

УДК 579.66/577.115

ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ЧЕТВЕРТИЧНОЙ СТРУКТУРЫ G17ACA-АЦИЛАЗЫ БАКТЕРИИ *Brevundimonas diminuta*, ПОЛУЧЕНИЕ БОЛЕЕ СТАБИЛЬНЫХ АНАЛОГОВ ФЕРМЕНТА

© 2013 г. С. А. Закирова*, Т. В. Михайлова**, М. А. Эльдаров*.*.*

*Биологический факультет, Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, 119899

**Факультет биоинженерии и биоинформатики,
Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, 119899

***Центр “Биоинженерия” РАН, 117312

e-mail: eldarov1@yandex.ru

Поступила в редакцию 11.01.2013 г.

Исследованы физико-химические и энзиматические характеристики гибридных аналогов G17ACA-ацилазы бактерии *Brevundimonas diminuta* (**BrdGLA**), содержащих N-концевую хитинсвязывающий домен бактериальной хитиназы (BrdGLA/NmChBD), либо C-концевую олигогистидиновую последовательность (**BrdGLA/H**). Повышенная термостабильность BrdGLA/NmChBD может указывать на стабилизирующее влияние хитинсвязывающего домена. Исследование профилей зависимости энзиматической активности рекомбинантных аналогов BrdGLA от pH не выявило значительных различий: каталитическая активность обоих вариантов мало менялась в интервале pH 6.0–9.0 и резко снижалась при более низких значениях pH. Оба аналога обладали и сходным характером чувствительности к действию денатурирующих агентов, подвергаясь полной инактивации в присутствии 2.0 М гуанидин-хлорида. Разработана система получения изолированных рекомбинантных α - и β -субъединиц BrdGLA. В опытах *in vitro* по реконструкции фермента показано, что присутствие α -субъединицы необходимо для формирования правильной пространственной структуры β -субъединицы и образования функционально-активного фермента.

DOI: 10.7868/S0555109913060184

Ацилазы глутарил-7-аминоцефалоспоровой кислоты (**G17ACA-ацилазы**, КФ 3.5.1.93) – промышленные ферменты, наряду с пенициллин ацилазами, способные превращать цефалоспорины в ценные промежуточные соединения, используемые для производства новых антибиотиков. G17ACA-ацилаза катализирует ферментативное превращение глутарил-7-аминоцефалоспоровой кислоты (**G17ACA**) в 7-аминоцефалоспоровую кислоту (**7-ACA**), при котором происходит расщепление амидной связи с образованием глутарата и 7-ACA [1].

7-ACA может быть получена либо путем химического деацетилирования цефалоспорина С (СРС), требующего использования токсичных соединений и специальных условий инкубации при сверхнизких температурах, или за счет энзиматического превращения. Два типа цефалоспорин-ацилаз, а именно G17ACA-ацилаза и цефалоспорин С-ацилаза способны гидролизовать G17ACA и СРС соответственно. Однако эффективность одностадийных процессов получения 7-ACA из СРС с применением цефалоспорин С ацилазы составляет не более 5%. Гораздо более эффективны двухстадийные процессы, при участии оксидазы D-аминокислот (**DAO**, КФ 1.4.3.3), степень конверсии СРС в 7-ACA составляет 80–90% [2–5].

Активные ферменты G17ACA-ацилазы являются гетеротетрамерами, состоящими из 2 α - и 2 β -субъединиц, которые формируются из одноцепочечного полипептидного предшественника в результате специфического процессинга белка-предшественника и характеризуются высокой активностью по отношению к G17ACA, при низкой активности по отношению к цефалоспору С [6].

Гены G17ACA-ацилаз выделены из различных штаммов *Pseudomonas*, разработаны системы экспрессии этих ферментов в клетках *E. coli* и *Bacillus subtilis*, методы получения очищенных препаратов G17ACA-ацилаз и их различных аналогов для структурно-функциональных исследований и создания биокатализаторов [7–12]. В то же время существующие методы получения рекомбинантных G17ACA-ацилаз нельзя признать достаточно эффективными, что связано со сложной структурой предшественника и недостаточной изученностью закономерности процессинга и сборки функционально-активного тетрамера фермента [13, 14].

