



УДК 577.15.2.351*11.04

© 1992 г. В. Е. Кабаков, Ш. Меркер*, Е. В. Козлова**,
А. В. Пшежецкий**, В. К. Швядас**, К. Мартинек***,
Н. Л. Клячко, А. В. Левашова

РЕГУЛЯЦИЯ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И НАДМОЛЕКУЛЯРНОЙ СТРУКТУРЫ ПЕНИЦИЛЛИНАЦИЛАЗЫ ИЗ *ESCHERICHIA COLI* В СИСТЕМЕ ОБРАЩЕННЫХ МИЦЕЛЛ АЭРОЗОЛЯ ОТ В ОКТАНЕ

Кафедра химической эволюции Московского государственного университета
им. М. В. Ломоносова;

* FZB-Биотехника, Берлин, Германия;

** Лаборатория молекулярной биологии и биоорганической химии МГУ
им. М. В. Ломоносова;

*** Институт органической химии и биохимии, Академия наук Чехо-Словакии,
Прага

Изучены свойства пенициллинацилазы из *E. coli*, солиобилизованной гидратированными обращенными мицеллами Аэрозоля ОТ (АОТ) в октано. Зависимость каталитической активности фермента от степени гидратации АОТ, параметра $w = [H_2O]/[АОТ]$, определяющего размеры мицелл, имеет вид кривой с тремя оптимумами, соответствующими условиям функционирования фермента как в гетеродимерной форме ($w_0=23$), так и в виде отдельных субъединиц – тяжелой, β ($w_0=20$), и легкой, α ($w_0=14$). Факт диссоциации фермента в системе обращенных мицелл продемонстрирован методом ультрацентрифугирования, а также последующим электрофорезом. Показана принципиальная возможность препаративного разделения субъединиц пенициллинацилазы с сохранением их каталитической активности.

Молекула пенициллинацилазы из *E. coli* (КФ 3.5.1.11) состоит из двух неидентичных субъединиц, легкой (α) с мол. массой ~23 кДа и тяжелой (β) с мол. массой ~62 кДа, образующихся при биосинтезе этого фермента из одного общего полипептида-предшественника [1, 2]. Роль такой структурной организации неясна, однако полагают [3], что каталитический центр фермента целиком расположен на тяжелой субъединице, а с участием легкой субъединицы реализуется субстратная специфичность в процессе связывания с ней боковых цепей пенициллинов. Предположение о том, что активный центр пенициллинацилазы формируется лишь в димере с участием обеих субъединиц, формально подтверждается экспериментами по разделению субъединиц [3, 4], в результате чего происходит полная потеря каталитической активности. Однако здесь следует принять во внимание то обстоятельство, что в соответствии с классическими приемами энзимологии диссоциацию олигомерных ферментов (стадию, предшествующую разделению субъединиц) проводят, как правило, в жестких денатурирующих условиях (см., например, [5, 6]), и эксперименты с пенициллинацилазой не составили исключения из этого «правила».

К настоящему времени предложен [7] и нашел эффективное практическое применение [7–10] новый подход к исследованию олигомерных

Принятые сокращения: ПАВ – поверхностно-активное вещество, аэрозоль ОТ (АОТ) – натриевая соль ди-2-этилгексилового эфира сульфоянтарной кислоты, SDS – додецилсульфат натрия, PMSF – фенилметансульфонилфторид.

ферментов, включающий их «мягкую» разборку на составляющие субъединицы в неденатурирующих условиях. Суть этого подхода заключается в использовании систем обращенных мицелл ПАВ в органических растворителях, нашедших широкое применение в энзимологии в первую очередь в качестве среды для ферментативных реакций (см. обзоры [11–13]). Помимо выполнения этой функции обращенные мицеллы могут выступать в роли матриц регулируемого размера для сборки белковых ассоциатов (комплексов) различного состава. Дело в том, что размеры обращенных мицелл можно целенаправленно варьировать, изменяя степень гидратации ПАВ, $w_0 = [H_2O]/[AOT]$, и таким образом можно подбирать условия, благоприятные для формирования в полости обращенных мицелл тех или иных белковых ассоциатов или, наоборот, способствующие диссоциации белкового комплекса на составляющие его компоненты-субъединицы в случае олигомерных ферментов. В свою очередь отметим, что оптимальная каталитическая активность ферментов, солюбилизованных в обращенных мицеллах наблюдается в условиях соответствия (равенства) размеров белка и белковой матрицы [14]. Согласно этому общему принципу регуляции ферментов, на зависимости каталитической активности от w_0 в случае олигомерных ферментов обнаруживается несколько оптимумов, соответствующих функционированию различных (надмолекулярных) форм, в том числе и отдельных субъединиц [7–10]. Стехиометрия включения белка в обращенную мицеллу может быть определена методом ультрацентрифугирования [14] (см. также [7–10]).

