известной зависимости кинетической кооперативности в CBS-PPазах от концентрации свободных ионов магния, кинетические исследования были выполнены в широком диапазоне концентраций последнего (0,05–20 мМ).

На основании вышеуказанных критериев, Eh-PPаза дикого штамма не проявляет существенную кинетическую кооперативность, что расходится с поведением четырех ранее охарактеризованных CBS-PPаз (параграф 4.2.1.). Так, коэффициент Хилла для Eh-PPазы незначительно отличался от единицы во всем диапазоне концентраций свободных ионов магния (рис. 47). Отношение констант $4K_{m1}/K_{m2}$ также было немного меньше единицы, но опять же разница была незначительной, так как этот параметр является более чувствительным показателем кооперативности.

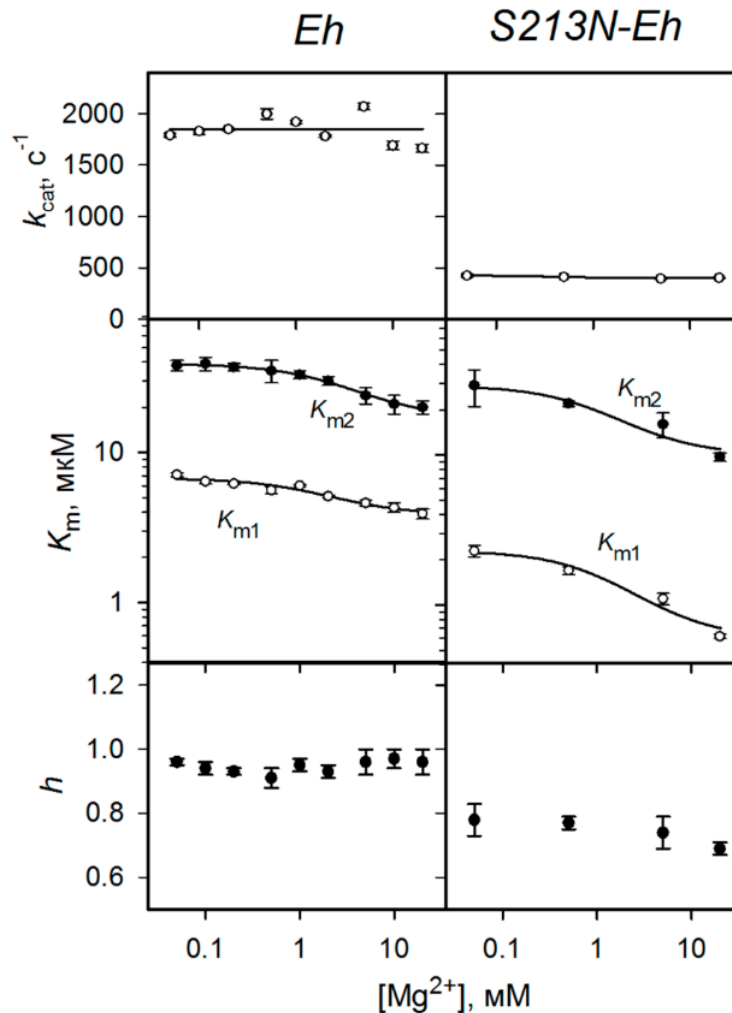


Рис. 47. Зависимость кинетической кооперативности в Eh-PPазе и S213N-Eh-PPазе от концентрации свободных ионов магния. Панели показывают (сверху вниз) каталитическую константу $k_{кат}$, константу Михаэлиса K_m и коэффициент Хилла h . Происхождение белков обозначено сверху. Линии для K_{m1} и K_{m2} соответствуют наилучшей аппроксимации уравнением (6).

Примечательно, что замена S213N привела к значительной отрицательной кооперативности для S213N-Eh-PPазы, уменьшив коэффициент Хилла до 0,7; отношение $4K_{m1}/K_{m2}$ уменьшилось до приблизительно 0,3 во всем диапазоне концентраций свободных ионов магния (рис. 47). Этот эффект был, в основном, обусловлен уменьшением K_{m1} . Мутация сохранила зависимость значений обеих K_m от концентрации свободных ионов магния, а также сохраняла значение константы связывания K_M , контролирующей эти зависимости (табл. 14). Каталитическая константа уменьшилась в 4,5 раза при замене Ser213.

Еще одна необычная особенность Eh-PPазы заключалась в ее нечувствительности ($\leq 10\%$ изменения активности) к фосфатным производным аденозина (AMP, ADP, АТР и Ar_nA с $n = 3-6$) в широком диапазоне концентраций субстрата (1–300 мкМ), свободных ионов магния (0,05–20 мМ) и лигандов (0,01–1000 мкМ для моноаденозинолигофосфатов и 10^{-5} –100 мкМ для диаденозинполифосфатов). Активность других CBS-PPаз, в том числе Dh-PPазы, изменялась в аналогичных опытах в несколько раз со всеми или большинством лигандов (параграфы 4.2.3 и 4.3.1). Замена S213N в Eh-PPазе не восстанавливала чувствительность к упомянутым производным аденозина.

4.4.3. Замена N312S в Dh-PPазе устраняет кинетическую кооперативность и обращает эффект Ar_4A на последнюю

Исследования варианта N312S-Dh-PPазы, который имитирует Eh-PPазу дикого штамма, были проведены для более убедительного доказательства роли остатка аспарагина в кинетической кооперативности. Эта замена уменьшила каталитическую константу k_{cat} в 32 раза (с 320 до 10 с^{-1}). Значения K_{m2} были очень похожи на аналогичные для Dh-PPазы дикого штамма (табл. 14). Тем не менее, влияние на K_{m1} было более важным с точки зрения кооперативности: этот параметр снизился на порядок при сохранении его зависимости от концентрации ионов магния. Как следствие, сильная положительная кинетическая кооперативность, характерная для дикого типа Dh-PPазы, исчезла полностью во всем диапазоне концентрации свободных ионов магния, на что указывают значения коэффициента Хилла и отношения констант $4K_{m1}/K_{m2}$, равные единице (рис. 48). Значения константы диссоциации для связывания иона магния в центре, контролирующем k_{cat} и обе константы Михаэлиса, были схожи в пределах погрешности определения и составили 0,05–0,1 мМ (табл. 14).

Для того, чтобы оценить влияние связывания лигандов на кинетическую кооперативность N312S-Dh-PPазы, мы измерили зависимости скорости гидролиза от концентрации субстрата для ряда фиксированных концентраций свободных ионов магния, но теперь в присутствии Ar_4A или

Таблица 14. Кинетические параметры гидролиза пирогосфата, полученные из зависимостей k_{cat} , K_{m1} и K_{m2} от концентрации свободных ионов магния.

Фермент	Значение параметра								
	Зависимость k_{cat}			Зависимость K_{m1}			Зависимость K_{m2}		
	$k_{\text{cat},0}$, с ⁻¹	$k_{\text{cat},\text{M}}$, с ⁻¹	K_{M} , мМ	$K_{\text{m1},0}$, мкМ	$K_{\text{m1},\text{M}}$, мкМ	K_{M} , мМ	$K_{\text{m2},0}$, мкМ	$K_{\text{m2},\text{M}}$, мкМ	K_{M} , мМ
с ⁻¹	с ⁻¹	мМ	мкМ	мкМ	мМ	мкМ	мкМ	мМ	
Eh-PPаза	-	1850 ± 50	-	6,7 ± 0,3	3,6 ± 0,5	4 ± 3	38 ± 1	17 ± 1	6 ± 2
S213N-Eh-PPаза	-	410 ± 20	-	2,3 ± 0,3	0,6 ± 0,3	5 ± 6	29 ± 4	10 ± 4	3 ± 4
Dh-PPаза ^a	-	320 ± 20	-	4,7 ± 0,5	60 ± 20	0,6 ± 0,2	-	11 ± 1	-
N312S-Dh-PPаза	4,9 ± 0,3	10,0 ± 0,1	0,10 ± 0,01	0,63 ± 0,12	3,00 ± 0,06	0,07 ± 0,02	1,68 ± 0,17	12,7 ± 0,1	0,05 ± 0,01
Dh-PPаза + Ар ₄ А ^{bc}	-	620 ± 20	-	-	3,5 ± 0,3	-	-	14 ± 4	-
N312S-Dh-PPаза + Ар ₄ А ^c	25 ± 3	169 ± 2	0,50 ± 0,04	33 ± 1	13,5 ± 0,6	0,8 ± 0,2	5,5 ± 0,4	2,2 ± 0,4	3 ± 2
N312S-Dh-PPаза + АМР ^d	4,3 ± 0,6	6,6 ± 0,2	0,22 ± 0,19	2,67 ± 0,03	0,82 ± 0,03	4,6 ± 0,6	9,4 ± 0,5	2,8 ± 0,1	11 ± 10

^a Данные из табл. 4.

^b Данные из табл. 10.

^c Концентрация Ар₄А была 10 мкМ.

^d Концентрация АМР была 50 мкМ.

AMP (рис. 48). Используемые концентрации лигандов были насыщающими, поскольку увеличение их концентраций не вызывало дополнительных эффектов. Данные, показанные на рис. 48, таким образом, относятся к комплексу фермент–лиганд и свидетельствуют о двух примечательных эффектах Ar_4A . Во-первых, он увеличил каталитическую константу во много раз, но этот эффект был подобен наблюдаемому ранее с Dh-PPазой дикого штамма. Во-вторых, в отличие от Dh-PPазы дикого штамма, N312S-Dh-PPаза со связанным Ar_4A проявляла сильную положительную кинетическую кооперативность: K_{m1} превышала K_{m2} во всем диапазоне концентраций свободных ионов магния. Коэффициент Хилла h и отношение констант $4K_{m1}/K_{m2}$ увеличились до 1,6 и 20–25 соответственно (рис. 48). Это было неожиданным результатом, так как эффект Ar_4A на Dh-PPазу и другие CBS-PPазы был обратен: он устранял кинетическую кооперативность. Кроме того, оба значения K_m уменьшались с увеличением концентрации ионов магния в N312S-Dh-PPазе, в то время как K_{m1} увеличивалась, а K_{m2} оставалась постоянной в Dh-

