



УДК 577.152.111:547.426.24'185

ГИДРОЛИЗ ФОСФОЭФИРНОЙ СВЯЗИ ГЕМНЕЗАВИСИМОЙ ХЛОРИДПЕРОКСИДАЗОЙ ИЗ *Serratia marcescens*

© 2003 г. Ю. В. Преображенская[#], А. И. Воскобоев, В. Н. Бурдь

Гродненский государственный университет им. Я. Купалы, 230012, Гродно, пер. Доватора, 311, Беларусь

Поступила в редакцию 20.04.2002 г. Принята к печати 04.11.2002 г.

Показано, что гем- и металлнезависимая хлоридпероксидаза из штамма *Serratia marcescens* W 250 способна катализировать гидролиз *n*-нитрофенилфосфата. Определены параметры фосфатазной реакции, ингибиторы и активаторы процесса. Предложен гипотетический механизм гидролиза фосфоэфиров гем- и металлнезависимыми галогенидпероксидазами.

Ключевые слова: *n*-нитрофенилфосфат; хлоридпероксидаза *Serratia marcescens*.

ВВЕДЕНИЕ

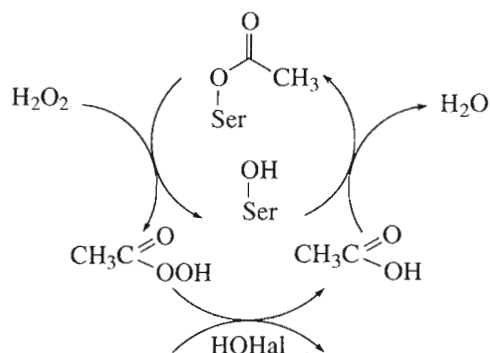
К галогенидпероксидазам относят ферменты из класса оксидоредуктаз, способные включать атомы галогенов в молекулы органических субстратов при участии пероксида водорода и галогенид-ионов (КФ 1.11.1.10). В зависимости от типа простетической группы, с помощью которой галогенидпероксидазы осуществляют окислительно-восстановительную реакцию, их подразделяют на гем- и ванадийзависимые [1]. Некоторые бактериальные галогенидпероксидазы не имеют простетической группы, и реакция галогенирования, катализируемая ими, протекает по весьма своеобразному механизму в присутствии ацетат-ионов. В активном центре таких ферментов ключевую роль играет каталитическая триада аспартат–гистидин–серин [2].

Ацетат-ионы связываются ковалентно с нуклеофильным остатком серина с образованием сложноэфирной связи, которая гидролизуется в дальнейшем пероксидом водорода с образованием надуксусной кислоты. Последняя, как сильный окисляющий агент, способна окислять галогенид-ионы до гипогалогеновых кислот. Образующиеся гипогалогениды легко вводят в органические субстраты атомы галогенов [3] (см. схему 1).

Как и остальные галогенидпероксидазы, бактериальные гем- и металлнезависимые представители данной группы ферментов катализируют и другие реакции окисления, например, сульфидов до сульфоксидов, ароматических аминов до нитропроизводных [3–6]. Вероятно, вследствие схожести по строению активного центра с сериновыми гидролазами, гем- и металлнезависимые галогенидпероксидазы оказались способны гид-

ролизировать некоторые связи, в частности, сложноэфирные [3, 7]. Столь широкая субстратная специфичность позволяет считать бактериальные гем- и металлнезависимые галогенидпероксидазы весьма перспективными в области биотехнологии, тонкого органического синтеза, а успешное клонирование соответствующих генов делает их вполне доступными [8–10].

В 1995 г. нами была выделена из бактериального штамма *Serratia marcescens* W 250 и очищена в натрий-ацетатном буфере гем- и металлнезависимая хлоридпероксидаза (CPO, КФ 1.11.1.10) [11]. Белок состоит из двух идентичных субъединиц *M* 29000 Да и обладает высокой активностью при высокой термоустойчивости. В присутствии CPO с высокой скоростью протекает хлорирование индола, бромирование моно-



олефин → бромгидрин
β-дикетоны → бромдикетоны
фенолы → галогенидпроизводные фенолов
пирролы → галогенидпроизводные пирролов

Схема 1.

Сокращения: CPO – хлоридпероксидаза; NPP – *n*-нитрофенилфосфат; PMSF – фенолметилсульфонилфторид.