В данной работе эта методология была применена к пенициллинацилазе, чтобы решить принципиальный вопрос о возможности «мягкой» диссоциации фермента и о каталитической функции его отдельных субъединиц.

Зависимость каталитической активности пенициллинацилазы в системе обращенных мицелл АОТ в октане от степени гидратации ПАВ. Как видно из рис. 1, на этой зависимости четко прослеживаются по крайней мере три максимума при степенях гидратации около 14, 20 и 23. В соответствии с приведенными выше рассуждениями логично предположить, что наблюдаемые максимумы отражают функционирование отдельно легкой и тяжелой субъединиц, а также их гетеродимера. Теоретический расчет, сделанный по описанной ранее модели [9, 10, 15] для отдельных субъединиц и димера пенициллинацилазы, принимая за сферические частицы с мол. массами, равными 26, 63 и 89 кДа соответственно, дают значения оптимальных w_0 на несколько единиц ниже. Расхождение расчетных и экспериментальных величин в принципе может быть обусловлено рядом причин, например наличием примесных белков, увеличивающих мол. массы образующихся форм фермента, и/или их несферичностью. Поэтому для прояснения наблюдаемой картины необходимо было использовать дополнительные методические приемы, в первую очередь хорошо зарекомендовавший себя для решения подобных задач метод седиментационного анализа [9, 10, 14].

Ультрацентрифугирование систем обращенных мицелл АОТ в октане, содержащих солюбилизованную пенициллинацилазу. Из данных по ультрацентрифугированию пенициллинацилазы в системах обращенных мицелл (рис. 2) видно, что при степенях гидратации >22 на седиментограммах наблюдается только один тип белоксодержащих мицелл, а именно содержащий димерную форму. При меньших степенях гидратации обнаруживается два типа белоксодержащих мицелл, с очевидностью содержащих раздельно α - и β -субъединицы пенициллинацилазы. Наблюдающееся существенное различие в коэффициентах седиментации этих двух типов мицелл позволяет их фракционировать. Иными словами, при ультрацентрифугировании мицеллы, содержащие тяжелую субъединицу, мо-

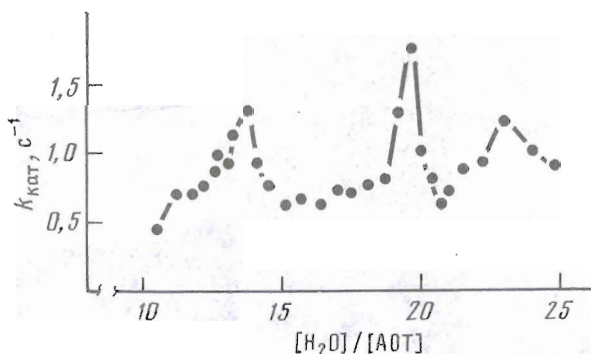


Рис. 1. Влияние степени гидратации ПАВ на каталитическую активность пенициллинацилазы в системе обращенных мицелл. Условия эксперимента: $[E]_0$ 0,1 мкМ, $[AOT]$ 0,1 М, 50 мМ трис-НСl-буфер (рН 7,5), 25° С.

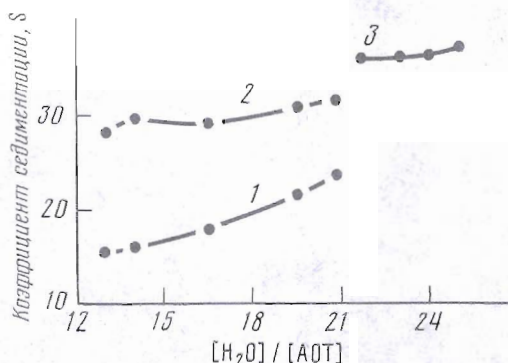


Рис. 2. Зависимость коэффициентов седиментации обращенных мицелл, содержащих пенициллинацилазу, от степени гидратации (1 – α -субъединица, 2 – β -субъединица, 3 – $\alpha\beta$ -гетеродимер)

