

УДК 577.151.34

ГИДРОЛИЗ ПАРАОКСОНА, КАТАЛИЗИРУЕМЫЙ ОРГАНОФОСФАТГИДРОЛАЗОЙ, СОДЕРЖАЩЕЙ ПОЛИГИСТИДИНОВУЮ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ НА С-КОНЦЕ МОЛЕКУЛЫ БЕЛКА

Д.А. Гудков, Ю.А. Вотчицева, Е.Н. Ефременко

(кафедра химической энзимологии)

Исследование гидролиза параоксона, катализируемого органофосфатгидролазой, содержащей гексагистидиновую последовательность на С-конце, выявило кинетику, отличную от кинетики Михаэлиса–Ментен. Выдвинуто предположение о появлении в генетически модифицированной молекуле ОРН дополнительного каталитически активного металлокомплекса, образованного введенной гексагистидиновой последовательностью и ионами Co^{2+} , которые вносят в среду для активации ОРН, являющейся металлоферментом.

Органофосфатгидролаза (ОРН, ЕС 3.1.8.1, арилдиалкилфосфатаза) является ключевым ферментом, катализирующим гидролиз эфирной связи в триэфирах фосфорной кислоты, к числу которых относятся нейротоксичные фосфорорганические соединения (ФОС), в частности широко используемые в сельском хозяйстве пестициды, обладающие острой и кумулятивной нейротоксичностью [1–3].

В настоящее время активно разрабатываются методы биологической деградации ФОС, в том числе с применением ОРН [4, 5]. ОРН можно также использовать в качестве каталитически активного элемента биосенсорных устройств, предназначенных для определения ФОС в разных объектах (продуктах питания, речных и сточных водах) [6, 7].

Потребность в ОРН стимулирует разработку новых эффективных методов, выделения и очистки этого фермента. Была создана плазмида, кодирующая синтез рекомбинантной ОРН с гексагистидиновой последовательностью на N-конце молекулы белка (His_6 -ОРН) [8]. Такая генетическая модификация белка позволила осуществить его выделение и очистку с помощью металл-хелатирующей хроматографии, основанной на образовании комплекса между введенной гексагистидиновой последовательностью (His_6) и ионами металла, которыми заряжен хроматографический носитель, с хелатирующими лигандами [9].

Из литературы известно, что введение His_6 в структуру молекул ферментов, как правило, не влияет на их свойства [9], но в отдельных случаях может изменять их [8–14]. Нами было установлено, что введение His_6 на N-конец молекулы ОРН изменяет ее свойства, в частности улучшает константы

эффективности действия полученного фермента по ряду субстратов [8].

Трехмерная структура ОРН [15] (рис. 1) сформирована таким образом, что несколько аминокислотных остатков как на N-, так и на С-конце молекулы белка (4 и 12 аминокислотных остатков соответственно) не входят в состав белковой глобулы. Проведенный компьютерный анализ структуры ОРН показал, что N- и С-концы молекулы белка расположены в пространстве близко друг к другу, и оба значительно удалены от активного центра фермента (рис. 1). Ожидалось, что из-за большей длины и, следовательно, подвижности С-конца молекулы белка размещение на нем His_6 могло бы иначе отразиться на его свойствах, чем в случае модификации N-конца.

В связи с этим была создана генетическая конструкция для экспрессии ОРН, содержащей His_6 на



Рис. 1. Пространственная структура органофосфатгидролазы с указанием N-(1) и С-(2)-концов молекулы белка

С-конце молекулы белка (ОРН-His₆) [16]. Был подобран штамм *Escherichia coli* DH5a, обеспечивающий максимальный уровень накопления ОРН-His₆ в растворимой форме. Модифицированный белок был выделен и очищен на Ni-NTA-агарозе, согласно методике, разработанной ранее для His₆-ОРН [17].

В работе были исследованы каталитические свойства фермента ОРН-His₆ и проведено сравнение свойств полученного белка с ранее изученной His₆-ОРН.

