



УДК 577.153.02

КИНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ГИДРОЛИЗА
БИС-*n*-НИТРОФЕНИЛФОСФАТА
ПОД ДЕЙСТВИЕМ ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ ЯДА ГЮРЗЫ

Дьяков В. Л.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Изучена кинетика гидролиза бис-*n*-нитрофенилфосфата под действием фосфодиэстеразы яда гюрзы. Показано, что при pH 7 гидролиз субстрата на начальной стадии протекает в 2 этапа: 1) быстрое выделение *n*-нитрофенолят-иона в количестве, пропорциональном количеству фермента, 2) процесс более медленного выделения *n*-нитрофенолят-иона (стационарная стадия). Простая трехстадийная схема процесса гидролиза, включающая образование фосфофермента, не согласуется с наблюдаемым кинетическим поведением фосфодиэстеразы яда гюрзы. Для качественного объяснения наблюдаемого характера кинетической кривой использован механизм гидролиза субстрата, основанный на предположении конформационного перехода в молекуле фермента в ходе катализа.

Ферментными препаратами экзонуклеаз змеиного яда (КФ 3.1.4.1) широко пользуются для получения мононуклеозид-5'-фосфатов из соответствующих олигонуклеотидов и нуклеиновых кислот [1—3]. В СССР наиболее доступен яд гюрзы. Настоящее исследование посвящено изучению некоторых особенностей кинетики гидролиза фосфодиэфирной связи в бис-*n*-нитрофенилфосфате под действием фосфодиэстеразы яда гюрзы (*Vipera lebetina*). Выяснению структуры и механизма действия этого фермента до настоящего времени не было уделено должного внимания, имеются только некоторые данные по специфичности и влиянию ионов металлов на активность фосфодиэстеразы яда гюрзы [3, 4].

Наиболее эффективным способом получения препарата фосфодиэстеразы яда гюрзы, свободного от примеси 5'-мононуклеотидазы и обладающего высокой специфической активностью, является метод, основанный на хроматографии яда на сульфатилцеллюлозе [5].

В настоящей работе показано, что при оптимальном для действия фермента pH 8,5 кинетическая кривая выделения *n*-нитрофенолят-иона на начальной стадии гидролиза в координатах «оптическая плотность — время» представляет прямую линию. При pH 7 кинетическая кривая начальной стадий имеет иной вид (рис. 1). Как видно из рисунка, гидролиз субстрата протекает в 2 этапа. Первый этап характеризуется относительно быстрым выделением *n*-нитрофенолят-иона. Количество выделяемого продукта (характеризующееся величиной отрезка, отсекаемого на оси ординат асимптотой кинетической кривой с углом наклона φ_2) пропорционально количеству использованного фермента. Второй этап (стационарная стадия) является процессом более медленного выделения *n*-нитрофенолят-иона.

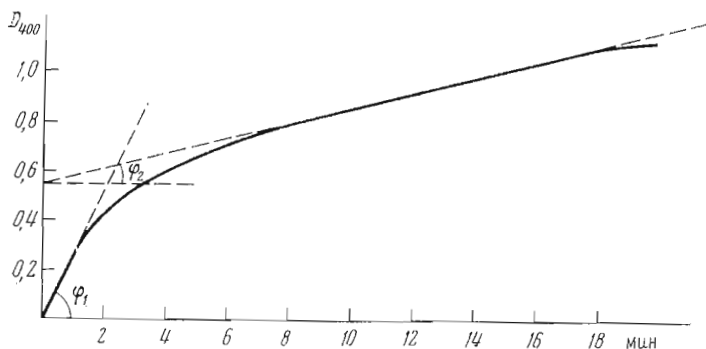


Рис. 1. Кинетическая кривая начальной стадии гидролиза бис-*n*-нитрофенилфосфата под действием фосфодиэстеразы яда гюрзы при рН 7 ($[S]_0$ 2,0 мМ)

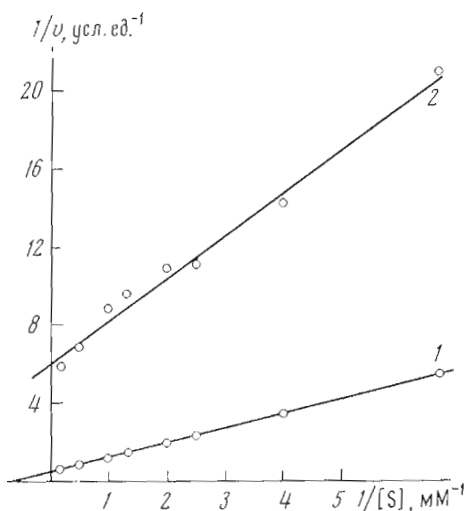
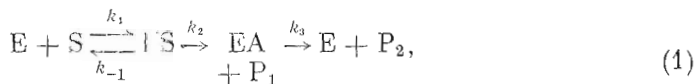