гут быть практически целиком осаждены, тогда как значительная часть мицелл с легкой субъединицей остается в растворе. Получаемые таким способом препараты фермента были проанализированы методом SDS-электрофореза (рис. 3): исходный препарат пенициллинацилазы содержит две основные белковые компоненты с мол. массами 26 и 63 кДа, т. е. легкую и тяжелую субъединицы, однако электрофореграмма обнаруживает лишь тяжелую β -субъединицу (с небольшой примесью легкой) в случае анализа «осадка» после центрифугирования мицелл. Таким образом, данные седиментационного анализа в сочетании с SDS-электрофорезом подтверждают предположение о том, что в системе обращенных мицелл АОТ в октане происходит контролируемая величиной степени гидратации ПАВ (размерами мицелл) обратимая диссоциация пенициллинацилазы на субъединицы, причем, как следует из рис. 1, с сохранением обеими субъединицами каталитической активности. Принципиальным подтверждением этого вывода служит эксперимент по поэтапному воспроизведению зависимости, представленной на рис. 1, с использованием препаратов частично разделенных субъединиц (осадка и супернатанта после центрифугирования). Как видно из рис. 4а, для препарата α -субъединиц, солюбилизированного обращенными мицеллами, наблюдается только один оптимум на зависимости каталитической активности от степени гидратации ПАВ при значении w_0 , что соответствует первому максимуму

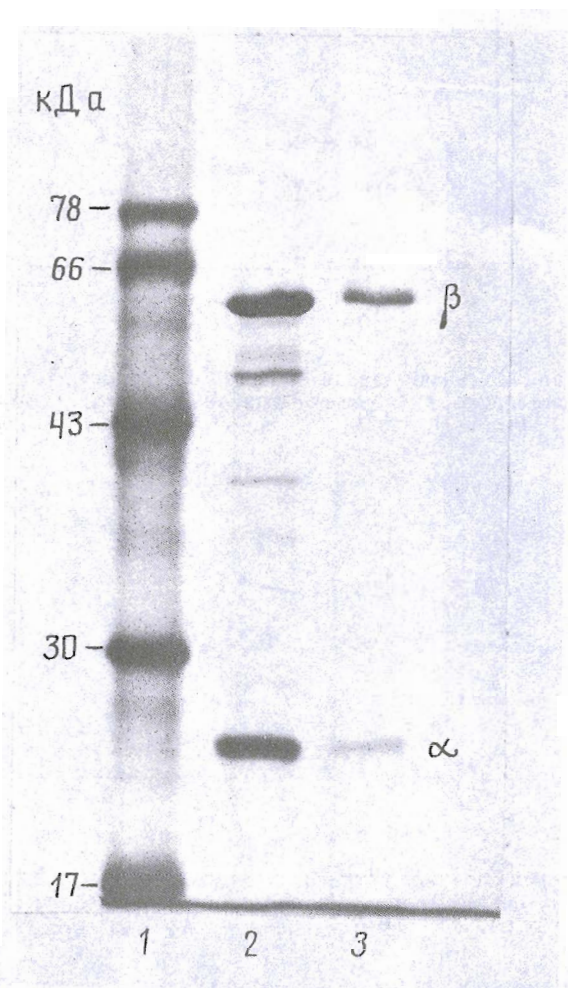


Рис. 3. Электрофорез в ПААГ препаратов пенициллинацилазы: 1 — белки-стандарты, 2 — исходный препарат пенициллинацилазы, 3 — «осадок» после ультрацентрифугирования. Условия эксперимента см. в «Экспериментальной части»

на рис. 1. В случае фракции β -субъединиц в аналогичном эксперименте (рис. 4б) прослеживается также лишь один оптимум, но положение его соответствует максимуму для тяжелой субъединицы на рис. 1. При смешении обоих мицеллярных растворов на зависимости наблюдаемой каталитической активности от степени гидратации ПАВ наблюдаются все три оптимума (рис. 4в), как и на рис. 1.