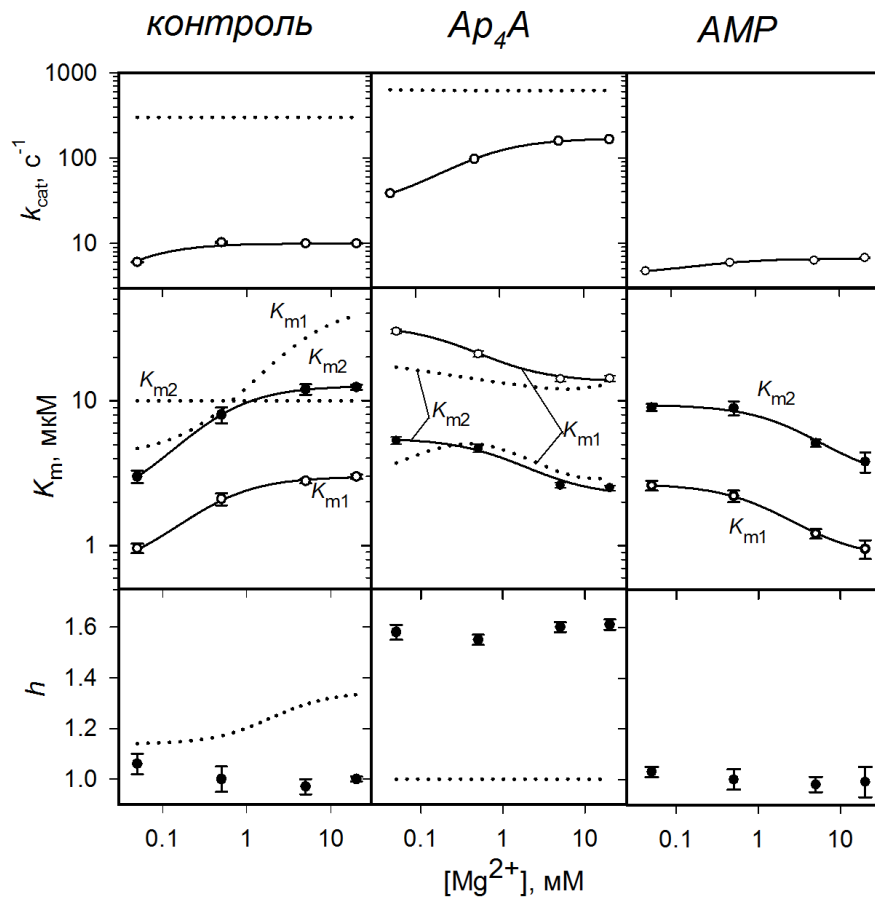


Рис. 48. Зависимость кинетической кооперативности Dh-PPазы и N312S-Dh-PPазы в отсутствие и в присутствии 50 мкМ AMP или 10 мкМ Ar_4A от концентрации свободных ионов магния. Панели показывают (сверху вниз) каталитическую константу k_{cat} , константу Михаэлиса K_m и коэффициент Хилла h . Пунктирные линии показывают ранее полученные параметры для WT Dh-PPазы (рис. 33 и 42); линии для K_{m1} и K_{m2} соответствуют наилучшей аппроксимации уравнением (6), линии для k_{cat} соответствуют наилучшей аппроксимации уравнением (7). Значения K_m приведены в терминах комплекса $MgPP_i$.

РРазе дикого штамма. Важно, что замена N312S не изменяла спектр кругового дихроизма в дальней ультрафиолетовой области спектра Dh-РРазы и седиментационный профиль (Приложение Б), что исключало большое изменение третичной или четвертичной структуры в качестве объяснения описанных эффектов.

В противоположность этому, связывание АМР не вызывало появления кинетической кооперативности в N312S-Dh-РРазе (рис. 48). Этот лиганд только уменьшал каталитическую константу в два раза и изменял зависимость значений K_m от концентрации свободных ионов магния.

В присутствии 50 мкМ АТР и 5 мМ концентрации свободных ионов магния, кинетика гидролиза N312S-Dh-РРазы также осталась некооперативной, каталитическая константа выросла в 1,5 раза, а среднее значение K_m ($\sqrt{K_{m1}K_{m2}}$) увеличилось приблизительно в 5,5 раз (с 6 ± 1 до 33 ± 5 мкМ). Соответственно, АТР действовал в качестве ингибитора N312S-Dh-РРазы при низких концентрациях субстрата. С ферментом дикого штамма, кинетика гидролиза оставалась положительно кооперативной в присутствии АТР, каталитическая константа аналогичным образом увеличивалась, но $\sqrt{K_{m1}K_{m2}}$ уменьшался в 2 раза, что делало АТР активатором при всех концентрациях субстрата.

Почему Ар₄А устраняет кинетическую кооперативность в CBS-РРазе дикого штамма, но вызывают ее в мутантном варианте фермента, и почему мононуклеотиды не влияют на оба типа кооперативности? В отличие от аденозинолигофосфатов, Ар₄А связывается одновременно через аденозиновые группы с регуляторными центрами обеих субъединиц (параграф 4.3.4), что делает структуру димерной CBS-РРазы более жесткой. Можно поэтому предположить, что взаимодействие субъединиц должно быть соответствующим образом сбалансировано, чтобы обеспечить передачу конформационных изменений между ними. Иными словами, для того, чтобы данный тип регуляции был возможен, взаимодействие не должно быть слишком слабым (как в мутантном варианте Dh-РРазы в отсутствие Ар₄А) или слишком сильным (как в комплексе Dh-РРазы дикого штамма с Ар₄А).

4.4.4. N312S-Dh-РРазы сохраняет кооперативность связывания производных аденозина

Зависимости активности N312S-Dh-РРазы от концентрации лигандов также измеряли при фиксированных концентрациях субстрата и ионов магния. В первой серии опытов мы оценили влияние ряда нуклеотидов при их насыщающих концентрациях (табл. 15). Качественно, эффекты были такими же как для Dh-РРазы дикого штамма, но были гораздо больше в большинстве случаев. То, что эффект АТР изменил знак (он стал ингибитором) объясняется большим

увеличением K_m в случае N312S-Dh-PPазы, которое перекрывало небольшое увеличение каталитической константы при ненасыщающих концентрациях субстрата.

Таблица 15. Влияние лигандов на активность N312S-Dh-PPазы при 50 мкМ MgPP_i и 5 мМ Mg²⁺.

Лиганд	Концентрация, мкМ	v_N/v_0^a	
		N312S-Dh-PPаза	WT Dh-PPаза
AMP	100	0,45 ± 0,01	0,037 ± 0,001 ^b
ADP	100	0,53 ± 0,01	0,09 ± 0,01 ^b
АТР	100	0,75 ± 0,01	2,5 ± 0,2 ^b
Ар ₃ А	10	8,6 ± 0,3	2,54 ± 0,01 ^c
Ар ₄ А	10	13,0 ± 0,6	3,0 ± 0,1 ^c
Ар ₅ А	10	6,0 ± 0,1	3,32 ± 0,06 ^c
Ар ₆ А	10	1,92 ± 0,03	2,58 ± 0,06 ^c

^a Значение v_0 было 9,2 и 220 с⁻¹ для N312S-Dh-PPазы и WT Dh-PPазы, соответственно.

^b Данные из табл. 5.

^c Данные из табл. 9.

Кооперативность связывания лигандов анализировали с использованием AMP и Ар₄А как наиболее эффективных модуляторов N312S-Dh-PPазы. На рис. 49 представлены типичные профили активности при 50 мкМ концентрации субстрата в присутствии 5 мМ концентрации свободных ионов магния. Значения параметров, полученные по уравнениям (8) и (9) из этих и аналогичных профилей при других концентрациях субстрата, приведены в табл. 16.

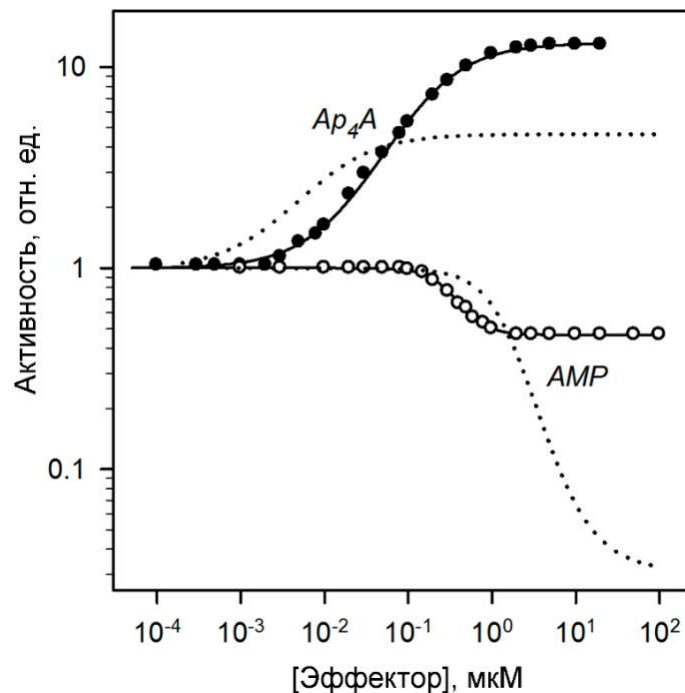


Рис. 49. Зависимость активности N312S-Dh-PPазы от концентрации эффекторов при постоянных концентрациях субстрата (50 мкМ MgPP_i) и свободных ионов магния (5 мМ Mg²⁺). Пунктирными линиями показаны данные для Dh-PPазы дикого штамма. Активность в отсутствие лигандов (9,2 с⁻¹) была принята за единицу.

Таблица 16. Кинетические параметры связывания эффекторов с N312S-Dh-PPазой при различных концентрациях субстрата в присутствии 5 мМ Mg²⁺.

Эффектор	MgPP _i , мкМ	v_N/v_0	K_{N1} , нМ	K_{N2} , нМ	$\sqrt{K_{N1}K_{N2}}$, нМ	h
AMP	1	1,00 ± 0,02	-	-	-	-
	50	0,44 ± 0,01 (0,037) ^a	2000 ± 2000	520 ± 50	330 ± 10 (1390) ^a	2,4 ± 0,2
	300	0,65 ± 0,02 (0,035) ^a	2800 ± 900	70 ± 20	440 ± 10 (1830) ^a	1,84 ± 0,04
Ar ₄ A	1	4,2 ± 0,2 (18) ^a	7 ± 1	28 ± 3	14 ± 1 (12,1) ^a	1,02 ± 0,04
	50	13 ± 1 (3,0) ^a	92 ± 5	370 ± 20	186 ± 5 (4,9) ^a	1,00 ± 0,02
	300	12 ± 1 (1,9) ^a	140 ± 10	550 ± 60	270 ± 10 (4,3) ^a	1,00 ± 0,04

^a Значения в скобках для Dh-PPазы дикого штамма взяты из табл. 5 и 9.

Как показали величины коэффициента Хилла (h) и отношения $4K_{N1}/K_{N2}$, связывание АМР происходило с положительной кооперативностью, в то время как Ap_4A связывался некооперативно во всем диапазоне концентраций субстрата, как это имело место и для фермента дикого штамма в обоих случаях. Величина средней константы ингибирования для АМР ($\sqrt{K_{N1}K_{N2}}$) была приблизительно в 4 раза ниже для мутантного фермента (0,33 по сравнению с 1,39 мкМ для WT). Для Ap_4A значения $\sqrt{K_{N1}K_{N2}}$ были одинаковыми для двух форм фермента при низких концентрациях субстрата, но заметно возрастали с увеличением концентрации субстрата для мутантной формы фермента, и немного уменьшались для фермента дикого штамма. Кроме того, степень активации Ap_4A (v_N/v_0) изменялась в противоположных направлениях для двух форм фермента при изменении концентрации субстрата.