Экспериментальная часть

В работе использовали параоксон (диэтил *n*-нитрофенилфосфат), имидазол, Ches (2-[N-циклогексил-амино]этансульфоновая кислота), хлорид кобальта шестиводный, глицерин, бромфеноловый синий, кумасси бриллиантовый синий R-250, натриевую соль ампициллина, яичный альбумин, додецилсульфат натрия (препараты фирмы “Sigma”, США); триптон, дрожжевой экстракт (“Difco”, США); акриламид, бисакриламид (“Merck”, Германия), изопропил-β-D-тио-галактопиранозид (ИПТГ), маркеры для белкового электрофореза – набор белков с молекулярными массами 21,5; 31,0; 45,0; 66,2; 94,6 кДа (“Fermentas”, Литва), N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД), персульфат аммония фирмы (“Bio-Rad”, США). В качестве носителя для аффинной хроматографии применяли Ni-NTA-агарозу (агароза, модифицированная нитрилотриуксусной кислотой) фирмы “Qiagen” (США). Все остальные использованные в работе реактивы марки “ч.д.а.” были приобретены в фирмах “Лабтехника” и “Химмед” (Россия).

Для трансформации клеток *E. coli* применяли генетическую конструкцию рТЭС-ОРН-His [8]. Для выделения ОРН-His₆ использовали клетки *E. coli* DH5a.

Культивирование штамма *E. coli* DH5a, несущего плазмиду рТЭС-ОРН-His, проводили в соответствии с методикой [8], после индукции синтеза белка процесс длился 18 ч. Уровень синтеза ОРН-His₆, а также гомогенность белкового препарата оценивали электрофоретически в денатурирующих условиях в 12%-м полиакриламидном геле с использованием ячейки MiniProtean II (“Bio-Rad”, США), с последующим окрашиванием Кумасси R-250.

Выделение и очистку ОРН-His₆ проводили в соответствии с методикой [17], согласно которой из 1 г влажной биомассы было получено 4,1 мг высокоочищенного ферментного препарата со средней удельной активностью 5710 ед/мг белка. Выход фермента, в результате очистки, составлял 60,2% от ис-

ходного количества ОРН, синтезированного клетками, а гомогенность полученного ферментного препарата – 92%. Концентрацию белка определяли методом Бредфорд с применением реагента фирмы “Bio-Rad” (США).

Ферментативную активность определяли спектрофотометрически (спектрофотометр “Agilent 8453-UV”, Германия) при 25°C, по накоплению продукта гидролиза (4-нитрофенолят аниона) при 405 нм; (ϵ 17000 М⁻¹см⁻¹; рН 9,0; ϵ 18000 М⁻¹см⁻¹; рН 10,5). Каталитическую активность определяли с помощью 50 мМ карбонатного буфера (рН 10,5). Для исследования субстратной специфичности ферментов использовали водные растворы параоксона и метилпарагидроксибензоата. Каталитическую реакцию инициировали внесением раствора ОРН-His₆ в кювету с буфером и субстратом так, чтобы концентрация каждого из ферментов в реакционной среде составляла 10⁻¹⁰–10⁻⁹ М (E_0).

За единицу ферментативной активности принимали такое количество фермента, которое необходимо для гидролиза 1 мкмоль субстрата за 1 мин при 20°C и рН 10,5.

Расчет скоростей ферментативной реакции проводили по начальным линейным участкам кинетических кривых ($v_0 = \text{tg } \alpha$). Максимальную скорость ферментативной реакции ($V_{\text{макс}}$) и константу Михаэлиса (K_m) определяли с помощью двойных обратных координат $1/v_0 - 1/[S]$ (Лайнуивера–Берка).

При изучении зависимости каталитической активности ферментов от рН применяли 100 мМ буферы с перекрывающимися значениями рН: фосфатный (рН 7,0–8,0; 11,0–12,0), CHES (рН 8,5–10,0), карбонатный (рН 10,0–11,0).

Результаты и обсуждение

При исследовании свойств ОРН-His₆ было установлено, что рН-оптимум каталитической активности фермента оказался смещенным в щелочную область по сравнению с нативной ОРН. Ранее то же явление наблюдалось при изучении свойств His₆-ОРН [8, 16] (рис. 2). Возможно, это связано с протонированием атомов азота имидазольного кольца гистидина, в результате чего высвобождается часть гидроксид-ионов. Следует отметить, что дополнительно введенные остатки гистидина на С-конец молекулы белка потенциально могут аллостерически изменять каталитически активную конформацию фермента, влияя на его свойства.