Нестабильность тетрамера белка при действии мягких денатурирующих агентов, при умеренных температурах, частичная инактивация фермента под действием “сшивающих” агентов, осложня-

технологии “автоиндукции” на среде Overnight Express TB при 30°C как описано [19].

Экспрессия и очистка рекомбинантных GlA10H и ChBD α . Фракцию белка, полученную после двухэтапного осаждения сульфатом аммония (35% и 60% насыщения), наносили на колонку с хитиновыми гранулами (1 × 2 см), уравновешенную в буфере Б (50 мМ фосфат натрия, pH 7.5, 1.0 мМ ЭДТА, 0.3%-ный цетилтриметил аммоний бромид, 2%-ный глицерин, 2.0 М NaCl). Колонку промывали 10 объемами буфера Б и элюировали 5 объемами буфера А. Полученную фракцию концентрировали ультрафильтрацией с помощью центрифужных концентраторов Амикон Ultra-15, 15 мл, NMWL 50000 производства фирмы “Millipore” (США). Очистку ChBD α проводили в аналогичных условиях, минуя стадию фракционирования сульфатом аммония. Для концентрирования очищенного белка использовали центрифужные концентраторы Амикон Ultra-15, NMWL 10000 (“Millipore”, США).

Выделение β -субъединицы Gl7ACA-ацилазы. 100 мкг очищенного препарата рекомбинантной GlA10H с концентрацией 2 мкг/мкл разводили в 10 раз в буфере, содержащем 8.0 М мочевины, 100 мМ имидазол, pH 7.5, выдерживали 12 ч при комнатной температуре и наносили на центрифужную миниколонку с Ni²⁺-NTA сорбентом (“Vivascience”, Hannover, Германия), уравновешенную в том же буфере. Колонку промывали три раза буфером для нанесения и элюировали в буфере, содержащем 6.0 М мочевины, 500 мМ имидазол, pH 7.5.

Дифференциальная сканирующая калориметрия. Анализ методом дифференциальной сканирующей калориметрии проводили на дифференциальном адиабатическом сканирующем микрокалориметре ДАСМ-4 (СКБ НП, Пушкино, Россия) с капиллярными платиновыми ячейками объемом 0.47 мл. Измерения проводили при скорости нагрева 1.0 градус в минуту в диапазоне температур от 20 до 100°C. Для предотвращения дегазирования растворов при повышении температуры во всех экспериментах в ячейках калориметра поддерживалось избыточное давление в 2 атм. Базовую линию записывали, помещая в рабочую и контрольную ячейки используемый в опыте буфер. После охлаждения ячеек до 2.5°C из рабочей ячейки отбирали буфер и помещали в нее препарат белка в том же буфере. Для проверки обратимости тепловой денатурации исследуемых образцов каждый образец подвергали повторному прогреву непосредственно после первого прогрева и последующего охлаждения. Для обработки и анализа кривых теплопоглощения изученных белков использовали пакеты программного обеспечения “Origin 1.16” и “Origin 6.0” фирмы “MicroCal Inc.” (США).

Определение температур плавления и значений теплоемкости процесса проводили для ги-

бридных белков BrdGlA/H и BrdGlA/NmChBD, полученных ранее [7].

Ренатурация GlA10H и β -субъединицы Gl7ACA-ацилазы. 100 мкг очищенного препарата рекомбинантной GlA10H с концентрацией 2 мкг/мкл и удельной активностью 15 МЕ/мг разводили в 10 раз в буфере, содержащем 8.0 М мочевины, 50 мМ фосфат натрия, pH 7.5, и выдерживали 16 ч при комнатной температуре для денатурации фермента и диссоциации его субъединиц. Денатурированный препарат разводили в 15 раз в буфере для ренатурации (0.15 М NaCl, 50 мМ фосфата натрия, pH 7.5), выдерживали 1 сут при комнатной температуре и определяли удельную активность фермента по стандартной методике [20].