4.4.5. Мутация не влияет на термодинамику связывания производных аденозина

Влияние замены N312S в Dh-PPазе на связывание АМР и Ap_4A было также оценено методом ИТС (рис. 50). Эти результаты суммированы в табл. 17, наряду с ранее описанными данными для Dh-PPазы дикого штамма (параграф 4.3.4). И в этих опытах величины K_N и, соответственно, $T\Delta S$ для Ap_4A нельзя было оценить с достаточной точностью, потому что связывание очень прочное. Пожалуй, единственный эффект АМР состоял в увеличении примерно в 2 раза константы связывания K_N N312S-Dh-PPазы. Значения ΔH и $T\Delta S$, где было возможно их определе-

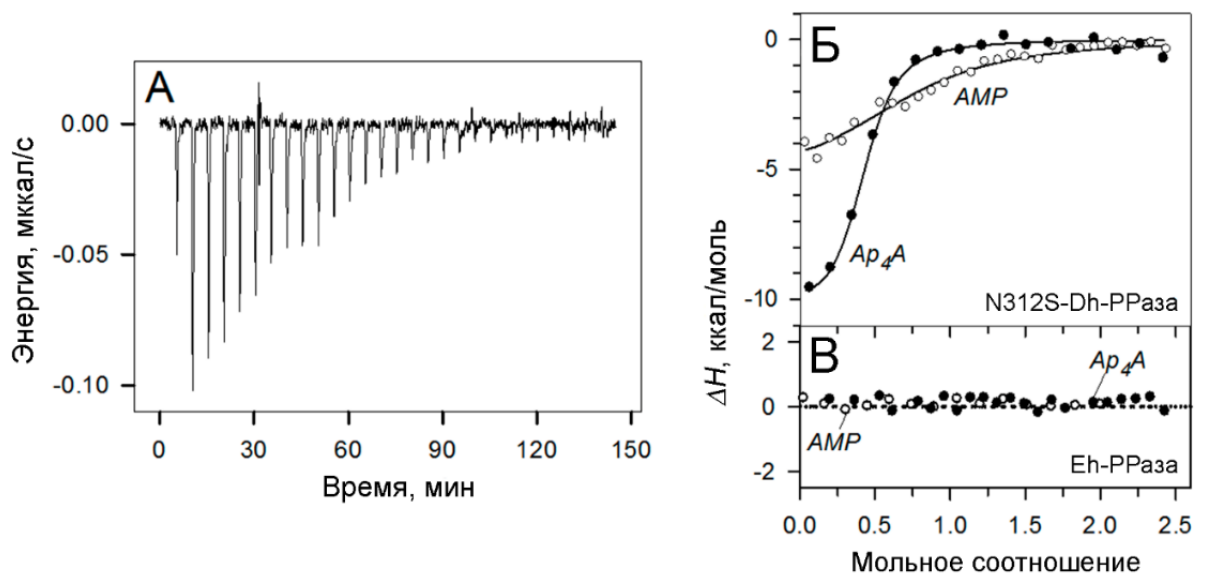


Рис. 50. Измерения связывания аденозиновых производных с CBS-PPазами методом ИТС. (А) Типичные исходные данные титрования N312S-Dh-PPазы раствором АМР. (Б) Интегрированные данные титрования N312S-Dh-PPазы выбранными моно- и диаденозинолигофосфатами с учетом разбавления. (В) Тоже самое для Eh-PPазы. Линиями показаны лучшие аппроксимации для модели связывания в центрах одного типа.

ние, были похожи, также, как и стехиометрия связывания. Обе формы фермента были способны связывать в два раза больше молекул АМР, чем Ар₄А в соответствии с кристаллической структурой регуляторной части Ср-РРазы, в которой одна молекула Ар₄А занимает два АМР-связывающих центра [12].

Выделение тепловой энергии ($\Delta H < 0,3$ ккал/моль по абсолютной величине) не наблюдалось в аналогичных экспериментах по связыванию АМР и Ар₄А с Eh-РРазой дикого штамма, и с вариантом S213N, подтверждая, что ни один из них не способен связывать эти лиганды.

Таблица 17. Термодинамические параметры связывания лигандов с CBS-РРазами, полученные с помощью изотермической калориметрии.

Фермент/лиганд	K_N , мкМ	n	ΔH , ккал/моль	$-T\Delta S$, ккал/моль
Dh-РРазы^a				
АМР	$0,8 \pm 0,3$	$0,79 \pm 0,05$	$-5,6 \pm 0,5$	$-2,7 \pm 0,3$
Ар ₄ А	н.о.	$0,41 \pm 0,01$	$-10,4 \pm 0,3$	н.о.
N312S-Dh-РРазы				
АМР	$1,4 \pm 0,2$	$0,75 \pm 0,06$	$-5,6 \pm 0,6$	$-2,4 \pm 0,3$
Ар ₄ А	н.о.	$0,40 \pm 0,06$	$-10,9 \pm 0,7$	н.о.

^a Данные из табл. 13.

4.4.6. Молекулярно-динамическое моделирование подтвердило важность остатка аспарагина для взаимодействия активных центров CBS-РРазы

Для того, чтобы получить представление о структурной роли остатка аспарагина, мы проанализировали трехмерную структуру гомодимера Vs-РРазы [57]. Субъединица этой РРазы семейства II образована только двумя доменами, которые гомологичны каталитическим ДНН- и ДННА2-доменам CBS-РРаз (44% идентичных и 75% похожих остатков), имеет идентичный активный центр, и расположенный поблизости остаток аспарагина (Asn77) в консервативном мотиве DHNE. Фермент проявляет слабую, но статистически значимую кинетическую кооперативность ($h = 1,14 \pm 0,02$). Структура Vs-РРазы определена с разрешением $1,75 \text{ \AA}$ (рис. 51A) и содержит связанный в активном центре имидодифосфат (PNP) — аналог пирофосфата (PP_i) с NH-группой вместо мостикового O, четыре иона магния (Mg²⁺) и фторид-ион (F⁻), заменяющий нуклеофильный гидроксид-ион [57]. Перед моделированием, все органические молекулы и сульфат-ионы, были удалены из обеих субъединиц, а F⁻ был заменен вручную на OH⁻, чтобы лучше имитировать продуктивный фермент-субстратный комплекс. Кроме того, молекула PNP была удалена из одной субъединицы, чтобы имитировать состояние, при котором проявля-

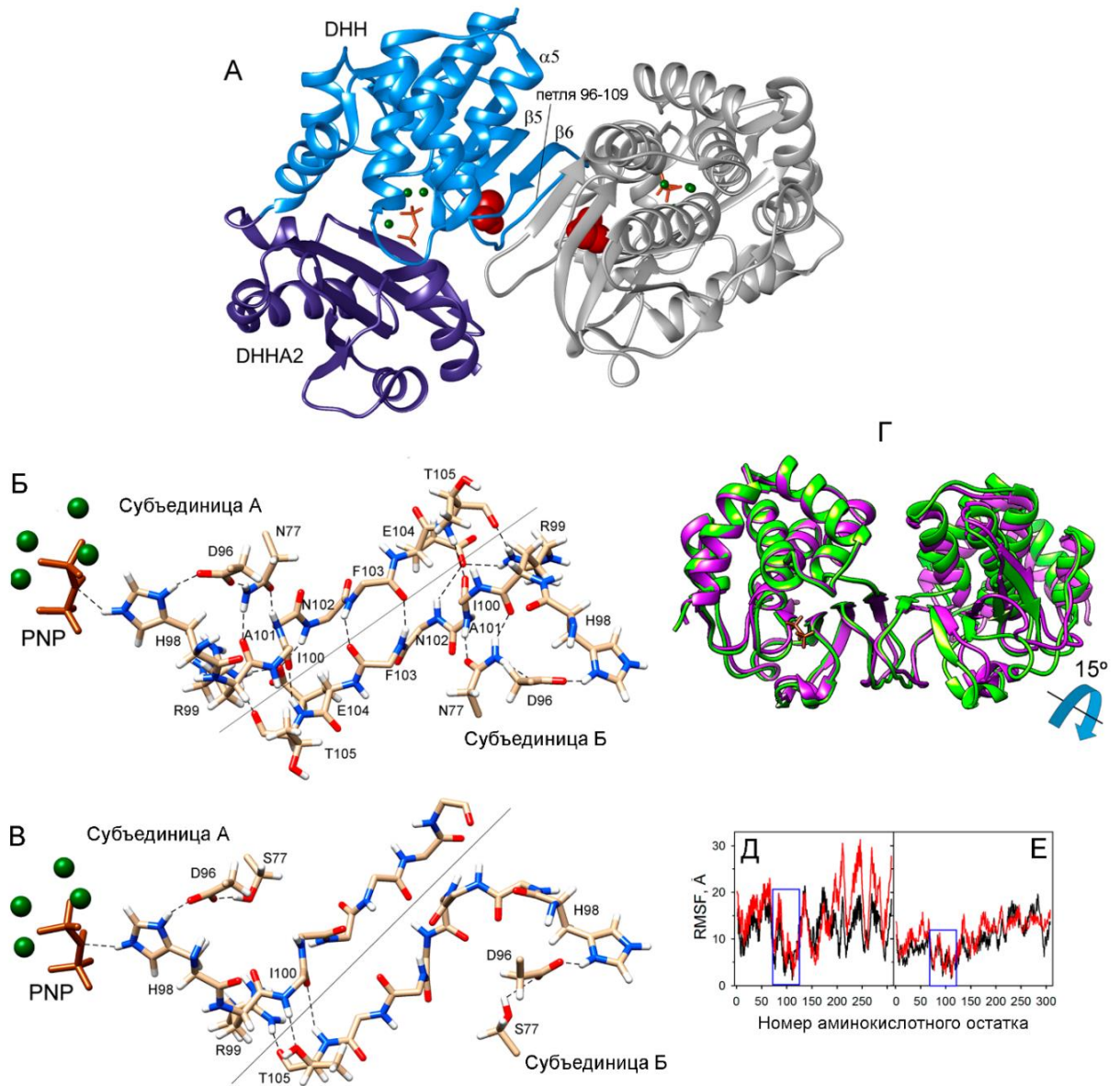


Рис. 51. Структуры Bs-PPазы и её варианта N77S. (А) Кристаллическая структура димера Bs-PPазы в комплексе с PNP (показан оранжевым цветом) и четырьмя ионами магния (зеленые сферы) (код PDB: 2HAW). Домены белка (окрашены в различные цвета), петля 96–109, тяжи $\beta 5$ и $\beta 6$, и спираль $\alpha 5$ обозначены для одной субъединицы. Asn77 показан красными сферами в обеих субъединицах. (Б) и (В) Контакт петель 96–109 в равновесной симулированной структуре WT (Б) и варианта N77S (В) Bs-PPазы. (Г) Сравнение пар DHH-доменов симулированной структуры WT (окрашены в зеленый цвет) и варианта N77S (окрашены в фиолетовый цвет) Bs-PPазы. Структуры были совмещены по их левым DHH-доменам, содержащим PNP. Стрелкой указано направление поворота правого DHH-домена варианта N77S относительно WT Bs-PPазы. (Д) и (Е) Распределение значений RMSF для боковых групп аминокислотных остатков отдельных полипептидных цепей в симулированных структурах WT (Д) и варианта N77S (Е) Bs-PPазы для субъединиц А (черные кривые) и Б (красные кривые). Аминокислотные остатки в участках 72–125, заключенные в синие прямоугольники, относятся к активному центру и межсубъединичному контакту.

ется кооперативное связывание субстрата. Свободные энергии Bs-PPазы дикого штамма и его виртуального N77S-варианта были затем минимизированы в водной среде с помощью

молекулярно-динамического моделирования. Помимо всего прочего, эта процедура уменьшала возможные структурные искажения кристаллического состояния. Равновесные моделированные структуры показали незначительные отклонения от кристаллической структуры (RMSD для всех атомов основной цепи (кроме водородов) было около 2 и 3 Å для Bs-PPазы дикого штамма и N77S-Bs-PPазы соответственно) (Приложение В). Что более важно, в моделированных структурах были выявлены значительные различия в области контакта субъединиц.