Кроме того, на графике рН-зависимости каталитической активности ОРН-His₆ (рис. 2) четко выяви-

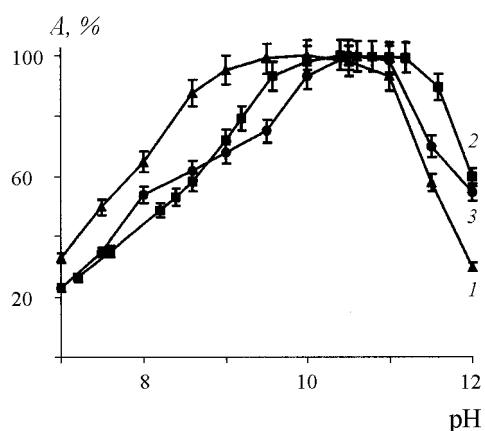


Рис. 2. pH-зависимости каталитической активности нативной ОРН (1) и ОРН, содержащих гексагистидиновую последовательность на N- (2) и С- (3) концах молекулы белка

лись два плато, которые отсутствуют на аналогичной зависимости, полученной для His₆-ОРН. Подобное явление теоретически могло быть обусловлено рядом причин: наличием белковых примесей в исследуемом препарате фермента, присутствием двух ферментов, катализирующих одну и ту же реакцию, и нестабильностью фермента. Это может быть связано также с появлением в молекуле полученного белка дополнительного активного центра, образованного в результате координационных взаимодействий His₆ с ионами Co²⁺. Ионы Co²⁺ вводили в препарат фермента после его очистки (10⁻⁵М CoCl₂·6Н₂О), так как ОРН является металлоферментом, содержащим два атома металла в активном центре [3].

Поскольку высокая степень чистоты (98%) ферментного препарата подтверждена электрофоретически (рис. 3), а стабильность его достаточно высока (фермент не теряет активности в течение 24 ч при 22°C), то можно предположить, что наиболее вероятной причиной вышеупомянутого эффекта могло стать появление нового каталитически активного металлокомплекса.

Образование подобных комплексов является основой металл-аффинной хроматографии. Известно, что связи металл-лиганд в комплексе Co²⁺ с остатками гистидина образуются за 4–10 нс и в образовании металлокомплекса, как правило, принимают участие *i*-й и (*i*+2)-й остатки гистидина в His₆ [19]. Согласно литературным данным [19–23], такие комплексы проявляют активность по отношению к различным эфирам фосфорной кислоты в широком интервале pH.

Вероятно, His₆ в составе молекулы ОРН может, во-первых, оказывать влияние на третичную структуру фермента, изменяя каталитические характеристики его активного центра, а во-вторых, образовать

вать комплексы с Co²⁺, проявляя дополнительную каталитическую активность по отношению к триэфирам фосфорной кислоты в широком интервале pH.

При определении каталитических характеристик модифицированного фермента ОРН-His₆ по отношению к параоксону были получены зависимости начальной скорости ферментативного гидролиза субстрата от его концентрации (рис. 4, а), которые имели сигмоидальную форму, отличную от общеизвестной гиперболы Михаэлиса. Аналогичные зависимости были получены также при исследовании ферментативного гидролиза другого субстрата – метилпара-тиона (данные не показаны). Этот факт также мог свидетельствовать о наличии более одного активного центра в составе молекулы ОРН-His₆.

В обратных координатах Лайнуивера–Берка (рис. 4, б) полученные зависимости начальной скорости ферментативного гидролиза субстратов от их концентрации превращались в кривые с характерными загибами, через которые могли быть проведены две линейные зависимости, свидетельствующие о невозможности интерпретации данных, исходя из теории Михаэлиса–Ментен.