Для ренатурации β -субъединицы препарат, полученный путем очистки с помощью металло-хелат-аффинной хроматографии, разводили в 15 раз в буфере для ренатурации и выдерживали 1 сут при комнатной температуре. При совместной ренатурации с α -субъединицей, к разведенному в буфере для ренатурации препарату β -субъединицы, добавляли 5-кратный молярный избыток очищенного препарата α -субъединицы.

Определение зависимости активности Gl7ACA-ацилазы от pH и действия денатурирующих веществ. 20 мкг образцов очищенных препаратов белка инкубировали в ацетатном, фосфатном или пиррофосфатном буфере в интервале pH от 4.5 до 9.0 в течение нескольких минут при 37°C и использовали затем в реакции с субстратом – Gl7ACA.

20 мкг образцов очищенных препаратов белка инкубировали в натрий-фосфатном буфере, pH 7.5, содержащем различные концентрации гуанидин-хлорида (от 0.5 до 2.0 М) в течение 1 ч при 25°C и затем использовали в реакции с субстратом – Gl7ACA.

Определение активности Gl7ACA-ацилазы. Для определения глутарил-ацилазной активности использовали колориметрический метод, аналогичный методу, применяемому для определения 6-аминопенициллиновой кислоты [21] с использованием в качестве субстрата глутарил-7-ACA. За 1 ед. активности фермента принимали его количество, необходимое для превращения 1 мкмоль субстрата в течение 1 мин инкубации в оптимальных условиях.

Электрофорез белков. Белковые экстракты рекомбинантных штаммов и фракции белков, полученные на различных стадиях очистки рекомбинантных аналогов BrdGl7ACA, разделяли методом электрофореза в денатурирующем ДДС-ПААГ по методу Лэммли [21]. Окраску гелей осуществляли с помощью красителя PageBlue (“MBI Fermentas”, Литва). Содержание общего белка определяли по методу Брэдфорд [22].

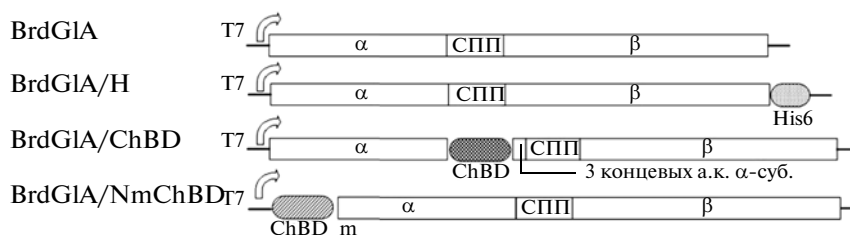


Рис. 1. Схема векторов экспрессии рекомбинантных аналогов BrdG1A. T7-T7 – промотор, СП – сигнальная последовательность, α – кодирующая последовательность α-субъединицы, β – кодирующая последовательность β-субъединицы, СПП – спейсерный пептид.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Термостабильность рекомбинантных аналогов BrdG1A. Исследование термостабильности полученных ранее очищенных рекомбинантных аналогов G17ACA-ацилазы, модифицированных присоединением С-концевой олигогистидиновой последовательности и N-концевым хитинсвязывающим доменом, BrdG1A/H и BrdG1A/NmChBD соответственно (рис. 1) [7, 18], проводили методом дифференциальной сканирующей калориметрии.

Для обоих белков наблюдали появление трех перекрывающихся пиков, соответствующих, вероятнее всего, отдельным калориметрическим доменам. Области до и после пика соответствовали температурной зависимости теплоемкости нативного и денатурированного состояния фермен-

та соответственно. Максимум температуры плавления BrdG1A/H составил 48.9°C (рис. 2а), в то время как для BrdG1A/NmChBD мы наблюдали значительное увеличение термостабильности. Тепловой переход T_m смещался в сторону более высокой температуры на 5.4°C и составил 54.3°C (рис. 2б). Денатурация в обоих случаях была необратимой.

Таким образом, повышение термостабильности рекомбинантного гибридного фермента обусловлено, скорее всего, стабилизирующим влиянием N-концевого хитинсвязывающего домена в молекуле G17ACA-ацилазы.