Тот факт, что обе субъединицы пенициллинацилазы обнаруживают каталитическую активность, заставляет допустить наличие у них самостоятельных активных центров. Это может показаться удивительным, поскольку при использовании титрантов, в частности фенолметансульфонилфторида, в экспериментах с водными растворами, т. е. для димерной формы фермента, показано наличие лишь одного каталитического центра [16]. Для решения этого вопроса изучено действие PMSF на выявленные в настоящей работе формы пенициллинацилазы.

Ингибиторный анализ пенициллинацилазы. Титрование активных

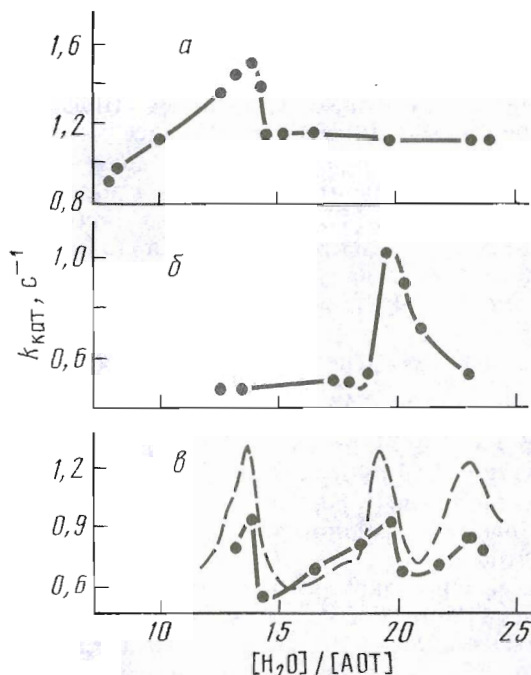


Рис. 4. Зависимость от степени гидратации каталитической активности α - (а) и β -субъединиц (б) пенициллинацилазы и их смеси (в), штриховой линией показана исходная зависимость (см. рис. 1). Условия эксперимента см. рис. 1; $[E]_0$ 0,04 мкМ

центров фермента в системе обращенных мицелл было проведено при двух степенях гидратации — 14 и 23, т. е. в условиях существования раздельно субъединиц и их гетеродимера соответственно. Было найдено, что количество ингибитора, требуемое для инактивации смеси субъединиц, примерно в 2 раза превышает количество, требуемое для инактивации их димера. Иначе говоря, при диссоциации фермента образуется новый (дополнительный) каталитический центр. Это подтверждается также тем, что при солюбилизации фермента, полностью инактивированного с помощью PMSF в водном растворе, в системе обращенных мицелл обнаруживается каталитическая активность с оптимумом при $w_0=14$, т. е. в условиях функционирования легкой субъединицы. По-видимому, каталитический центр, локализованный на легкой субъединице, в димере пространственно экранирован и не функционирует. При диссоциации пенициллинацилазы на субъединицы в обращенных мицеллах активный центр α -субъединицы становится доступным для молекул PMSF, что и приводит к изменению стехиометрии связывания фермента с ингибитором.

Наличие каталитической активности у отдельных субъединиц вызывает целую серию дополнительных вопросов, связанных с причинами подобной организации фермента и возможными различиями в активных центрах легкой и тяжелой субъединиц, в первую очередь в плане субстратной специфичности. В этом направлении предполагается осуществить дальнейшие исследования.

Авторы выражают глубокую признательность В. Я. Черняку и П. А. Калмыкову за помощь в проведении и обсуждении результатов седиментационного анализа и Миннауки РФ за финансовую поддержку в рамках гранта 1—77 направления «Новейшие методы биотехнологии» по проблеме «Инженерная энзимология».

Пенициллинацилазу (КФ 3.5.1.11) из *E. coli* очищали ионообменной хроматографией на DEAE-сефарозе (Pharmacia, Швеция) и гель-фильтрацией на сефадексе G-200 (Pharmacia, Швеция). Активность выделенного фермента составляла 26 ед./мг (единица соответствует активности, при которой за 1 мин гидролизует 1 мкмоль *n*-нитроанилида фенилуксусной кислоты при pH 7,5 и 25°С). Чистоту полученного препарата контролировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия.

Аэрозоль ОТ (Merck, ФРГ) использовали без дополнительной очистки.

n-Нитроанилид фенилуксусной кислоты любезно предоставлен А. А. Щеголевым.