Далее были определены каталитические характеристики для реакции гидролиза параоксона, катализируемой ОРН-His₆, исходя из предположения о том, что в молекуле полученного белка (ОРН-His₆) имеются два каталитических центра: природный (1) и появившийся в результате генетического введения полигистидиновой последовательности в структуру молекулы белка (2). Все расчеты проводили при ис-

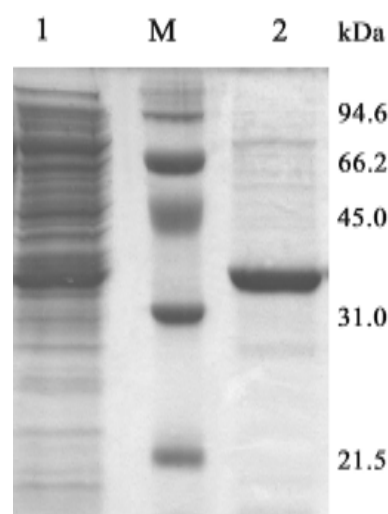


Рис. 3. Электрофореграмма клеточного лизата и очищенного препарата ОРН-His₆: 1 – клеточный лизат; 2 – ОРН-His₆; М – маркеры молекулярного веса

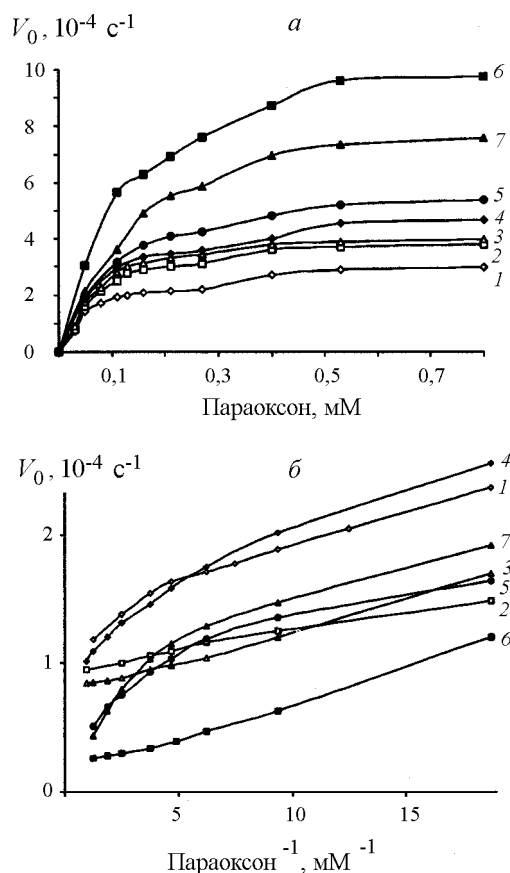


Рис. 4. Зависимости начальной скорости ферментативного гидролиза параоксона, катализируемого ОРН-Нis₆, в прямых и обратных координатах при разных значениях pH: 1 – 7,5; 2 – 8,0; 3 – 8,5; 4 – 9,0; 5 – 9,5; 6 – 10,6; 7 – 11,0

пользовании модели одновременного взаимодействия двух ферментов с одним субстратом [18]. Предполагалось, что при низких концентрациях субстрата (начальный участок зависимости скорости ферментативного гидролиза от концентрации субстрата) задействован каталитический центр, с наибольшим сродством к субстрату и характеризующийся меньшей величиной константы Михаэлиса. Напротив, считалось, что при насыщающих концентрациях параоксона в катализе участвуют оба каталитических центра. Для расчета констант Михаэлиса и максимальных скоростей были использованы следующие соотношения [18]:

$$K_{m,1} = \frac{K_2 V_2 + (K_2^2 / K_1) V_1}{V_2 + (K_2^2 / K_1^2) V_1}, \quad V_{\max,1} = \frac{(V_2 + (K_2 / K_1) V_1)^2}{V_2 + (K_2^2 / K_1^2) V_1},$$

$$K_{m,2} = \frac{K_1 V_1 + K_2 V_2}{V_1 + V_2}, \quad V_{\max,2} = V_t - V_1,$$

где K_1 и V_1 – константа Михаэлиса и максимальная скорость природного активного центра фермента, определяемые без учета присутствия гексагистиди-

новой последовательности в составе фермента; K_2 и V_2 – константа Михаэлиса и максимальная скорость, отражающие одновременное действие двух активных центров на субстрат без учета их взаимного влияния друг на друга; $K_{m,1}$, $K_{m,2}$, $V_{\max,1}$ и $V_{\max,2}$ – кажущиеся константы Михаэлиса и кажущиеся максимальные скорости, учитывающие взаимное влияние активных центров друг на друга; V_t – суммарная максимальная скорость.