В результате определения профилей зависимости энзиматической активности полученных ранее рекомбинантных аналогов BrdG1A (рис. 1) [7, 18] от pH было показано, что они не имели значительных отличий для всех вариантов ферментов. В интервалах от pH 6.09.0 активность менялась незначительно, но резко снижалась при более низких значениях pH (рис. 3а), в соответствии с полученными ранее литературными данными для нативной G17ACA-ацилазы [23]. Такая же картина наблюдалась и при определении чувствительности фермента к действию денатурирующих агентов. Было показано, что присутствие 0.5 М гуанидин-хлорида приводило к снижению активности на 40%, а добавление гуанидин-хлорида до концентрации 2.0 М приводило к полной инактивации фермента (рис. 3б).

Таким образом, аналог G17ACA-ацилазы с присоединенным N-концевым ChBD [7] является весьма перспективным для дальнейшего структурно-функционального исследования этого важного фермента.

Обнаруженная нами и другими авторами нестабильность тетрамера фермента под действием низких значений pH и денатурирующих агентов обосновывает целесообразность получения методами белковой инженерии более устойчивых аналогов G17ACA-ацилазы за счет стабилизации димер-димерных взаимодействий. Для разработки рациональных подходов к дизайну и получению таких аналогов мы изучили особенности процессов сборки функционально-активного фермента

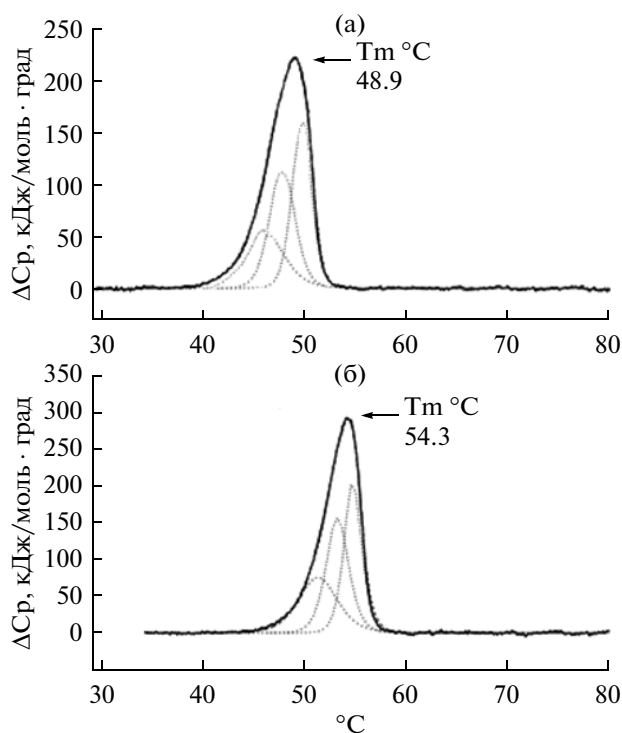


Рис. 2. Тепловая денатурация G17ACA-ацилазы. а – BrdG1A/H; б – BrdG1A/NmChBD.