[#] Автор для переписки (эл. почта: burd@mail.grsu.grodno.by).



Рис. 1. Выход по белку (1) и бромирующей активности (2) при аффинной хроматографии экстракта СРО на голубой сефарозе.

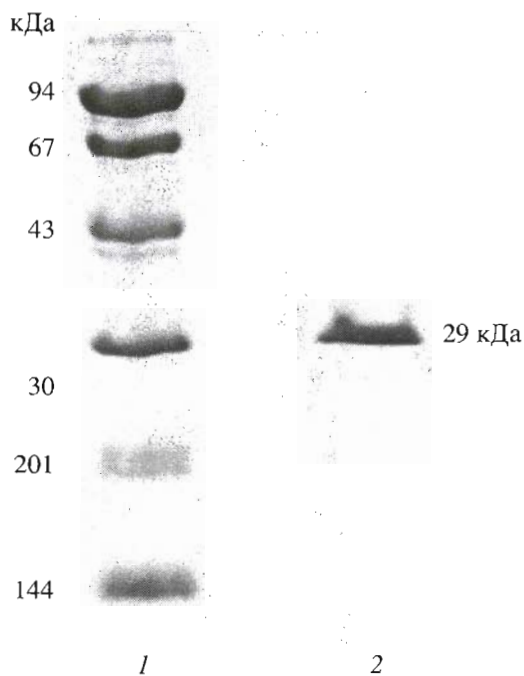


Рис. 2. SDS-гель-электрофорез СРО после хроматографии на голубой сефарозе (2); 1 — стандарты молекулярной массы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для обнаружения фосфатазной активности выделение и очистку фермента вели в калий-фосфатном буфере, так как в ацетатной среде наблюдалось заметное ингибирование данной реакции (фермент, выделенный в фосфатном буфере, демонстрирует фосфатазную активность в два раза более высокую, чем препарат, полученный в натрий-ацетатном буфере). Очищенный после фракционирования сульфатом аммония, анионообменной хроматографии, гель-фильтрации и аффинной хроматографии (рис. 1) белок гомогенен, что было показано с помощью диск-электрофореза в ПААГ с SDS (рис. 2). Фосфатазная активность СРО может быть определена только после стадии анионообменной хроматографии, что обусловлено присутствием в сыром экстракте пигмента продигозина, дающего дополнительный пик поглощения при 410 нм в щелочной среде ($pH > 10$). Поэтому результаты очистки приводятся по галогенидпероксидазной (бромирующей) активности (таблица, рис. 1). Удельная галогенидпероксидазная активность гомогенного фермента составляет 217.0 мкмоль/(мин мг белка), а удельная фосфатазная активность — 60.1 нмоль/(мин мг белка).

Полученные результаты показали, что гидролиз NPP СРО протекает в кислой среде (оптимум pH лежит в пределах 5.2–6.1) и температурный оптимум находится в области 55–60°C. При температуре 65°C начинается тепловая денатурация фермента, что приводит к постепенному снижению активности. Таким образом гидролиз фосфоэфирной связи может идти при сравнительно высоких для ферментативного процесса температурах, что весьма важно для реакции в препаративном отношении.

Обнаружено влияние на фосфатазную активность СРО ряда ингибиторов щелочных фосфатаз: вольфрамата (1 мМ, 23% остаточной активности), тартрата (20 мМ, 90% остаточной активности), а также активатора щелочной фосфатазы Mg^{2+} (3 мМ, 131% активности). Однако такой ингибитор щелочной фосфатазы, как фторид-ион, оказывает активирующий эффект на фосфатазную активность исследуемой СРО (0.3 мМ, 131% активности). Интересно, что галогенирующая активность СРО фторид-ионами в указанной концентрации нацело ингибировалась [5]. Константа Михаэлиса для реакции гидролиза NPP, графически определенная в координатах Лайнуивера-Берка, составляет 1.8 ± 0.1 мМ при pH 5.7.

Достаточно высокое для фосфатаз значение K_m (обычно 0.1–0.2 мМ, [12]) позволяет предположить, что данная СРО проявляет фосфатазную активность в качестве дополнительной. Наряду с ингибирующим влиянием ацетат-ионов на фосфатазную активность СРО обнаружено также ин-

хлордимедона и фенолового красного, окисление ароматических аминов до соответствующих нитросоединений, а также гидролиз сложных эфиров карбоновых кислот с небольшим числом атомов углерода [5, 6].