Рис. 2. Зависимость тангенсов углов наклона начальной (1) и стационарной стадии гидролиза (рН 7) (2) от концентрации субстрата в обратных координатах

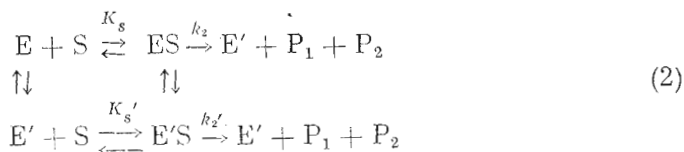
Такой характер зависимости выделения продукта ферментативной реакции от времени сам по себе интересен, так как свидетельствует о более сложном механизме действия фермента, чем механизм, описываемый классической схемой Михаэлиса — Ментен. Аналогичный характер выделения *n*-нитрофенола был установлен для гидролиза *n*-нитрофенилацетата под действием α -химотрипсина и других сериновых гидролаз [6—8], для которых постулируется трехстадийный механизм гидролиза субстратов с двумя промежуточными соединениями (комплекс Михаэлиса и ацилфермент). Для выяснения вопроса о возможной стадийности процесса гидролиза субстрата при рН 7 была проанализирована зависимость скорости гидролиза субстрата для обоих этапов реакции от концентрации субстрата (рис. 2). На рисунке представлены зависимости тангенсов углов наклона первой и стационарной стадий в зависимости от концентрации субстрата в обратных координатах (обработку кинетических кривых $D_{400} \div t$ проводили по методу, описанному в работах [9, 10]). Если гидролиз субстрата под действием фосфодиэстеразы протекает с промежуточным образованием фосфорилированного фермента, то уравнение реакции должно быть следующим:



где EA — фосфорилированный n -нитрофенилфосфатом фермент. Так как при этом $K_m/k_2 [E]_0 = K_{m(\text{каж})}/k_{\text{кат}} [E]_0$, где константа Михаэлиса $K_m = (k_{-1} + k_2)/k_1$, $k_{\text{кат}} = k_2 k_3 / (k_2 + k_3)$, $K_{m(\text{каж})} = K_m k_3 / (k_2 + k_3)$, то тангенсы углов наклона прямых первой и второй стадий должны совпадать. Однако, как следует из рис. 2, это не выполняется — прямые 1 и 2 имеют разные углы наклона, т. е. отношения кинетических параметров для обеих стадий процесса не равны друг другу. Кроме того, было показано, что добавление в реакционную кювету (условия опыта см. «Экспериментальную часть» и подпись к рис. 1) избытка щелочной фосфатазы *E. coli* — фермента, для которого продукт гидролиза фосфодиэстеразой — n -нитрофенилфосфат сам является субстратом, вызывает увеличение выделения n -нитрофенолятиона на начальной стадии гидролиза при pH 7 приблизительно в 2 раза, т. е. выделение продуктов ферментативной реакции происходит одновременно. Таким образом, уравнение (1) не согласуется с наблюдаемым кинетическим поведением фосфодиэстеразы яда гюрзы.

Для быстрого выделения продукта в первый момент после смешивания фермента с субстратом можно дать несколько объяснений [11]. Кроме выше рассмотренного предположения наблюдаемый характер процесса ферментативного гидролиза может объясняться сильным ингибированием фермента продуктом, которое приводит к тому, что после первоначального быстрого образования продукта из фермент-субстратного комплекса в дальнейшем продукт образуется из тройного комплекса фермент — субстрат — продукт с меньшей скоростью. Для проверки такой возможности было исследовано влияние на скорость ферментативной реакции при pH 7 продуктов гидролиза: n -нитрофенола и n -нитрофенилфосфата. Присутствие n -нитрофенола в концентрации, соответствующей выделению его на первой стадии процесса, не оказывает существенного влияния на скорость ферментативной реакции. В то же время добавление второго продукта реакции, n -нитрофенилфосфата, в кювету с субстратом (2,5 мМ) непосредственно перед добавлением фермента оказывает на скорость катализа ингибирующее влияние, которое проявляется на обеих стадиях ферментативного гидролиза. Вычисленная для этого продукта константа ингибирования (K_i) равна $\sim 0,16$ мМ (при 25° и концентрации субстрата 2,5 мМ). При уменьшении концентрации субстрата наблюдается тенденция к увеличению эффекта ингибирования продуктом. Таким образом, присутствие n -нитрофенилфосфата в реакционной смеси в концентрации, соответствующей выделению его на первой стадии ферментативной реакции, оказывает только ингибирующее влияние на обе стадии катализа, не изменяя характера кинетической кривой.