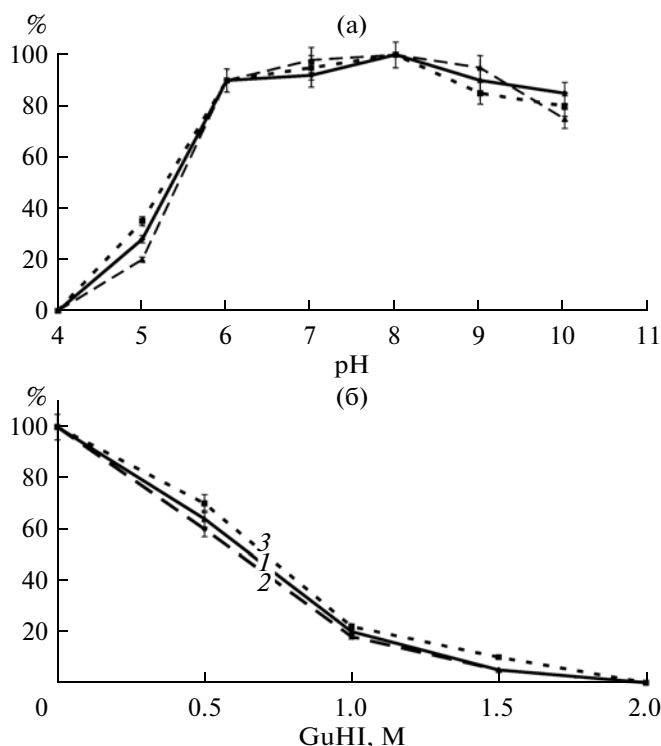


Рис. 3. Исследование чувствительности рекомбинантных аналогов BrdGIA/H (1), BrdGIA/ChBD (2), BrdGIA/NmChBD (3) к pH (а) и действию гуанидинхлорида (б). Ось Y – удельная активность фермента, %.

из его отдельных субъединиц. Для решения этой задачи были разработаны методы получения изолированных рекомбинантных субъединиц BrdGIA и ренатурации фермента.

Экспрессия субъединиц BrdGIA. При дизайне конструкций для экспрессии α - и β -субъединиц BrdGIA учитывали данные предыдущих исследований по экспрессии полноразмерной G17ACA-ацилазы, особенности пространственной структуры нативного фермента и процессинга предшественника G17ACA-ацилазы [13, 24].

Для получения рекомбинантной β -субъединицы была сконструирована плазмида pMTV3, направляющая экспрессию гибридного белка G1A10H, который является аналогом белка BrdGIA/NmChBD, модифицированного присоединением декагистициновой последовательности к С-концу β -субъединицы. Плазмида pMTV1 – вектор экспрессии

α -субъединицы, модифицированной присоединением мутантного N-концевого связывающего хитинсвязывающего домена (ChBD α) (рис. 4).

Выделение β -субъединицы осуществляли в денатурирующих условиях с помощью металло-хелат-аффинной хроматографии после диссоциации нативного фермента G1A10H в буфере с 8.0 М мочевиной. В результате был получен препарат денатурированной β -субъединицы, свободный от примесей α -субъединицы, который был использован в опытах по ренатурации и реконструкции нативного фермента (рис. 5). Для очистки рекомбинантного белка ChBD α также использовали аффинную хроматографию на хитиновом сорбенте.

Реконструкция BrdGIA в системе *in vitro*. Для исследования возможности реконструкции G17ACA-ацилазы из очищенных препаратов α - и β -субъединиц проводили эксперименты по ренатурации выделенной β -субъединицы. Предварительно подбирали условия ренатурации денатурированного препарата G1A10H. После инкубации в буфере для ренатурации препарата, обработанного 8.0 М мочевиной, активность фермента восстанавливалась на 60% (рис. 6).

После ренатурации препарата β -субъединиц в аналогичных условиях и добавления препарата α -субъединицы активности не наблюдалось. Если перед ренатурацией к препарату β -субъединицы добавляли препарат α -субъединицы, активность восстанавливалась на 10% в пересчете на содержание β -субъединицы в исходном препарате G1A10H (рис. 6).

Полученные данные позволяют сделать вывод, что присутствие α -субъединицы необходимо для формирования правильной пространственной структуры β -субъединицы и образования функционально-активного фермента. Эти данные соответствуют известным наблюдениям, что раздельная экспрессия субъединиц G17ACA-ацилазы приводит к формированию функционально-активного фермента только при совместной экспрессии субъединиц в одной клетке [14].

Таким образом, совокупность полученных данных позволяет заключить, что формирование нативной пространственной конформации тетрамера G17ACA-ацилазы, скорее всего, происходит в про-

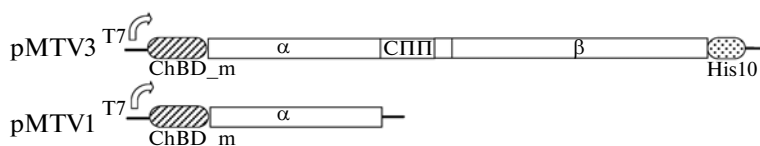


Рис. 4. Схема векторов экспрессии α - и β -субъединиц BrdGIA.