В настоящей работе показано, что СРО из *S. marcescens* способна катализировать гидролиз фосфоэфирной связи (на примере гидролиза *n*-нитрофенилфосфата, NPP).

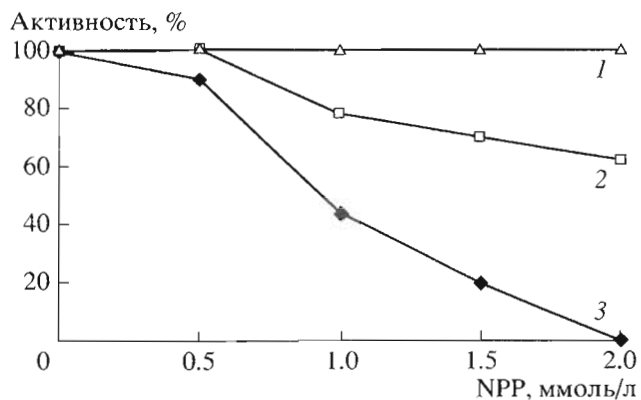


Рис. 3. Влияние NPP на галогенидпероксидазную активность СРО в присутствии 1 (1), 0.6 (2) и 0.4 М (3) ацетат-ионов.

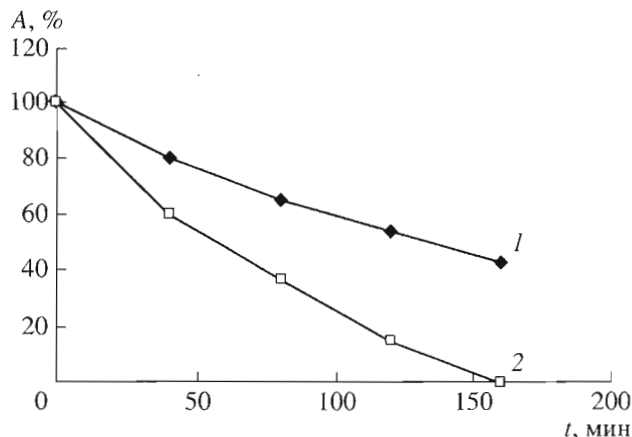


Рис. 4. Влияние PMSF (2 мМ) на фосфатазную активность СРО (0.1 М Трис-НСl, рН 6) в присутствии (1) 0.1 М фосфат-ионов и в их отсутствие (2).

гибирование по смешанному типу галогенидпероксидазной активности фермента фосфат-ионами с K_i , равной 75 мМ при рН 6. Эти данные в совокупности с отсутствием ингибирования галогенидпероксидазной активности в присутствии NPP при насыщающей концентрации ацетат-ионов (1 М, рис. 3) дают основание думать, что гидролиз фосфоэфиров протекает в том же активном центре, который ответствен за проявление ферментом галогенидпероксидазной и эстеразной активности.

Подтверждением сказанного является обнаруженное нами необратимое ингибирование фосфатазной активности модификатором остатка серина фенолметилсульфонилфторидом (PMSF), которое протекает значительно быстрее в среде, не содержащей фосфат-ионов (рис. 4). Это легко объясняется наличием конкуренции между фосфат-ионами и PMSF при связывании с остатком серина в активном центре.

Отщепляемый остаток фосфата, вероятно, присоединяется ковалентно к остатку серина активного центра СРО согласно схеме 2.

Таким образом, проведенное исследование показало, что нуклеофильной атаке остатком серина может подвергаться не только сложноэфирная связь, образованная атомом углерода, но и ортофосфорные эфиры ароматических производных. Полученные нами данные по проявлению фосфатазной активности гемнезависимой СРО из *S. marcescens* согласуются с приведенной ранее схемой механизма галогенирования бактериальными гем- и металлнезависимыми галогенидпероксидазами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для получения хлоридпероксидазы использовали дикий штамм *S. marcescens* W 250, выделенный в Институте микробиологии университета Хоэнхайм (Германия).