Межсубъединичные контакты в Bs-PPазе формируются за счёт тяжа $\beta 6$ и петли (остатки 96–109), которая соединяет тяжи $\beta 5$ и $\beta 6$ ДНН-домена (рис. 51А). Поскольку взаимодействующие тяжи $\beta 6$ из двух субъединиц являются частями объединенного β -листа из 12 тяжей, который проходит через оба ДНН-домена, то указанная петля является наиболее вероятным кандидатом для передачи конформационных изменений через интерфейс субъединиц. В соответствии с этим предсказанием, замена N77S не влияла на четыре водородные связи, соединяющие кристаллографически несимметричные тяжи $\beta 6$, но серьезно нарушала взаимодействие между петлями. Так, в кристаллической структуре Bs-PPазы дикого штамма [57] петля образует симметричные пары водородных связей, Phe100–Thr105 (O...N и N...O γ) и Arg99–Thr105 (N ω ...O), и одну водородную связь Asn102–Glu104 (H...O ϵ) с кристаллографически несимметричной петлей другой субъединицы, и только одну внутрисубъединичную водородную связь Arg79–Asn102 (N...O). В моделированной структуре Bs-PPазы дикого штамма, две симметричные межсубъединичные водородные связи Arg79–Asn102 замещались дополнительной водородной связью Asn102–Glu104 (N...O ϵ) и двумя парами симметричных водородных связей Arg99–Glu104 (N ω ...O ϵ) и Phe103–Phe103 (N...O) (рис. 51Б).

В противоположность этому, петля в мутантной форме Bs-PPазы потеряла большую часть вышеупомянутых межсубъединичных водородных связей: были обнаружены только связи Phe100–Thr105 (O...N и N...O γ) и Arg99–Thr105. (N ω ...O) (рис. 51В). Кроме того, было обнаружено усиление внутрисубъединичных водородных связей между Arg112 тяжа $\beta 6$ и Glu129 спирали $\alpha 5$ по сравнению со структурой дикого штамма. Как следствие, ДНН-домены оказались повернутыми в мутантной Bs-PPазе по отношению друг к другу на 15° (рис. 51Г). Резкое изменение в межсубъединичных водородных связях явно произошло в результате изменившихся водородных связей остатка 77. В кристаллической структуре Bs-PPазы дикого штамма, боковая цепь Asn77 каждой субъединицы участвует в трех водородных связях в одинаковых субъединицах: с Asp96 (N δ ...O $\delta 2$), Arg99 (N δ ...O) и Ala101 (O δ ...N). Arg99 и Ala101 относятся к петле 96–109, в то время как Asp96 является частью консервативного мотива ДНН в активном центре. Все эти водородные связи Asn77 сохранились в моделированной структуре Bs-PPазы дикого штамма (рис. 51Б), в то время как остаток Ser77 в мутантной форме образует только одну водородную связь: с Asp96 (O γ ...O $\delta 2$) (рис. 51В). Кроме того, водородная связь Ser77

позиционирует этот остаток иначе по отношению к Asp96 из-за различных размеров боковых цепей серина и аспарагина. Поэтому мотив DHNE в диком штамме и мотив DHSE в мутанте Bs-PPазы имели почти идентичные структуры (RMSD 0,4 Å), но мотив DHSE был смещен приблизительно на 4 Å в мутантном ферменте.

Уменьшение количества водородных связей на границе интерфейса субъединиц предполагало повышенную гибкость в этой области N77S-варианта. Это предсказание подтвердилось анализом подвижности боковых групп остатков, характеризуемой величиной RMSF (среднеквадратичной флуктуации) (рис. 51Д,Е). Зависимости RMSF остатков по длине цепи были качественно похожими для субъединиц внутри каждого белка и между белками. Однако, колебания были значительно меньше в N77S-варианте белка, в соответствии с его пониженной взаимозависимостью субъединиц. Следует отметить, что остатки 72–125 (отмечены синим прямоугольником на рис. 51Д,Е), в зоне контакта субъединиц, а также мотивы DHNE/DHSE и DHH активного центра, показывали наименьшие колебания.

В заключение этой главы, можно отметить, что влияние мутации N312S в каталитической части Dh-PPазы полностью согласуется с концепцией «автоингибирования», если принять, что эта мутация дополнительно «внутренне ингибирует» PPазу. Результатом являются более значительным эффекты большинства активаторов и менее значительные эффекты ингибиторов.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе были исследованы CBS-PPазы из пяти грамположительных анаэробных бактерий, относящихся к типам Фирмикуты (*D. hafniense*, *C. novyi*, *C. perfringens* и *E. harbinense*) и Актинобактерии (*E. lenta*). Три бактерии (*C. novyi*, *C. perfringens* и *E. lenta*) являются патогенными и найдены в желудочно-кишечном тракте человека. *D. hafniense* обнаружена в почве и способна к восстановительному дехлорированию хлорфенолов [94]. *E. harbinense* обнаружена в сточных водах и способна синтезировать этанол [95]. В трех из этих бактерий (исключая *C. perfringens* и *E. harbinense*) в метаболизме пирофосфата участвует и мембранная РРаз [66], которая сопрягает гидролиз пирофосфата с образованием мембранного потенциала. В этих бактериях дифференциальная регуляция CBS-PPазы производными аденозина, концентрации которых зависят от энергетического состояния клетки, имеет исключительно большое значение для жизнеспособности организма.

Наши исследования CBS-PPаз, изложенные в главах 4.2 и 4.3, выявили положительную кооперативность в связывании эффекторов в регуляторном центре и в катализе в активном центре. Установленные в данной работе два типа положительной кооперативности (кинетическая кооперативность и кооперативность связывания регулирующих лигандов) делают CBS-PPазу очень чувствительной к изменениям энергетического состояния клетки (соотношения аденозинолигофосфатов). Это позволяет более тонко регулировать ее активность и, следовательно, уровень пирофосфата, определяющего во многом скорости биосинтетических реакций. Способность DRTGG-содержащей CBS-PPазы связывать Ar_nA делает ее мишенью для этих «алармонов», появляющихся при клеточном стрессе. Можно предположить, что активация CBS-PPазы при связывании Ar_nA помогает клетке выйти из стресса за счет возобновления клеточного биосинтеза, заингибированного пирофосфатом в условиях стресса. Следует отметить, что кинетическая кооперативность в регуляции других белков CBS-доменами осталась практически незамеченной. Можно лишь упомянуть публикацию Лабесса и др. [7], в которой они сообщили о том, что IMPDH связывает свой субстрат, IMP, с положительной кооперативностью, которая устраняется мутацией одного остатка в CBS-домене.

Соответственно, регуляция CBS-PPаз включает в себя три пути обмена информации (глава 4.2): между регуляторными и каталитическими центрами (влияние лигандов на активность), между регуляторными центрами (кооперативность связывания лигандов), и между каталитическими центрами (кинетическая кооперативность). Результаты, приведенные в главе 4.4, определили остаток аспарагина в консервативном мотиве DHNE, вовлеченный во все три пути передачи информации, прежде всего для связи активных центров.

То, что остаток аспарагина требуется для «общения» активных центров, следует из устранения кинетической кооперативности при его замене на серин в Dh-PPазе и отсутствия кинетической кооперативности в Eh-PPазе дикого штамма, содержащей аналогичную мутацию. Обратная замена серина на аспарагин в Eh-PPазе частично восстанавливала кинетическую кооперативность, хотя и противоположного знака. В противоположность этому, замена аспарагина на серин не повлияла на кооперативность связывания лигандов, величина K_N для АМР изменилась всего в два раза для свободной Dh-PPазы (табл. 17), и незначительно изменилась величина $\sqrt{K_{N1}K_{N2}}$ (среднее геометрическое констант связывания эффектора, которое равно K_N в случае некооперативного связывания) для связывания Ар₄А в присутствии 1 мкМ субстрата (т.е. в условиях, когда преобладает свободный от субстрата фермент) (табл. 16).

Моделирование и молекулярно-динамические эксперименты дали структурное объяснение роли аспарагина во взаимозависимости активных центров CBS-PPаз. Так как трехмерная структура CBS-PPазы неизвестна, эти эксперименты были проведены с использованием гомологичной Vs-PPазы у которой отсутствуют CBS-домены и известна кристаллическая структура. Этот выбор оправдан тем, что удаление регуляторной вставки не инактивирует Dh-PPазу (параграф 4.2.2) и другие CBS-белки [19, 89, 90]. С другой стороны, использование такой "укороченной" PPазы имело то преимущество, что интерпретация влияния замещения остатков на связь между активными центрами становится более однозначной. Моделированные структуры обнаружили существенное разрушение сети водородных связей в области, отделяющей активный центр и зону контакта субъединиц при замене аспарагина на серин в Vs-PPазе, что препятствует передаче структурных изменений, лежащих в основе кооперативности, между ДНН-доменами. Эта область структуры, вероятно, участвует также в коммуникации между регуляторными и активными центрами в CBS-PPазах, что прежде всего следует из качественного изменения влияния Ар₄А на кинетическую кооперативность при замене аспарагина в Dh-PPазе. Примечательно в этом отношении то, что регуляторная вставка отделена в ДНН-домене всего семью остатками от остатка аспарагина. Участие ДННА2-домена, соединенного с ДНН-доменом через гибкий линкер, в регулировании можно считать маловероятным.

Центральная роль остатка аспарагина в регуляции CBS-PPазы по-видимому, объясняется его близостью к активному центру. Одна из водородных связей, образованных Asn77 в Vs-PPазе дикого штамма, соединяет его с Asp96, который является важным остатком активного центра, позиционирующим остаток His98, который протонирует уходящую фосфатную группу [54]. Кроме того, Asn77 отделен только одним остатком от Asp75, пожалуй, самого важного остатка в катализе PPазой. Asp75 является мостиком между двумя ионами металла (M1 и M2), которые, вместе с третьим ионом металла (M4), образуют уникальный центр из трех ионов металла,

координирующий нуклеофильную молекулу воду и превращающий ее в высоко-реакционноспособный ион OH^- [57]. Два непосредственных соседа Asn77 в консервативном мотиве DHNE, His76 и Glu78, также важны для катализа, так как их консервативные замены в Bs-PPазе уменьшали ее каталитическую активность более чем в 100 раз [96].

Идентификация остатка аспарагина, как ключевого элемента для сообщения между активными центрами димера CBS-PPазы, позволила нам продвинуться в изучении механизма передачи сигнала между активными и регуляторными центрами CBS-PPазы. В работе наших финских коллег [12] ранее были предложены два возможных пути передачи сигнала в CBS-PPазе (рис. 52) — через сегмент остатков 319-334 каталитического ДНН-домена, включающий мотив ДНН, и находящийся вблизи спирали $\alpha 2$ CBS2-домена (центр связывания S2), или сегмент остатков 306-318 того же домена, включающий мотив DHNE, и находящийся вблизи спирали $\alpha 1$ CBS2-домена (центр связывания S1). Результаты настоящей работы показывают, что более вероятным является последний путь, поскольку именно в нем участвует остаток аспарагина, существенный не только для взаимодействия активных центров димерной CBS-PPазы (кинетической кооперативности), но и для передачи сигнала из регуляторных CBS-доменов (инверсии влияния Ар4А на кинетическую кооперативность). Кроме того, исходя из структуры регуляторной части, петля между спиралью $\alpha 1$ и тяжем $\beta 2$, частично содержащим мотив RYRN, и сам тяж $\beta 2$ CBS2-домена участвуют в связывании пуринового основания аденозина (центр связывания S1), что делает более вероятным передачу сигнала в каталитические домены через эти элементы, чем через спираль $\alpha 2$ (незаполненный центр связывания S2).