Зависимости начальной скорости ферментативного гидролиза были разделены на две части: до точки перегиба кривых и после нее (рис. 5). Через начальные и конечные участки кривых, построенных в обратных координатах, были проведены линейные зависимости, соответствующие большим и малым концентрациям субстрата. По точкам пересечения прямых с осью $1/S$ были определены константы K_1 и K_2 , а по пересечению с осью $1/V$ – скорости V_1 и V_2 . Значение V_t определено по точке пересечения гиперболы с осью $1/V$.

На рис. 5 представлены зависимости кажущихся каталитических констант от pH реакционной среды для двух предполагаемых каталитических центров ОРН-Нis₆, участвующих в реакции гидролиза параоксона. Установлено, что константа Михаэлиса для

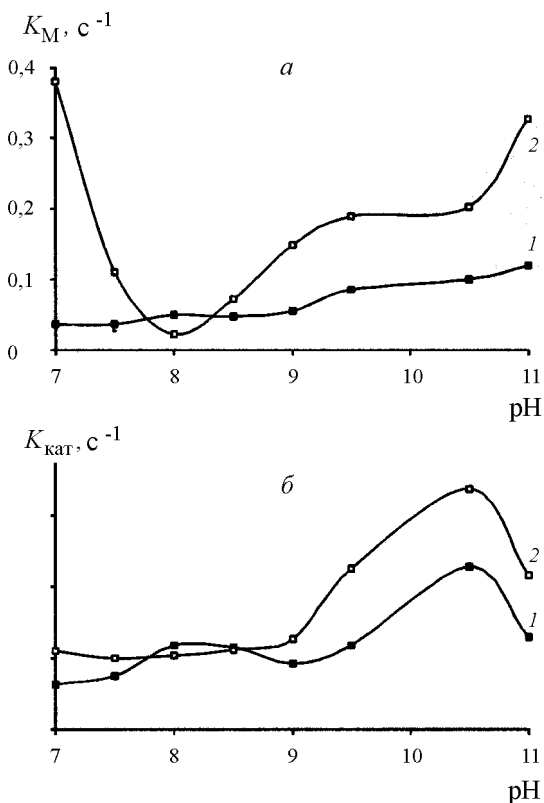


Рис. 5. Зависимость от pH кажущихся констант: а – Михаэлиса; б – каталитических для 1-го (1) и 2-го (2) каталитических центров ОРН-Нis₆

одного из активных центров остается практически постоянной при всех значениях рН (рис. 5, а), а ее величина свидетельствует о большом сродстве этого каталитического центра к субстрату. Логично было бы отнести эту характеристику к нативному активному центру фермента ($K_{m,1}$). Напротив, зависимость константы Михаэлиса от рН для второго каталитического центра ($K_{m,2}$), образованного, по-видимому, при участии His₆, достаточно высока. Сравнивая значения $K_{m,1}$ с известными данными о K_m для нативной ОРН [8], можно сделать вывод о негативном влиянии His₆ на природный активный центр фермента.

Значения кажущихся каталитических констант для обоих центров остаются практически постоянными в области низких значений рН и имеют максимум при рН 10,5 (рис. 5, б). По-видимому, это напрямую связано с активацией и соответственно повышением нуклеофильной способности воды в этой области значений рН, а из литературных данных известно,

что мостиковая молекула воды присутствует между двумя ионами кобальта в активном центре нативной ОРН [3]. Из рис. 5 видно, что заметное влияние рН имеет на более “доступный” каталитический центр, находящийся на поверхности молекулы белка, т.е. образованный при участии His₆.