Наиболее разумное объяснение полученных экспериментальных результатов может быть основано на предположении конформационного изменения начальной активной формы фермента E , происходящего параллельно с реакцией гидролиза, с образованием менее активной формы E' , которая сравнительно медленно релаксирует обратно в исходную форму E [11, 12]:



где $k_2 > k'_2$.

Экспериментальная часть

Фосфодиэстеразу выделяли из яда гюрзы по методу [5] (модификация [3]), уд. акт. фермента 20 ед/мл; за единицу активности принимали количество фермента, которое в 3 мл раствора, содержащего 1 мМ бис- n -нитрофенилфосфат, 3,3 мМ $MgCl_2$ и 50 мМ трис-HCl (pH 8,5), вызывает в те-

чение 10 млн при 25° увеличение D_{400} на единицу. В полученном растворе отсутствовала 5'-нуклеотидазная активность.

Щелочная фосфатаза *E. coli* выделена по методу работы [13], уд. акт. препарата 1400 ед/мл; за единицу активности принимали количество фермента, которое при 37° в 20 mM растворе *p*-нитрофенилфосфата, содержащего 3 mM $MgCl_2$ и 0,5 M трис-HCl (pH 8,0), за 1 ч вызывает гидролиз 1 мкмоль субстрата (степень гидролиза определяли спектрофотометрически при 400 нм по образованию *p*-нитрофенолят-иона).

Все остальные препараты и компоненты буферных растворов были марки ч.д.а. Гидролиз бис-*p*-нитрофенилфосфата фосфодиэстеразой при pH 7 проводили при концентрации фермента 2 ед. акт./мл в 0,15 M трис-HCl при 25°.

Кинетические исследования осуществляли спектрофотометрированием реакционных растворов при 400 нм ($\lambda_{\text{макс}}$ *p*-нитрофенолят-иона), для чего использовали двухлучевой спектрофотометр «Specord UV-Vis» (ГДР). В специальном опыте показано, что увеличение концентрации трис-HCl-буфера в реакционном растворе (pH 7) существенно не влияет на характер получаемых кинетических кривых гидролиза субстрата, однако оказывает заметное активирующее влияние на скорость второй стадии гидролиза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кнорре Д. Г., Меламед Н. В., Старостина В. К., Шубина Т. Н. (1973) Биохимия, 38, 121—123.
2. Шапот В. С. (1968) Нуклеазы, с. 104—107, «Медицина», М.
3. Берлин Ю. А., Дьяков В. Л., Колосов М. Н. (1974) Биохимия, 39, 747—750.
4. Nikolskaya I. I., Shalina N. M., Tikhonenko T. I. (1964) Biochim. et biophys. acta, 91, 354—357.
5. Василенко С. К. (1963) Биохимия, 28, 602—605.
6. McDonald C. E., Balls A. K. (1957) J. Biol. Chem., 227, 727—736.
7. Inagami T., Sturtevant J. M. (1960) J. Biol. Chem., 235, 1019—1023.
8. Semeriva M., Chapus C., Bovier-Lapierre C., Desauelle P. (1974) Biochem. and Biophys. Res Commun, 58, 808—813.
9. Gutfreund H., Sturtevant J. M. (1956) Biochem. J., 63, 656—661.
10. Березин И. В., Коломийцева Г. Я., Левашов А. В., Маринек К. (1967) Молекулярн. биология, 1, 67—74.
11. Дженкс В. (1972) Катализ в химии и энзимологии, с. 45—46, «Мир», М.
12. Frieden C. (1970) J. Biol. Chem., 245, 5788—5799.
13. Garen A., Levinthal C. (1960) Biochim. et biophys. acta, 38, 470—483.

Поступила в редакцию
21.VII.1975

THE KINETIC PECULIARITIES IN THE HYDROLYSIS OF DI(*p*-NITROPHENYL)PHOSPHATE BY PHOSPHODIESTERASE [FROM GURZA VENOM

DYAKOV V. L.

*M. F. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

The kinetics of the hydrolysis of di(*p*-nitrophenyl) phosphate by phosphodiesterase from gurza venom have been studied. At pH 7.0 the hydrolysis has been shown to represent a two-step process: the first stage involves rapid formation of *p*-nitrophenolate anion which is proportional to the amounts of the enzyme, whereas the second one is slower stationary hydrolysis. The difference in the ratio of the kinetic parameters for the two stages indicates that the three-step mechanism implying phospho-enzyme formation is not applicable in this case.