CBS домены, обнаруженные во многих белках, известны своей способностью связывать разнообразные производные аденозина и таким образом регулировать активности своих белков-носителей (CBS-белков). Установление механизма регуляции является важным для понимания работы CBS-белков. Можно надеяться, что обнаруженные закономерности влияния CBS-доменов в CBS-PPазах проявляются и в других CBS-белках.

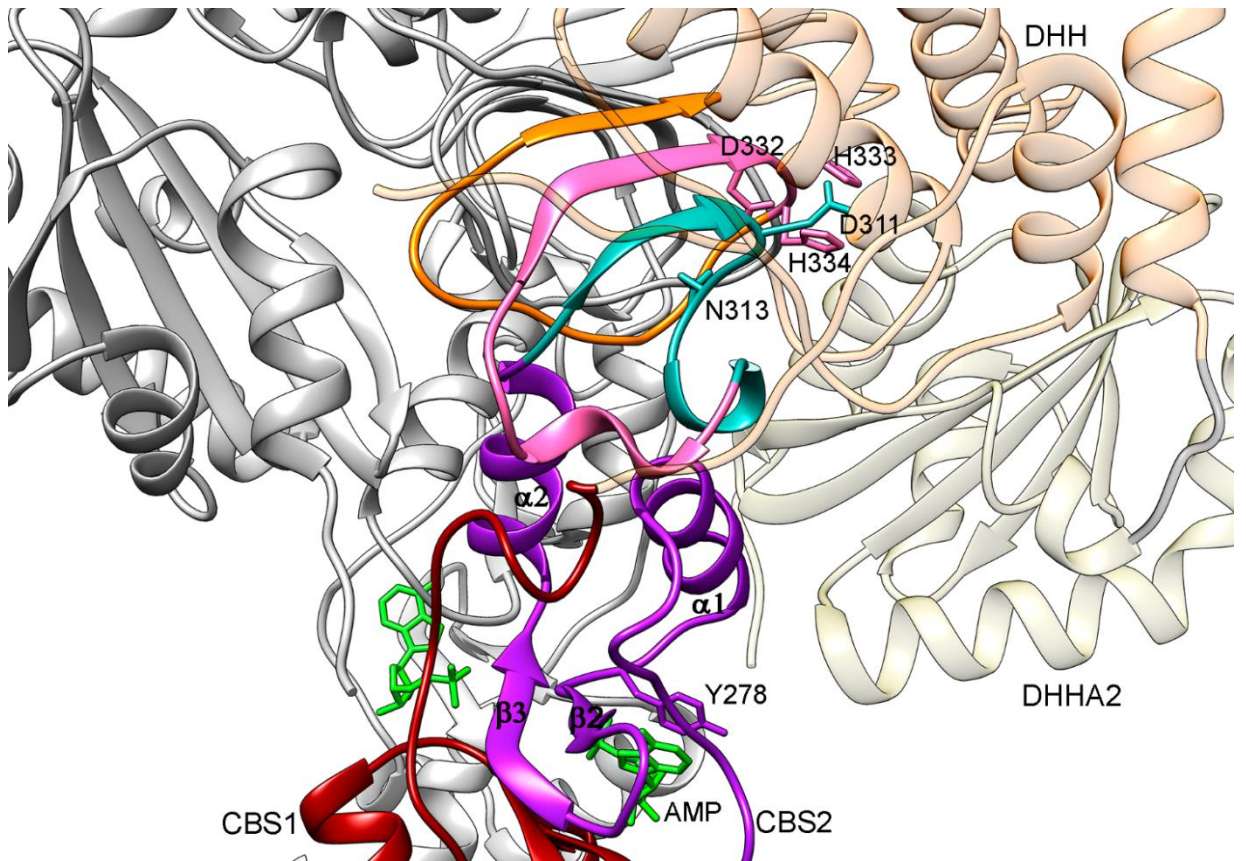


Рис. 52. Два возможных пути передачи сигнала из регуляторных центров в каталитические в модели Ср-PPазы. Окрашивание и обозначения доменов соответствуют рис. 46. Показаны некоторые важные аминокислотные остатки активного центра (мотивы DHH и DHNE), а также остаток тирозина (Y278) мотива RYSN, участвующий в связывании AMP. Нумерация α -спиралей и β -тяжей относится к CBS2-домену. Первый возможный путь передачи сигнала (остатки 319-334) окрашен в розовый цвет, второй путь (остатки 306-318) окрашен в бирюзовый.

ВЫВОДЫ

1. CBS-PPаза является гомодимерным белком, который диссоциирует на неактивные субъединицы при разбавлении.
2. Димерная CBS-PPаза проявляет положительную кинетическую кооперативность: связывание субстрата в одном активном центре облегчает его связывание в другом. Степень кооперативности зависит от концентрации ионов магния.
3. Положительная кооперативность проявляется также в связывании аденозин-олигофосфатов и диаденозинтрифосфата в регуляторных центрах CBS-PPазы; степень кооперативности также зависит от концентрации ионов магния.
4. Наномолярные концентрации диаденозинполифосфатов (Ar_nA , $n = 3-6$) активируют CBS-PPазы, содержащие DRTGG-домен и устраняют кинетическую кооперативность. Все Ar_nA , за исключением Ar_3A , связываются некооперативно со стехиометрией 1:1 в расчете

на димерный белок; стехиометрия связывания Ar_3A и аденозинолигофосфатов составляет 2:1.

5. CBS-PPаза *E. harbinense* содержит Ser вместо Asn в консервативном мотиве DHNE и не проявляет кинетическую кооперативность. Аналогичная замена Asn/Ser в «кооперативной» CBS-PPазе *D. hafniense* также устраняет кинетическую кооперативность.
6. Молекулярно-динамическое моделирование структуры гомолога CBS-PPазы без регуляторной вставки показало, что замена Asn на Ser в мотиве DHNE вызывает относительное смещение каталитических ДНН-доменов и ослабляет межсубъединичный контакт, затрудняя передачу информации между активными центрами.

ПРИЛОЖЕНИЕ

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Уравнения скорости

Для мономерного фермента, имеющего активный центр и регуляторный центр связывания ингибитора или активатора, связывание субстрата (S) и ингибитора/активатора (N) описывается схемами 5А и 5Б:



Схема 5. Кинетические схемы связывания субстрата (А) и ингибитора/активатора (Б). E - фермент, S – субстрат, N – ингибитор или активатор, K_m – константа Михаэлиса, K_N – константа диссоциации комплекса с ингибитором/активатором, v_0 и v_N - активности фермента в отсутствие и в присутствии ингибитора/активатора, k_{cat} – каталитическая константа.

Зависимость активности фермента, т.е. скорости ферментативной реакции А от концентрации субстрата при постоянной концентрации ингибитора/активатора (которая может быть и нулевой) описывается уравнением (10) (уравнение Михаэлиса-Ментен), а зависимость скорости реакции Б от концентрации ингибитора/активатора при постоянной концентрации субстрата – уравнением (11). Эти уравнения похожи в том, что в обоих случаях прирост или убыль активности с ростом концентрации субстрата или ингибитора/активатора описывается гиперболической функцией.

$$v = \frac{k_{cat}[E]_0}{1 + \frac{K_m}{[S]}} \quad (10)$$

$$v = v_0 + \frac{v_N - v_0}{1 + \frac{K_N}{[N]}} \quad (11)$$

Эти уравнения справедливы и для фермента, состоящего из нескольких одинаковых субъединиц при условии, что все они связывают субстрат и ингибитор/активатор независимо

друг от друга. Если же связывание субстрата в одной субъединице зависит от того, есть ли субстрат в другой или других субъединицах, то влияние субстрата на активность нельзя описать одной константой Михаэлиса. Это относится и к связыванию ингибитора/активатора. Рассмотрим простейший случай димерного фермента. Связывание в этом случае будет описываться схемами 6А и 6Б с двумя константами Михаэлиса или константами связывания ингибитора/активатора. Уравнения скорости для этих схем имеют более сложный вид (уравнения (12) и (13) соответственно), и их использование позволяет определить пары констант Михаэлиса или констант связывания ингибитора/активатора.

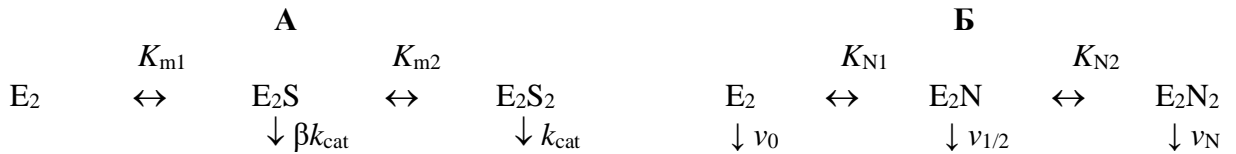


Схема 6. Кинетические схемы связывания субстрата (А) и ингибитора/активатора (Б) димерным ферментом. K_{m1} и K_{m2} – константы Михаэлиса, K_{N1} и K_{N2} – константы диссоциации комплекса с ингибитором/активатором, v_0 , $v_{1/2}$ и v_N – активности соответствующих комплексов с ингибитором/активатором, βk_{cat} и k_{cat} – каталитические константы для соответствующих фермент-субстратных комплексов.

$$v = \frac{k_{cat}[E]_0 \left(1 + \frac{\beta K_{m2}}{[S]}\right)}{1 + \frac{K_{m2}}{[S]} + \frac{K_{m1}K_{m2}}{[S]^2}} \quad (12)$$

$$v = \frac{v_N + \frac{(v_0 + v_N)K_{N2}}{2[N]} + \frac{v_0 K_{N1}K_{N2}}{[N]^2}}{1 + \frac{K_{N2}}{[N]} + \frac{K_{N1}K_{N2}}{[N]^2}} \quad (13)$$

Возникает вопрос, как по отношению величин K_{m1} и K_{m2} или величин K_{N1} и K_{N2} определить наличие и тип кооперативности при взаимодействии соответствующего лиганда с двумя субъединицами? Допустим, что $K_{m2} = 4K_{m1}$. Подставив это выражение в уравнение (12), получим (14):

$$v = \frac{k_{cat}[E]_0 \left(1 + \frac{4\beta K_{m1}}{[S]}\right)}{1 + \frac{4K_{m1}}{[S]} + \frac{4K_{m1}^2}{[S]^2}} = \frac{k_{cat}[E]_0 \left(1 + \frac{4\beta K_{m1}}{[S]}\right)}{\left(1 + \frac{2K_{m1}}{[S]}\right)^2} \quad (14)$$

При $\beta = 0,5$ (вклад двух активных центров в активность при насыщающей концентрации субстрата одинаков) это выражение упрощается до уравнения (10), описывающего работу не взаимодействующих центров. Таким образом, соотношение $K_{m2} = 4K_{m1}$ (или $4K_{m1}/K_{m2} = 1$) соответствует некооперативной кинетике. Соответственно, если $4K_{m1}/K_{m2} > 1$, то при $\beta = 0,5$ имеет место положительная кооперативность. Аналогичное правило можно так же вывести при подстановке $K_{N2} = 4K_{N1}$ в уравнение (13).