Исследование каталитических свойств генетически модифицированной ОРН показало, что полигистидиновая последовательность, генетически введенная на С-конец белковой молекулы, оказывает существенное влияние на свойства фермента. Выдвинуто предположение об образовании металлокомплекса при участии His₆, использованной для модификации ОРН, и ионов Co²⁺, вводимых в препарат металлофермента. Однако одного определения каталитических констант недостаточно для окончательного вывода о реальной причине наблюдаемой немихаэлисовской кинетики. Мы надеемся подтвердить релевантность высказанной гипотезы в дальнейших экспериментах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Alavanja M., Hoppin J., Kamel F. // Ann. Rev. Public Health. 2004. **25**. P. 155.
2. Eskenazi B., Bradman A., Castorina R. // Environ. Health Perspect. 1999. **107**. P. 409.
3. Ефременко Е., Сергеева В. // Изв. АН. Сер. хим. 2001. **10**. С. 1743.
4. Mulchandani P., Chen W., Mulchandani A. // Environ. Sci. Technol. 2001. **35**. P. 2562.
5. Simonian A., Efremenko E., Wild J. // Anal. Chim. Acta. 2001. **444**. P. 179.
6. McDaniel C. // United States Patent Appl. 20040109853. 2004.
7. Aubert S., Li Y., Raushel F. // Biochemistry. 2004. **43**. P. 5707.
8. Вотчицева Ю., Ефременко Е., Алиев Т., Варфоломеев С. // Биохимия. 2006. **71**. С. 216.
9. Terpe K. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003. **60**. P. 523.
10. Kowolik C., Hengstenberg W. // Eur. J. Biochem. 1998. **257**. P. 389.
11. Chen H.-M., Chen K.-T. // Enz. Microbiol. Technology. 2000. **27**. P. 219.
12. Hung M., Gibbs C., Tsiang M. // Antiviral. Res. 2002. **56**. P. 99.
13. Goel A., Colcher D., Koo J., Booth B., Pavlinkova G., Batra S. // Biochem. Biophys. Acta. 2000. **1523**. P. 13.
14. Yang S., Park N., Lee T., Cha J. // Biotechnol. Appl. Biochem. 2002. **35**. P. 199.
15. Donarski J., Dumas D., Heitmeyer D., Lewis V., Raushel F. // Biochemistry. 1989. **28**. P. 4650.
16. Варфоломеев С., Ефременко Е., Алиев Т., Вотчицева Ю. Патент РФ на изобретение № 2232807. 2003.
17. Efremenko E., Votchitseva Yu., Plieva F., Galaev I., Mattiasson Bo. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006 (in press).
18. Диксон М., Уэбб Е. // Ферменты. Т. 1. М., 1982. Гл. 4. С. 121.
19. Liu H., Ho Y., Hsu Ch. // J. Biomol. Struct. Dynamics. 2003. **21**. P. 31.
20. Deal K., Burstyn J. // Inorg. Chem. 1996. **35**. P. 2792.
21. Vichard C., Kaden T. // Inorg. Chim. Acta. 2002. **337**. P. 173.
22. Hay R. W., Govan N. // Transition Met. Chem. 1998. **23**. P. 721.
23. Yamazakia T., Yilmaz E., Mosbach K., Sodea K. // Analyt. Chim. Acta. 2001. **435**. P. 209.

Поступила в редакцию 01.12.05

PARAOXON HYDROLYSIS CATALYZED BY ORGANOPHOSPHATE HYDROLASE CONTAINING THE POLYHISTIDINE TAG AT THE C-TERMINUS OF PROTEIN MOLECULE

D.A. Gudkov, Yu.A. Votchitseva, E.N. Efremenko, S.D. Varfolomeyev

(Division of Chemical Enzymology)

The non-Michaelis kinetics of paraoxon hydrolysis catalyzed by the organophosphate hydrolase, containing the hexahistidine tag at the C-terminus, was revealed. The appearance of catalytically active metal-complex formed by the hexahistidine tag, introduced into the genetically modified OPH structure, and the Co²⁺ ions, added to the reaction medium to activate the OPH being metalloenzyme, additionally to the native active site was supposed.