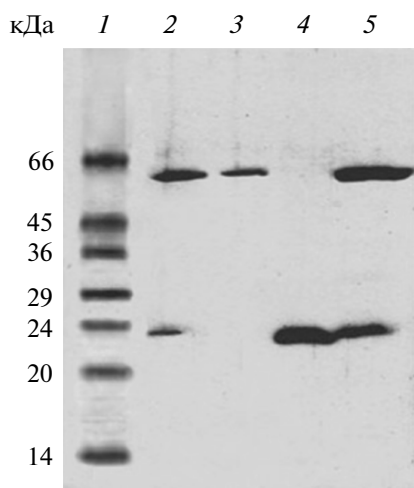


Рис. 5. ДДС-ПААГ-электрофорез очищенных препаратов α - и β -субъединиц G17ACA-ацилазы и гибридного фермента G1A10H.

1 – маркеры молекулярной массы; 2 – очищенный и денатурированный в 8 М мочеvine препарат G1A10H, нанесенный на колонку с Ni-NTA для выделения β -субъединицы; 3 – выделенный препарат β -субъединиц G17ACA-ацилазы; 4 – выделенный на хитиновом сорбенте препарат α -субъединиц G17ACA-ацилазы; 5 – полученный препарат G1A10H.

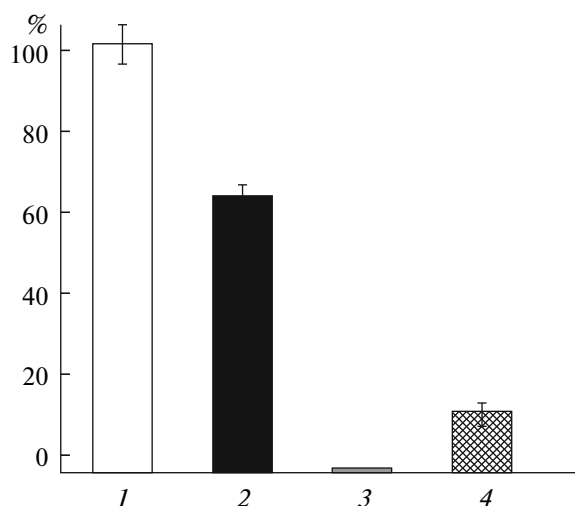


Рис. 6. Зависимость активности ренатурированной рекомбинантной G1A10H и β -субъединицы от условий ренатурации. 1 – G1A10H – нативный фермент, 2 – денатурированный в 8.0 М мочеvine препарат G1A10H, 3 – ренатурированный препарат β -субъединицы после добавления α -субъединицы, 4 – совместная ренатурация субъединиц. Ось Y – удельная активность фермента, %.

цессе синтеза и процессинга фермента и взаимодействия вновь синтезируемых субъединиц.