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Отсутствие влияния мутаций N312S и S213N на структуры Dh-PPазы и Eh-PPазы соответственно.

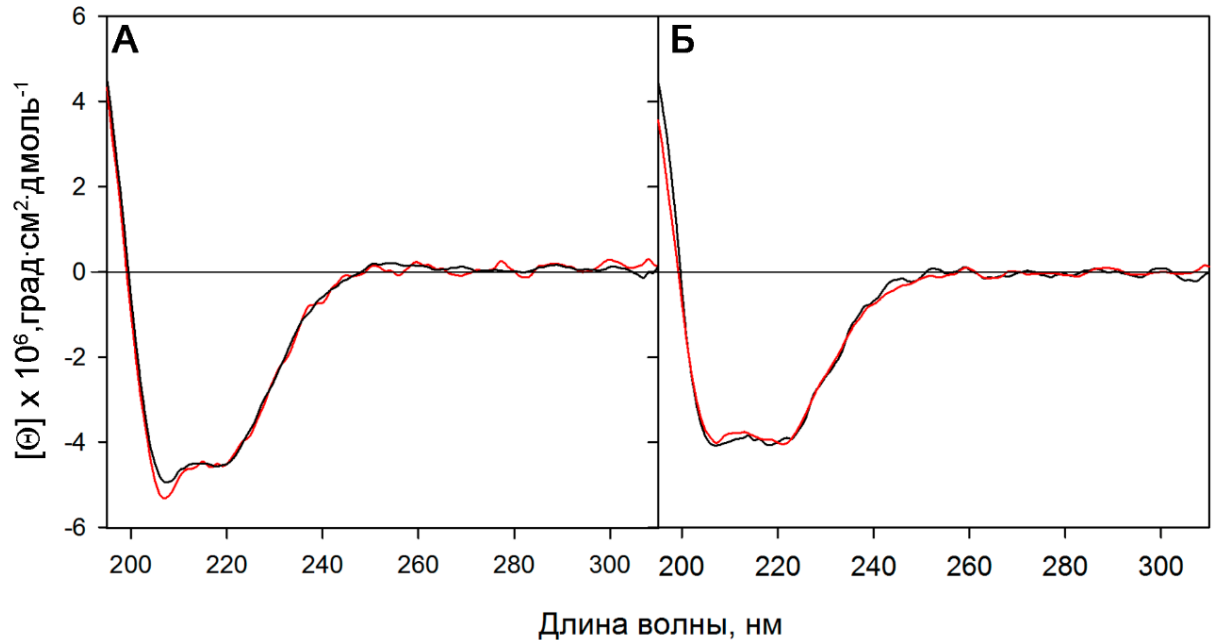


Рис. 53. Спектры кругового дихроизма (КД-спектры) области дальнего ультрафиолета Dh-PPазы дикого штамма и ее варианта N312S (А) и Eh-PPазы и её варианта S213N (Б). Спектры были получены с помощью КД-спектрометра Chirascan в кювете толщиной 0,1 мм. Образцы содержали 4 мкМ фермент, 50 мМ Na-фосфатный буфер, pH 7,2 и 2 мМ MgCl_2 . Скорость сканирования составляла 2 нм/с. Красные линии соответствуют ферментам дикого штамма, черные их вариантам N312S и S213N соответственно.

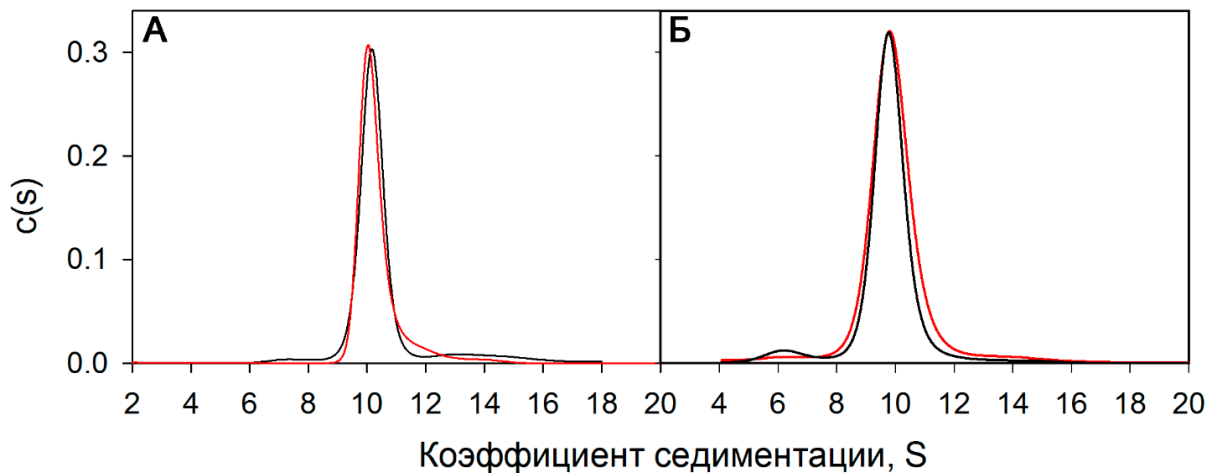


Рис. 54. Профили седиментации для Dh-PPазы дикого штамма и ее варианта N312S (А) и Eh-PPазы и её варианта S213N (Б). Красные линии соответствуют ферментам дикого штамма, черные их вариантам N312S и S213N соответственно.

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Поведение моделированных структур в процессе молекулярной динамики

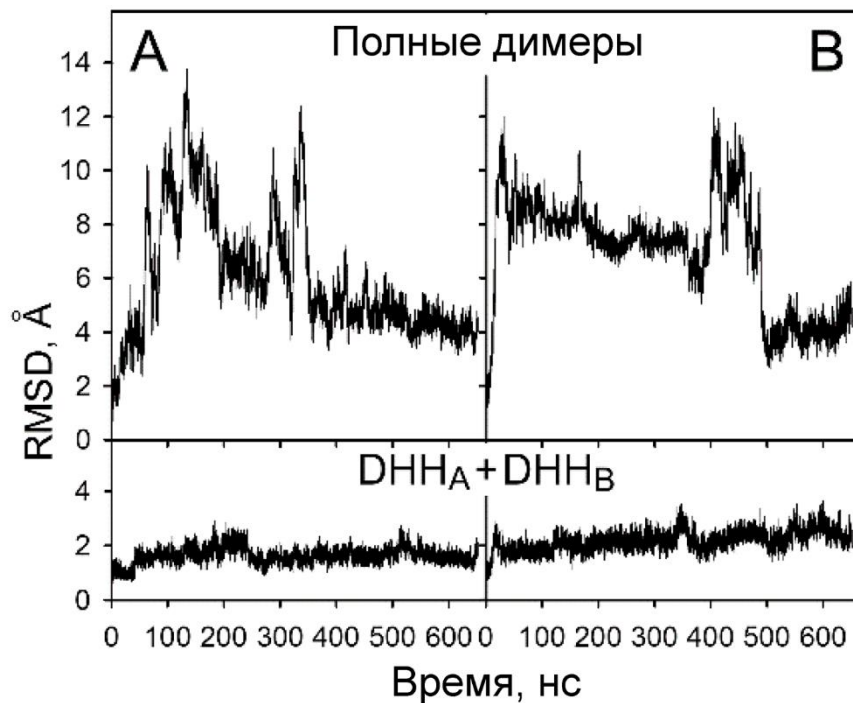


Рис. 55. Изменение параметра RMSD в течении МД-симуляции. Значения RMSD относительно кристаллической структуры Bs-PPазы даны для атомов основной цепи обеих субъединиц (верхняя панель) и двух DHH-доменов (нижняя панель) Bs-PPазы дикого штамма (A) и её варианта N77S (B).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kajander T., Kellosalo J., and Goldman A. Inorganic pyrophosphatase: one substrate, three mechanisms. // *FEBS Lett.* — 2013. — V. 587. — No. 13. — P. 1867-1869.
2. Bateman A. The structure of a domain common to archaeobacteria and the homocystinuria disease protein. // *Trends Biochem. Sci.* — 1997. — V. 22. — No. 1. — P. 12-13.
3. Scott J. W., Hawley S. A., Green K. A., Anis M., Stewart G., Scullion G. A., Norman D. G., and Hardie D. G. CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutation. // *J. Clin. Investig.* — 2004. — V. 113. — No. 2. — P. 274-284.
4. Baykov A. A., Tuominen, H. K., and Lahti R. The CBS Domain: A Protein Module with an Emerging Prominent Role in Regulation. // *Chem. Biol.* — 2011. — V. 6. — No. 11. — P. 1156–1163.
5. Ereño-Orbea J., Oyenarte I., and Martínez-Cruz L. A. CBS domains: Ligand binding sites and conformational variability. // *Arch. Biochem. Biophys.* — 2013. — V. 540. — No. 1-2. — P. 70-81.
6. Ereño-Orbea J., Majtan T., Oyenarte I., Kraus J. P., and Martínez-Cruz L. A. Structural basis of regulation and oligomerization of human cystathionine β -synthase, the central enzyme of transsulfuration. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2013. — V. 110. — No. 40. — P. 3790-3799.
7. Labesse G., Alexandre T., Vaupré L., Salard-Arnaud I., Him J. L., Raynal B., Bron P., and Munier-Lehmann H. MgATP regulates allostery and fiber formation in IMPDHs. // *Structure.* — 2013. — V. 21. — No. 6. — P. 975-985.
8. Xiao B., Sanders M. J., Underwood E., Heath R., Mayer F. V., Carmena D., Jing C., Walker P. A., Eccleston J. F., Haire L. F., Saiu P., Howell S. A., Aasland R., Martin S. R., Carling D., and Gamblin S. J. Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. // *Nature.* — 2011. — V. 472. — No. 7342. — P. 230-233.
9. Hattori M., Iwase N., Furuya N., Tanaka Y., Tsukazaki T., Ishitani R., Maguire M. E., Ito K., Maturana A., and Nureki O. Mg(2+)-dependent gating of bacterial MgtE channel underlies Mg(2+) homeostasis. // *EMBO J.* — 2009. — V. 28. — No. 22. — P. 3602-3612.
10. Feng L., Campbell E. B., Hsiung Y., and MacKinnon R. Structure of a eukaryotic CLC transporter defines an intermediate state in the transport cycle. // *Science.* — 2010. — V. 330. — No. 6004. — P. 635-641.
11. Nakabayashi M., Shibata N., Ishido-Nakai E., Kanagawa M., Iio Y., Komori H., Ueda Y., Nakagawa N., Kuramitsu S., and Higuchi Y. Crystal structure of a hypothetical protein, TTHA0829