Измерение скорости ферментативной реакции в системе обращенных мицелл [8]. В 1,6 мл 0,1 М раствора АОТ в октане солюбилизовали 25–70 мкл 50 мМ трис-HCl-буфера (pH 7,5), 3–7 мкл 0,4 М раствора *n*-нитроанилида фенилуксусной кислоты в смеси ацетонитрил – диоксан (1:1) и 2–5 мкл раствора пенициллинацилазы с известной концентрацией активных центров.

Скорость реакции образования *n*-нитроанилина определяли спектрофотометрически при 410 нм и 25°С. В независимом эксперименте измеряли коэффициенты молярного поглощения *n*-нитроанилина в системе обращенных мицелл АОТ в октане при различных степенях гидратации. Использовали спектрофотометр Philips PU 8630 с термостатируемым кюветным отделением. В работе анализируются pH-оптимальные значения каталитической константы $k_{\text{кат}}$, которые определяли из зависимостей скорости ферментативного гидролиза *n*-нитроанилида фенилуксусной кислоты от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера – Берка.

Определение коэффициентов седиментации. Коэффициенты седиментации пустых и содержащих белок обращенных мицелл определяли при 20°С на аналитической центрифуге Beckman E, снабженной фотоэлектрическим сканирующим устройством с монохроматором и мультиплексором с использованием 12-мм двухсекторных ячеек и ротора An-G-Ti при скорости 20 000–30 000 об/мин. При определении коэффициентов седиментации в системах, не содержащих белок, мицеллярный раствор «окрашивали» 20 мкМ пикриновой кислотой. В этом случае сканирование проводили при 400 нм.

Разделение легкой и тяжелой субъединиц пенициллинацилазы. В 140 мл 0,1 М раствора АОТ в октане солюбилизовали 440 мкл 50 мкМ раствора пенициллинацилазы и 860 мкл 50 мМ трис-HCl-буфера, pH 7,5, $w_0=5$.

Фракцию мицелл, содержащих тяжелую субъединицу, осаждали при 100 000 g в течение 60 мин на центрифуге MSE Superspeed 65 (Великобритания). Отделяли супернатант, а осадок солюбилизовали в 20 мл 0,1 М раствора АОТ в октане, содержащего 190 мкл 50 мМ трис-HCl-буфера, pH 7,5, $w_0=5$. Для выделения легкой α -субъединицы аналогичным образом приготовленный мицеллярный раствор фермента центрифугировали двукратно при 125 000 g по 60 мин.

После центрифугирования анализировали зависимость ферментативной активности ($k_{\text{кат}}$) от степени гидратации для супернатанта, осадка, а также для раствора, полученного после их смешивания.

Электрофорез препаратов пенициллинацилазы. Контроль гомогенности препаратов фермента, определение молекулярной массы и оценку количественного соотношения субъединиц пенициллинацилазы в «осадке» после центрифугирования осуществляли при помощи вертикального электро-

фореза в 10% ПААГ в присутствии SDS и меркаптоэтанола на приборе фирмы LKB (Швеция) (100 В, 10 ч). В качестве красителя использовали кумасси R-250, а в качестве стандартов — набор белков LKB 1860—102 (диапазон мол. масс 17 000—78 000 Да). Состав электродного буфера, буфера образца, а также буферов концентрирующего и разделяющего гелей формировали согласно Лэммли [17].

Пенициллинацилазу извлекали из системы обращенных мицелл при помощи экстракции 1,5 М раствором NaCl, встряхивая в делительной воронке равные объемы мицеллярного и солевого растворов. Водную фазу затем концентрировали до 1 мл и диализовали. Препарат вносили в концентрирующий гель в виде раствора в буфере образца.