Авторы выражают благодарность профессору В.И. Муронцу (отдел биохимии животной клетки Института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ) за консультации при проведении дифференциальной сканирующей калориметрии, А.А. Шульге за плодотворную дискуссию.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 12-08-01163а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Barber M.S., Giesecke U., Reichert A., Minas W. // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2004. V. 88. P. 179–215.
2. Kumar K.K., Sudhakaran V., Deshpande B.S., Ambedkar S.S., Shewale J.G. // Hindustan Antibiot. Bull. 1993. V. 35. P. 111–125.
3. Aramori I., Fukagawa M., Tsumura M., Iwami M., Ono H., Ishtani Y., Hiroshi K., Kojo H., Kohsaka M., Udea Y., Imenaka H. // J. Ferment. Bioeng. 1992. V. 73. P. 185–192.
4. Aramori I., Fukagawa M., Tsumura M., Ono H., Ishtani Y., Kojo H., Kohsaka M., Udea Y., Imenaka H. // Eur. J. Biochem. 1995. V. 230. P. 773–778.
5. Deshpande B.S., Ambedkar S.S., Sudhakaran V.K., Shewale J.G. // World J. Microbiol. Biotechnol. 1994. V. 10. P. 129–138.
6. Ishii Y., Saito Y., Fujimura T., Isogai T., Kojo H., Yamashita M., Niwa M., Kohsaka M. // J. Ferment. Bioeng. 1994. V. 77. P. 591–597.
7. Khatuntseva S.A., Eldarov M.A., Redo V.A., Skryabin K.G. // J. Biotechnol. 2008. V. 133. P. 123–126.
8. Yong Li, Weihong Jiang, Yunliu Yang, Guoping Zhao, Enduo Wang // Protein Expr. Purif. 1998. V. 12. P. 233–238.
9. Luo H., Yu H., Li Q., Shen Z. // Tsinghua Sci. Technol. 2005. V. 10. P. 529–534.
10. Ledent P., Duez C., Vanhove M., Lejeune A., Fonze E., Charlier P. // FEBS Letters. 1997. V. 413. P. 194–196.
11. Huabao Zheng, Jun Chena, Liuli Sua, Yuhua Zhaob, Yunliu Yang, Hong Yu Zenge, Gang Xue, Sheng Yang, Weihong Jiang // Enzyme Microb. Technol. 2007. V. 41. P. 474–479.
12. Wang E.D., Zheng Y.G., Li Y., Jiang W.H., & Yang Y.L. // Acta Biochim. Biophys. Sin. 2002. V. 34. P. 526–531.
13. Li Y., Jiang W., Yang Y., Zhao G., Wang E. // Protein Expr. Purif. 2002. V. 12. P. 233–238.
14. Lee Y.S., Kim H.W., Park S.S. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 39200–39206.
15. Friehs K., Reardon K.F. // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 1993. V. 48. P. 53–77.
16. Vethanayagam J., Flower A. // Microbial Cell Factories. 2005. V. 4. P. 3.
17. Kim Y., Yoon K., Khang Y., Turley S., Hol W.G. // Structure. Fold. Des. 2000. V. 8. P. 1059–1068.
18. Хатунцева С.А., Эльдаров М.А., Лопатин С.А., Зейналов О.А., Скрябин К.Г. // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 4. С. 462–470.
19. Studier F. // Protein Expr. Purif. 2005. V. 41. P. 207–234.

20. Balasingham K., Warburton D., Dunnill P., Lilly M.D. // Biochim. Biophys. Acta. 1972. V. 276. P. 250–256.
21. Laemli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
22. Bradford // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.
23. Battistel E., Bianchi D., Bortolo R., Bonoldi L. // Appl. Biochem. Biotechnol. 1998. V. 69. P. 53–67.
24. Ishiye M., Niwa M. // Biochim. Biophys. Acta. 2002. V. 1132. P. 233–239.

Peculiarities of the *Brevundimonas diminuta* G17ACA-Acylase Quaternary Structure Formation and Obtaining Stable Enzyme Analogues

S. A. Zakirova^a, T. V. Mikhailova^b, and M. A. Eldarov^{a, c}

^a Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow

^b Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Moscow State University, Moscow

^c Bioengineering Center, Russian Academy of Sciences, Moscow

e-mail: eldarov1@yandex.ru

Received January 11, 2013

Abstract—The physicochemical and enzymatic properties of hybrid analogues of the *Brevundimonas diminuta* G17ACA-acylase (BrdG1A), containing the N-terminal chitin-binding domain of the bacterial chitinase (BrdG1A/NmChBD) or the C-terminal oligohistidine sequence (BrdG1A/H), were studied. An enhanced thermostability level of BrdG1A/NmChBD could suggest the stabilizing effect of the chitin-binding domain. An analysis of pH profiles of the enzymatic activity of recombinant BrdG1A analogues did not reveal significant differences: the catalytic activity of both variants changed slightly in the interval of pH values from 6.0 to 9.0 but drastically decreased at lower pH values. Both analogues demonstrated similar sensitivity towards denaturing agents: addition of 2.0 M of guanidine chloride resulted in the complete inactivation of both enzymes. A scheme was developed for obtaining isolated recombinant α - and β -subunits of BrdG1A. In vitro enzyme reconstructions indicated that the α -subunit was necessary for the formation of a correct spatial structure of the β -subunit and for the formation of a functionally active enzyme.