- from *Thermus thermophilus* HB8, composed of cystathionine- β -synthase (CBS) and aspartate-kinase chorismate-mutase tyrA (ACT) domains. // *Extremophiles*. — 2016. — V. 20. — No. 3. — P. 275-282.
12. Tuominen H., Salminen A., Oksanen E., Jämsen J., Heikkilä O., Lehtiö L., Magretova N. N., Goldman A., Baykov A. A., and Lahti R. Crystal structures of the CBS and DRTGG domains of the regulatory region of *Clostridium perfringens* pyrophosphatase complexed with the inhibitor, AMP, and activator, diadenosine tetraphosphate. // *J. Mol. Biol.* — 2010. — V. 398. — No. 3. — P. 400-413.
13. Huynh T. N., Choi P. H., Sureka K., Ledvina H. E., Campillo J., Tong L., and Woodward J. J. Cyclic di-AMP targets the cystathionine beta-synthase domain of the osmolyte transporter OpuC. // *Mol. Microbiol.* — 2016. — V. 102 — No. 2. — P. 233-243.
14. Corral-Rodríguez M. Á., Stuiver M., Abascal-Palacios G., Diercks T., Oyenarte I., Ereño-Orbea J., de Opakua AI., Blanco F. J., Encinar J. A., Spiwok V., Terashima H., Accardi A., Müller D., and Martínez-Cruz L. A. Nucleotide binding triggers a conformational change of the CBS module of the magnesium transporter CNNM2 from a twisted towards a flat structure. // *Biochem. J.* — 2014. — V. 464. — No. 1. — P. 23-34.
15. Jeong B. C., Park S. H., Yoo K. S., Shin J. S., and Song H. K. Change in single cystathionine β -synthase domain-containing protein from a bent to flat conformation upon adenosine monophosphate binding. // *J. Struct. Biol.* — 2013. — V. 183. — No. 1. — P. 40-46.
16. Proudfoot M., Sanders S. A., Singer A., Zhang R., Brown G., Binkowski A., Xu L., Lukin J. A., Murzin A. G., Joachimiak A., Arrowsmith C. H., Edwards A. M., Savchenko A. V., and Yakunin A. F. Biochemical and structural characterization of a novel family of cystathionine beta-synthase domain proteins fused to a Zn ribbon-like domain. // *J. Mol. Biol.* — 2008. — V. 435. — No. 1. — P. 301-315.
17. Kery V., Bukovska G., and Kraus J.P. Transsulfuration depends on heme in addition to pyridoxal 5'-phosphate. Cystathionine beta-synthase is a heme protein. // *J. Biol. Chem.* — 1994. — V. 269. — No. 41. — P. 25283–25288.
18. Kery V., Poneleit L., and Kraus J.P. Trypsin cleavage of human cystathionine beta-synthase into an evolutionarily conserved active core: structural and functional consequences. // *Arch. Biochem. Biophys.* — 1998. — V. 355. — No. 2. — P. 222-232.
19. Oliveriusova J., Kery V., Maclean K. N., and Kraus J. P. Deletion mutagenesis of human cystathionine β -synthase. Impact on activity, oligomeric status, and S-adenosylmethionine regulation. // *J. Biol. Chem.* — 2002. — V. 277. — No. 50. — P. 48386–48394.

20. Taoka S., West M., and Banerjee R. Characterization of the heme and pyridoxal phosphate cofactors of human cystathionine beta-synthase reveals nonequivalent active sites. // *Biochemistry*. — 1999. — V. 38. — No. 9. — P. 2738-2744.
21. Ereño-Orbea J., Majtan T., Oyenarte I., Kraus J. P., and Martínez-Cruz L. A. Structural insight into the molecular mechanism of allosteric activation of human cystathionine β -synthase by S-adenosylmethionine. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2014. — V. 111. — No. 37. — P. E3845-E3852.
22. Su Y., Majtan T., Freeman K.M., Linck R., Ponter S., Kraus J.P., and Burstyn J.N. Comparative study of enzyme activity and heme reactivity in *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens* cystathionine β -synthases. // *Biochemistry*. — 2013. — V. 52. — No. 4. — P. 741-751.
23. Taoka S., Widjaja L., and Banerjee R. Assignment of enzymatic functions to specific regions of the PLP-dependent heme protein cystathionine beta-synthase. // *Biochemistry*. — 1999. — V. 38. — No. 40. — P. 13155-13161.
24. Pey A. L., Majtan T., Sanchez-Ruiz J. M., and Kraus J. P. Human cystathionine β -synthase (CBS) contains two classes of binding sites for S-adenosylmethionine (SAM): complex regulation of CBS activity and stability by SAM. // *Biochem. J.* — 2013. — V. 449. — No. 1. — P. 109-121.
25. Corton J. M., Gillespie J. G., and Hardie D. G. Role of the AMP-activated protein kinase in the cellular stress response. // *Curr. Biol.* — 1994. — V. 4. — No. 4. — P. 315-324.
26. Kemp B. E., Stapleton D., Campbell D. J., Chen Z. P., Murthy S., Walter M., Gupta A., Adams J. J., Katsis F., van Denderen B., Jennings I. G., Iseli T., Michell B. J., and Witters L. A. AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator. // *Biochem. Soc. Trans.* — 2003. — V. 31. — No. Pt 1. — P. 162-168.
27. Adams J., Chen Z. P., Van Denderen B. J., Morton C. J., Parker M. W., Witters L. A., Stapleton D., and Kemp B. E. Intrasteric control of AMPK via the γ 1 subunit AMP allosteric regulatory site. // *Protein Sci.* — 2004. — V. 13. — No. 1. — P. 155-165.
28. Witczak C. A., Sharoff C. G., and Goodyear L. J. AMP-activated protein kinase in skeletal muscle: from structure and localization to its role as a master regulator of cellular metabolism. // *Cell. Mol. Life. Sci.* — 2008. — V. 65. — No. 23. — P. 3737-3755.
29. Chen L., Wang J., Zhang Y.Y., Yan S.F., Neumann D., Schlattner U., Wang Z.X., and Wu J.W. AMP-activated protein kinase undergoes nucleotide-dependent conformational changes. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* — 2012. — V. 19. — No. 7. — P. 716-718.
30. Jin X., Townley R., and Shapiro L. Structural insight into AMPK regulation: ADP comes into play. // *Structure*. — 2007. — V. 15. — No. 10. — P. 1285-1295.

31. Gomez-Garcia I., Oyenarte I., and Martinez-Cruz L. A. The crystal structure of protein MJ1225 from *Methanocaldococcus jannaschii* shows strong conservation of key structural features seen in the eukaryal gamma-AMPK. // *J. Mol. Biol.* — 2010. — V. 399. — No. 1. — P. 53-70.
32. Weber G., Nakamura H., Natsumeda Y., Szekeres T., and Nagai M. Regulation of GTP biosynthesis. // *Adv. Enzyme Regul.* — 1992. — V. 32. — P. 57-69.
33. Zhang R., Evans G., Rotella F. J., Westbrook E. M., Beno D., Huberman E., Joachimiak A., and Collart F. R. Characteristics and crystal structure of bacterial inosine-5'-monophosphate dehydrogenase. // *Biochemistry.* — 1999. — V. 38. — No. 15. — P. 4691-4700.
34. Makowska-Grzyska M., Kim Y., Wu R., Wilton R., Gollapalli D. R., Wang X. K., Zhang R., Jedrzejczak R., Mack J. C., Maltseva N., Mulligan R., Binkowski T. A., Gornicki P., Kuhn M. L., Anderson W. F., Hedstrom L., and Joachimiak A. *Bacillus anthracis* inosine 5'-monophosphate dehydrogenase in action: the first bacterial series of structures of phosphate ion-, substrate-, and product-bound complexes. // *Biochemistry.* — 2012. — V. 51. — No. 31. — P. 6148-6163.
35. Buey R. M., Ledesma-Amaro R., Velázquez-Campoy A., Balsera M., Chagoyen M., de Pereda J. M., and Revuelta J. L. Guanine nucleotide binding to the Bateman domain mediates the allosteric inhibition of eukaryotic IMP dehydrogenases. // *Nat. Commun.* — 2015. — V. 6. — No. 8923. — P. 1-11.
36. Swaminathan R. Magnesium metabolism and its disorders. // *Clin. Biochem. Rev.* — 2003. — V. 24. — No. 2. — P. 47-66.
37. Payandeh J., Pfoh R., and Pai E. F. structure and regulation of magnesium selective ion channels. // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2013. — V. 1828. — No. 11. — P. 2778-2792.
38. Hattori M., Tanaka Y., Fukai S., Ishitani R., and Nureki O. Crystal structure of the MgtE Mg²⁺ transporter. // *Nature.* — 2007. — V. 448. — No. 7157. — P. 1072-1075.
39. Jentsch T. J., Stein V., Weinreich F., and Zdebik A. A. Molecular structure and physiological function of chloride channels. // *Physiol. Rev.* — 2002. — V. 82. — No. 2. — P. 503-568.
40. Jentsch T.J., Steinmeyer K., Schwarz G. Primary structure of *Torpedo marmorata* chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus oocytes*. // *Nature.* — 1990. — V. 348. — No. 6301. — P. 510-514.
41. Iyer R., Iverson T. M., Accardi A., and Miller C. A biological role for prokaryotic ClC chloride channels. // *Nature.* — 2002. — V. 419. — No. 6908. — P. 715-718.
42. Stölting G., Fischer M., and Fahlke C. CLC channel function and dysfunction in health and disease. // *Front. Physiol.* — 2014. — V. 5. — No. 378. — P. 1-18.

43. Niemeyer M. I., Yusef Y. R., Cornejo I., Flores C. A., Sepúlveda F. V., and Cid L. P. Functional evaluation of human ClC-2 chloride channel mutations associated with idiopathic generalized epilepsies. // *Physiol. Genomics*. — 2004. — V. 19. — No. 1. — P. 74-83.
44. Zifarelli G., and Pusch M. Intracellular regulation of human ClC-5 by adenine nucleotides. // *EMBO Rep.* — 2009. — V. 10. — No. 10. — P. 1111-1116.
45. Dutzler R. A structural perspective on ClC channel and transporter function. // *FEBS Lett.* — 2007. — V. 581. — No. 15. — P. 2839-2844.
46. Markovic S., and Dutzler R. The structure of the cytoplasmic domain of the chloride channel ClC-Ka reveals a conserved interaction interface. // *Structure*. — 2007. — V. 15. — No. 6. — P. 715-725.
47. Meyer S., Savaresi S., Forster I. C., and Dutzler R. Nucleotide recognition by the cytoplasmic domain of the human chloride transporter ClC-5. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* — 2007. — V. 14. — No. 1. — P. 60-67.
48. Bennetts B., Yu Y., Chen T. Y., and Parker M. W. Intracellular β -nicotinamide adenine dinucleotide inhibits the skeletal muscle ClC-1 chloride channel. // *J. Biol. Chem.* — 2012. — V. 287. — No. 31. — P. 25808-25820.
49. Ok S. H., Yoo K. S., and Shin J. S. CBSXs are sensor relay proteins sensing adenosine-containing ligands in *Arabidopsis*. // *Plant Signal. Behav.* — 2012. — V. 7. — No. 6. — P. 664-667.
50. Yoo K.S., Ok S.H., Jeong B.C., Jung K.W., Cui M.H., Hyoung S., Lee M.R., Song H.K., and Shin J.S. Single cystathionine β -synthase domain-containing proteins modulate development by regulating the thioredoxin system in *Arabidopsis*. // *Plant Cell*. — 2011. — V. 23. — No. 10. — P. 3577-3594.
51. Heinonen J.K. Biological role of inorganic pyrophosphate. // Kluwer Academic Publisher, Boston. — 2001. — P. 1-28, 123-188.
52. Parfenyev A.N., Salminen A., Halonen P., Hachimori A., Baykov A.A., and Lahti R. Quaternary structure and metal ion requirement of family II pyrophosphatases from *Bacillus subtilis*, *Streptococcus gordonii*, and *Streptococcus mutans*. // *J. Biol. Chem.* — 2001. — V. 276. — No. 27. — P. 24511-24518.
53. Fabrichniy I.P., Lehtiö L., Salminen A., Zyryanov A.B., Baykov A.A., Lahti R., and Goldman A. Structural studies of metal ions in family II pyrophosphatases: the requirement for a Janus ion. // *Biochemistry*. — 2004. — V. 43. — No. 45. — P. 14403-14411.