Ингибирование пенициллинацилазы фенилметансульфонилфторидом в обращенных мицеллах AOT в октане. В 0,7 мл 0,1 М раствора AOT в октане солюбилизовали 15—30 мкл 50 мМ трис-HCl-буфера (pH 7,5), 2 мкл 30 мкМ раствора пенициллинацилазы и 0—10 мкл 10 мкМ раствора PMSF в ацетонитриле. После 10-минутной инкубации вносили 4 мкл 0,4 М раствора *n*-нитроанилида фенилуксусной кислоты и измеряли скорость ферментативной реакции. Количество PMSF, необходимое для полного ингибирования имеющейся в системе пенициллинацилазы, определяли из зависимости «относительная активность — [PMSF]».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bock A., Wirth R., Schmid G., Schumacher G., Lang G., Buckel P. // FEMS Microbiol. Lett. 1983. V. 20. P. 135—139.
2. Bock A., Wirth R., Schmid G., Schumacher G., Lang G., Buckel P. // FEMS Microbiol. Lett. 1983. V. 20. P. 141—144.
3. Daumy G. O., Danley D., McColl A. S. // J. Bacteriol. 1985. V. 163. P. 925—933.
4. Daumy G. O., Danley D., McColl A. S. // J. Bacteriol. 1985. V. 163. P. 1279—1281.
5. Kurganov B. I., Loboda N. I. // J. Theor. Biol. 1979. V. 111. P. 707—723.
6. Муронец В. И., Наградова Н. К. Имобилизованные олигомерные ферменты. М.: Наука, 1984. 208 с.
7. Клячко Н. Л., Меркер Ш., Вакула С. В., Иванов М. В., Березин И. В., Мартинек К., Левашов А. В. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 298. № 6. С. 1479—1481.
8. Наметкин С. Н., Кабанов А. В., Евтушенко Г. Н., Чернов Н. Н., Березов Т. Т., Щеголев А. А., Рыжова В. В., Клячко Н. Л., Мартинек К., Левашов А. В. // Биоорганическая химия. 1989. Т. 15. № 1. С. 70—77.
9. Kabanov A. V., Nametkin S. N., Evtushenko G. N., Chernov N. N., Klyachko N. L., Levashov A. V., Martinek K. // Biochim. et biophys. acta. 1989. V. 996. P. 147—152.
10. Наметкин С. Н., Кабанов А. В., Клячко Н. Л., Левашов А. В. // Биоорганическая химия. 1991. Т. 17. № 5. С. 606—609.
11. Мартинек К., Левашов А. В., Клячко Н. Л., Хмельницкий Ю. Л., Березин И. В. // Биол. мембраны. 1985. Т. 2. № 7. С. 669—696.
12. Luisi P. L., Magid L. J. // CRC Crit. Rev. Biochem. 1986. V. 20. P. 409—474.
13. Klyachko N. L., Levashov A. V., Kabanov A. V., Khmelnitsky Yu. L., Martinek K. // Kinetics and Catalysis in Microheterogeneous Systems / Eds M. Gratzel, K. Kalyanasundaram. N. Y.: Marcel Dekker, 1991. P. 135—181.
14. Хмельницкий Ю. Л., Левашов А. В., Клячко Н. Л., Черняк В. Я., Мартинек К. // Биохимия. 1982. Т. 47. № 1. С. 86—99.
15. Левашов А. В. // Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология. Т. 4. М.: ВИНТИ, 1987. С. 112—158.
16. Швайдас В. К., Марголин А. Л., Шерстюк С. Ф., Клесов А. А. // Биоорганическая химия. 1977. Т. 3. С. 546—554.
17. Laemmli U. K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680—684.

Поступила в редакцию
4.11.1992

V. E. KABAKOV, S. MERKER * E. V. KOZLOVA **, A. V. PSHEZHETSKY **,
V. K. ŠVEDAS **, K. MARTINEK ***, N. L. KLYACHKO, A. V. LEVASHOV

REGULATION OF THE SUPRAMOLECULAR STRUCTURE AND CATALYTIC
ACTIVITY OF PENICILLIN ACYLASE FROM
Escherichia coli IN THE SYSTEM OF REVERSED MICELLES
OF AEROZOL OT IN OCTANE

Department of Chemical Enzymology, Moscow State University.

** FZB Biotechnik GmbH, Berlin, Germany;*

*** Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic Chemistry, Moscow State University;*

**** Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czechoslovak Academy
of Sciences, Prague 6, Czechoslovakia*

The properties of penicillin acylase from *E. coli* solubilized by hydrated reversed micelles of Aerosol OT (AOT) in octane were studied. The catalytic activity dependence on the hydration degree, a parameter which determines the size of the micelle inner cavity, represents a curve with three optima, each corresponding to the enzyme functioning either in a dimer form ($w_0=23$) or in the form of separate subunits — heavy, β , and light, α , at $w_0=20$ and 14, respectively. Reversible dissociation of the enzyme was confirmed by ultracentrifugation followed by electrophoresis. Preparative isolation of penicillin acylase subunits, their catalytic activity being retained, was shown to be possible.