В работе были использованы следующие реактивы и материалы: DEAE-сефадекс, сефадекс G-100, голубая сефароза CL-4B (Pharmacia AB, Biotechnology, Швеция), акриламид, бисакриламид, Кумасси бриллиантовый голубой G-250 (Reanal, Венгрия), додецилсульфат натрия и монохлордимедон (Sigma, США), *n*-нитрофенилфосфат

Очистка СРО из *S. marcescens* в калий-фосфатном буфере (по галогенидпероксидазной (бромирующей) активности)

Стадия	Количество белка, мг	Общая активность, мкмоль/мин	Удельная активность, мкмоль/мин мг белка	Выход активности, %	Степень очистки
Сырой экстракт	372.0 ± 20	53.5 ± 1.4	0.14 ± 0.02	100	1
Очистка сульфатом аммония	63.7 ± 0.9	41.4 ± 1.0	0.65 ± 0.05	78	5
Ионообменная хроматография на DEAE-сефадексе	3.08 ± 0.05	210.0 ± 1.1	68.2 ± 0.6	394	477
Гель-фильтрация на сефадексе G-100	1.36 ± 0.04	213.4 ± 0.9	157.0 ± 12	400	1095
Хроматография на голубой сефарозе	0.50 ± 0.03	108.6 ± 0.7	217.1 ± 20	203.7	1518

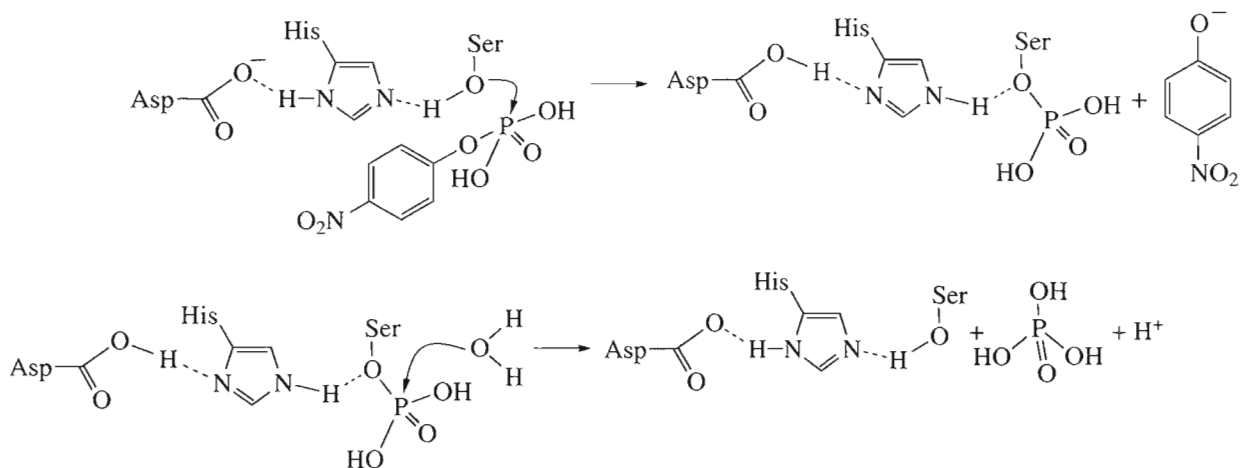


Схема 2.

(Boehringer Mannheim, Германия). Остальные реактивы марки не ниже “х.ч.”.

Культивирование клеток и получение сырого экстракта описаны нами ранее [11].

Выделение фермента. Фракционирование сульфатом аммония проводили в диапазоне 45–85% сульфата аммония от насыщения. Удаляли соль из раствора фермента с помощью диализа против 0.05 М калий-фосфатного буфера (рН 7.5). Ионообменную хроматографию осуществляли на колонке (2.5 × 60 см) с DEAE-сефадексом, уравновешенной 0.05 М калий-фосфатным буфером (рН 7.5) с 1.5% глицерина. Элюент – линейный градиент 0 → 1.0 М раствора NaCl в том же буфере (общий объем элюента составил 600 мл, объем фракций 4 мл). Гель-фильтрацию производили на колонке (2.5 × 100 см) с сефадексом G-100, предварительно уравновешенной 0.1 М калий-фосфатным буфером (рН 6.2). Аффинную хроматографию осуществляли на колонке (0.5 × 10 см) с голубой сефарозой CL-4В. Белок элюировался 0.02 М калий-фосфатным буфером (рН 5.7, объем фракций 0.8 мл).

Диск-электрофорез проводили по методу Лэмбли в 5% концентрирующем и 10% разделяющем ПААГ в присутствии SDS. Окраску белковых полос осуществляли 0.1% Кумасси бриллиантовым голубым G-250.