54. Ahn S., Milner A. J., Fütterer K., Konopka M., Ilias M., Young T. W., and White S.A. The "open" and "closed" structures of the type-C inorganic pyrophosphatases from *Bacillus subtilis* and *Streptococcus gordonii*. // J. Mol. Biol. — 2001. — V. 313. — No. 4. — P. 797-811.
55. Shizawa N., Uchiumi T., Taguchi J., Kisseleva N.A., Baykov A.A., Lahti R., and Hachimori A. Directed mutagenesis studies of the C-terminal fingerprint region of *Bacillus subtilis* pyrophosphatase. // Eur. J. Biochem. — 2001. — V. 268. — No. 22. — P. 5771-5775.
56. Konopka M.A., White S.A., and Young T.W. *Bacillus subtilis* inorganic pyrophosphatase: the C-terminal signature sequence is essential for enzyme activity and conformational integrity. // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2002. — V. 290. — No. 2. — P. 806-812.
57. Fabrichniy I. P., Lehtio L., Tammenkoski M., Zyryanov A. B., Oksanen E., Baykov A. A., Lahti R. and Goldman A. A trimetal site and substrate distortion in a family II inorganic pyrophosphatase. // J. Biol. Chem. — 2007. — V. 282. — No. 2. — P. 1422-1431.
58. Zyryanov A.B., Tammenkoski M., Salminen A., Kolomiytseva G.Y., Fabrichniy I.P., Goldman A., Lahti R., and Baykov A.A. Site-specific effects of zinc on the activity of family II pyrophosphatase. // Biochemistry. — 2004. — V. 43. — No. 45. — P. 14395-14402.
59. Зырянов А.Б., Лаhti Р., и Байков А.А. Ингибирование пирофосфатаз семейства II аналогами пирофосфата и фосфата. // Биохимия. — 2005. — V. 70. — No. 8. — P. 1099-1103.
60. Taylor T., Ingram-Smith C., and Smith K. S. Biochemical and Kinetic Characterization of the Eukaryotic Phosphotransacetylase Class IIa Enzyme from *Phytophthora ramorum*. // Eukaryot Cell. — 2015. — V. 14. — No. 7. — P. 652-660.
61. Jämsen J., Tuominen H., Salminen A., Belogurov G. A., Magretova N. N., Baykov A. A., and Lahti R. A CBS domain-containing pyrophosphatase of *Moorella thermoacetica* is regulated by adenine nucleotides. // Biochem. J. — 2007. — V. 408. — No. 3. — P. 327-333.
62. Ясмен Е., Байков А.А., Лаhti Р. Быстрая кинетика присоединения нуклеотидов к содержащей CBS- и DTRGG-домены пирофосфатазе семейства II из *Clostridium perfringens* // Биохимия. — 2012. — V. 77. — No. 2. — P. 205-211.
63. Jamsen J., Tuominen H., Baykov A.A., and Lahti R. Mutational analysis of residues in the regulatory CBS domains of *Moorella thermoacetica* pyrophosphatase corresponding to disease-related residues of human proteins. // Biochem. J. — 2011. — V. 433. — No. 3. — P. 497-504.
64. Barnes B.R., Marklund S., Steiler T.L., Walter M., Hjälms G., Amarger V., Mahlapuu M., Leng Y., Johansson C., Galuska D., Lindgren K., Abrink M., Stapleton D., Zierath J.R., and Andersson L. The 5'-AMP-activated protein kinase gamma3 isoform has a key role in carbohydrate and lipid

- metabolism in glycolytic skeletal muscle. // J. Biol. Chem. — 2004. — V. 279. — No. 37. — P. 38441-38447.
65. Jämsen J., Baykov A. A., and Lahti R. Nucleotide- and substrate-induced conformational transitions in the CBS domain-containing pyrophosphatase of *Moorella thermoacetica*. // Biochemistry. — 2010. — V. 49. — No. 5. — P. 1005-1013.
66. Kim S.H., Harzman C., Davis J.K., Hutcheson R., Broderick J.B., Marsh T.L., and Tiedje J.M. Genome sequence of *Desulfitobacterium hafniense DCB-2*, a Gram-positive anaerobe capable of dehalogenation and metal reduction. // BMC Microbiol. — 2012. — V. 12. — P. 21.
67. Ragunathan P., Kumarevel T., Agari Y., Shinkai A., Kuramitsu S., Yokoyama S., and Ponnuraj K. Crystal structure of ST2348, a CBS domain protein, from hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii*. // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2008. — V. 375. — No. 1. — P. 124-128.
68. Aguado-Llera D., Oyenarte I., Martínez-Cruz L. A., and Neira J.L. The CBS domain protein MJ0729 of *Methanocaldococcus jannaschii* binds DNA. // FEBS Lett. — 2010. — V. 584. — No. 21. — P. 4485-4489.
69. McLean J. E., Hamaguchi N., Belenky P., Mortimer S. E., Stanton M., Hedstrom L. Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase binds nucleic acids *in vitro* and *in vivo*. // Biochem. J. — 2004. — V. 379. — No. Pt 2. — P. 243-251.
70. Berger L. Crystallization of sodium salt of adenosine triphosphate // Biochim. et Biophys. Acta. — 1956. — V. 20. — No. 1. — P. 23-26.
71. Шварценбах Г. Комплексонометрия. Теоретические основы и практическое применение. Сборник переводов. // М.: ГосХимИздат. — 1958. — P. 78-85.
72. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. // М.: Мир. — 1991. — P. 89-90.
73. Baykov A. A., Huytia T., Turkina M. V., Efimova I. S., Kasho V. N., Goldman A., Cooperman B. S., and Lahti R. Functional characterization of *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase in zwitterionic buffers. // Eur. J. Biochem. — 1999. — V. 260. — No. 2. — P. 308-317.
74. Vanni A., and Gastaldi D. The interaction of bivalent metal ions (Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+}) with TES. // Annali de Chimica (Rome). — 1986. — V. 76. — No. 9-10. — P. 375-385.
75. Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W. and Lipman D. J. Basic local alignment search tool. // J. Mol. Biol. — 1990. — V. 215. — No. 3. — P. 403-410.

76. Kanehisa M., Sato Y., Kawashima M., Furumichi M. and Tanabe M. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. // *Nucl. Acids Res.* — 2016. — V. 44. — No. D1. — P. D457-D462.
77. Baykov A.A., and Aavaeva S.M. A simple and sensitive apparatus for continuous monitoring of orthophosphate in the presence of acid-labile compounds. // *Anal. Biochem.* — 1981. — V. 116. — No. 1. — P. 1-4.
78. Baykov A. A., Bakuleva N. P., and Rea P. A. Steady-state kinetics of substrate hydrolysis by vacuolar H⁺-pyrophosphatase. A simple three state model. // *Eur. J. Biochem.* — 1993. — V. 217. — No. 2. — P. 755-762.
79. Smith R. M., Martell A. E., and Motekaitis R. J. NIST Critical Stability Constants of Metal Complexes Database, Version 2.0. // Gaithersburg, MD. National Institute of Standards and Technology. — 1995.
80. Case D. A., Berryman J. T., Betz R. M., Cerutti D. S., Cheatham T. E. III, and et al. AMBER 2015 // University of California, San Francisco. — 2015.
81. Winn M. D., Ballard C. C., Cowtan K. D., Dodson E. J., Emsley P., Evans P. R., and et al. Overview of the CCP4 suite and current developments. // *Acta. Cryst.* — 2011. — V. D 67. — No. Pt 4. — P. 235-242.
82. Larsen M., Willett M. and Yount R. G. Imidodiphosphate and pyrophosphate: possible biological significance of similar structures. // *Science.* — 1969. — V. 166. — No. 3912. — P. 1510-1511.
83. Sindikara D. J., Yoshida N. and Hirata F. Placevent: an algorithm for prediction of explicit solvent atom distribution - Application to HIV-1 protease and F-ATP synthase. // *J. Comput. Chem.* — 2012. — V. 133. — No. 18. — P. 1536-1543.
84. Durrant J. D. and McCammon J. A. HBonanza: a computer algorithm for molecular-dynamics-trajectory hydrogen-bond analysis. // *J. Mol. Graph. Model.* — 2011. — V. 31. — P. 5-9.
85. Roe D. R. and Cheatham T.E. PTRAJ and CPPTRAJ: software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data. // *J. Chem. Theory Comput.* — 2013. — V. 9. — No. 7. — P. 3084-3095.
86. Bisswanger H. *Enzyme kinetics: principles and methods*, 2nd Ed. // Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Germany. — 2008. — P. 14-17.
87. Forsen S., and Linse S. Cooperativity: over the Hill. // *TIBS.* — 1995. — V. 20. — No. 12. — P. 495-497.
88. Курганов Б.И. Аллостерические ферменты // М.: "Наука". — 1978. — P. 49-52.

89. Janosík M., Kery V., Gaustadnes M., Maclean K.N., and Kraus J.P. Regulation of human cystathionine beta-synthase by S-adenosyl-L-methionine: evidence for two catalytically active conformations involving an autoinhibitory domain in the C-terminal region. // *Biochemistry*. — 2001. — V. 40. — No. 35. — P. 10625-10633.
90. Banerjee R., and Zou C.G. Redox regulation and reaction mechanism of human cystathionine-beta-synthase: a PLP-dependent hemesensor protein. // *Arch. Biochem. Biophys.* — 2005. — V. 433. — No. 1. — P. 144-156.
91. Garrison P.N., and Barnes L.D. Determination of dinucleoside polyphosphates. // *Ap₄A and Other Dinucleoside Polyphosphates* (McLennan A.G., ed) CRC Press, Boca Raton, FL. — 1992. — P. 29-61.
92. Plateau P., and Blanquet S. Dinucleoside oligophosphates in micro-organisms. // *Adv. Microb. Physiol.* — 1994. — V. 36. — P. 81-109.
93. Merckel M. C., Fabrichniy I. P., Salminen A., Kalkkinen N., Baykov A. A., Lahti R., and Goldman A. Crystal structure of *Streptococcus mutans* pyrophosphatase: a new fold for an old mechanism. // *Structure*. — 2001. — V. 9. — No. 4. — P. 289-297.
94. Madsen T., and Licht D. Isolation and characterization of an anaerobic chlorophenol-transforming bacterium. // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1992. — V. 58. — No. 9. — P. 2874-2878.
95. Xing D., Ren N., Li Q., Lin M., Wang A., and Zhao L. *Ethanoligenens harbinense* gen. nov., sp. nov., isolated from molasses wastewater. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2006. — V. 56. — No. Pt4. — P. 755-760.
96. Halonen P., Tammenkoski M., Niiranen L., Huopalahti S., Parfenyev A.N., Goldman A., Baykov A.A, and Lahti R. Effects of active site mutations on the metal binding affinity, catalytic competence, and stability of the family II pyrophosphatase from *Bacillus subtilis*. // *Biochemistry*. — 2005. — V. 44. — No. 10. — P. 2088-2096.