Галогенидпероксидазную (бромирующую) активность СРО измеряли спектрофотометрически (СФ-46, СССР) по скорости убывания (ммоль/мин) 2-хлор-5,5-диметил-1,3-циклогександиона (монохлордимедон, 48 мкМ) при 290 нм ($\epsilon = 19000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [1]). В реакционной среде (1.0 М ацетат натрия, рН 5.5) находились также пероксид водорода (8.8 мМ), бромид натрия (100 мМ) и азид натрия (10 мМ).

Фосфатазную активность СРО регистрировали после инкубации фермента с NPP (45 мин, 37°C) в среде калий-фосфатного или Трис-HCl-буфера (0.1 М, рН 6, [NPP] – 6 мМ). Реакцию останавливали добавлением 0.1 М NaOH и спектрофотометрически измеряли накопление *n*-нитрофенола при длине волны 410 нм ($\epsilon = 18300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [15]). Варьировали: значение рН от 4.2 до 7.5 (при определении рН-оптимума фосфатазной активности СРО), температуру от 20 до 80°C (при изучении температурного оптимума реакции), концентрацию субстрата от 3 до 45 мМ (при определении константы Михаэлиса, рН 5.7).

Концентрацию белка определяли спектрофотометрически, измеряя оптическое поглощение раствора при 280 и 260 нм, с последующим расчетом по уравнению:

$$C_{\text{белка}} (\text{мг/мл}) = 1.45A_{280} - 0.74A_{260}.$$

Работа выполнена при поддержке Министерства образования РБ (грант № 20013457).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Neidleman S.L., Geigert J. Biohalogenation: Principles, Basic Roles and Applications. Chichester, UK: Ellis Horwood, 1986.
2. van Pee K.-H. // Annu. Rev. Microbiol. 1996. V. 50. P. 375–399.
3. Picard M., Gross J., Lubbert E., Toelzer S., Kraus S., van Pee K.-H., Berkessel A. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1997. V. 36. P. 1196–1199.
4. Colonna S., Gaggero N., Manfredi A. // Biochem. J. 1990. V. 29. P. 10465–10468.
5. Kirner S., van Pee K.-H. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1994. V. 33. P. 352.
6. Бурдь В.Н., ван Пе К.-Х. // Биоорган. химия. 1998. Т. 24. С. 462–464.

7. Бурдь В.Н., Васильева О.В., Воскобоев А.И., Тольцер С., ван Пе К.-Х. // Весті НАН РБ. 1999. № 1. С. 91–94.
8. Pelletier I., Pfeifer I., Altenbuchner J., van Pee K.-H. // J. Gen. Microbiol. 1992. V. 138. P. 1123–1131.
9. Wolfframm C., Lingens F., van Pee K.-H., Mutzel R. // Gene. 1993. V. 130. P. 131–135.
10. Bantleon R., Altenbuchner J., van Pee K.-H. // J. Bacteriol. 1994. V. 176. P. 2339–2347.
11. Burd W., Yourkevich O., Voskoboev A.I., van Pee K.-H. // FEMS Microbiol. Lett. 1995. V. 129. P. 255–260.
12. Hemrika W., Renirie R., Dekker H.L., Barnett P., Weaver R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 2145–2149.
13. Hecht H.J., Sobek H., Haag T., Pfeifer O., van Pee K.-H. // Nature Struct. Biol. 1994. V. 1. P. 532–537.
14. Бурдь В.Н., Васильева О.В., Воскобоев А.И., ван Пе К.-Х. // Биохимия. 1998. Т. 63. С. 1529–1531.
15. Torriani A.M. // Biochim. Biophys. Acta. 1960. V. 38. P. 460–469.

Hydrolysis of Phosphoester Bond by the Heme-Independent Chloroperoxidase from *Serratia marcescens*

Yu. V. Preobrazhenskaya[#], A. I. Voskoboev, and V. N. Burd

[#]E-mail: burd@mail.grsu.grodno.by

Kupala State University, per. Dovatora 3/1, Grodno, 230012 Belarus

Heme- and metal-independent chloroperoxidase from *Serratia marcescens* W 250 is shown to be capable of catalyzing the *p*-nitrophenyl phosphate hydrolysis. The parameters of the phosphatase reaction are determined and inhibitors and activators of the process are found. A hypothetical mechanism of the hydrolysis of phosphoesters by heme- and metal-independent haloperoxidases is suggested. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 6; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: chloroperoxidase from *Serratia marcescens*, *p*-nitrophenyl phosphate