

УДК 577.15.1

ЭКСПРЕССИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА МУТАНТНЫХ ФОРМ ПЕНИЦИЛЛИНАЦИЛАЗЫ ИЗ *Alcaligenes faecalis*

А.В. Степашкина^{1,2}, С.С. Савин^{2,3}, О.Е. Скиргелло^{1,2}, В.И. Тишков^{1,2,3*}

(¹кафедра химической энзимологии химического факультета МГУ, ²ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», ³Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН; e-mail: vitishkov@gmail.com)

Секвенирование шести плазмид с геном пенициллинацилазы из *Alcaligenes faecalis* VKM B1518 (AfПА) показало наличие в гене случайных мутаций, возникших при проведении полимеразной цепной реакции. Проведена экспрессия в клетках *E. coli* шести мутантных AfПА и фермента дикого типа. Анализ активности мутантных AfПА в клетках *E. coli* свидетельствует о влиянии ряда аминокислотных замен на уровень экспрессии гена AfПА, а также на скорость роста клеток. Очищены четыре мутантных AfПА, изучены их каталитические свойства и температурная стабильность. Показано, что исследованные аминокислотные замены не влияют на величину каталитической эффективности. Замены β Q133R и β K184E (мутант AfПА M2) на термостабильность фермента в пределах ошибки эксперимента не влияли, а в случае мутантов AfПА M4 (β Y90H), M5 (α D132G, β R97C) и M6 (α V5E, α N183S и β E439G) константа скорости инактивации по сравнению с ферментом дикого типа увеличилась в 2,4, 2,75 и 8,3 раза соответственно.

Ключевые слова: пенициллинацилаза, *Alcaligenes faecalis*, неупорядоченный мутагенез, экспрессия, каталитические свойства, термостабильность.

Пенициллинацилаза G (ПА, КФ 3.5.1.11) катализирует реакцию гидролиза пенициллина G до фенилуксусной и 6-аминопенициллановой кислоты. ПА принадлежит к суперсемейству гидролаз с N-концевым нуклеофилом и содержит каталитический остаток серина на N-конце β -субъединицы. ПА (в основном фермент из *E. coli*) используется в промышленности для получения полусинтетических β -лактамных антибиотиков. Ген ПА был клонирован из бактерий *Achromobacter xylosoxidans* [1], *Alcaligenes faecalis* [2, 3], *Arthrobacter viscosus* [4], *Bacillus megaterium* [5], *Bacillus badius* [6], *Escherichia coli* [7], *Kluyvera criocrescens* [8], *Providencia rettgeri* [9]. Среди перечисленных пенициллинацилаз G большой интерес как с практической, так и с фундаментальной точки зрения представляет фермент из бактерии *Alcaligenes faecalis*. По сравнению с ПА из *E. coli* он обладает более высокой термостабильностью [2] и широким рН-профилем активности [3, 10, 11], а также характеризуется наивысшей каталитической эффективностью по отношению к бензилпенициллину среди всех изученных ПА [10]. В дополнение к двум известным ПА из разных штаммов *A. faecalis* в нашей лаборатории был клонирован ген пенициллинацилазы G из бактерии *A. faecalis* VKM B1518 (AfПА) и создана система экспрессии этого фермента в клетках *E. coli* [11]. AfПА была экспрессирована в клетках *E. coli* в

активной форме, выделена в гомогенном виде и охарактеризована. Было показано, что данный фермент по аминокислотной последовательности отличается от ранее клонированных ПА из других штаммов *A. faecalis* [11]. В результате дальнейшей работы было выделено шесть плазмид, секвенирование которых показало наличие в гене ПА из *A. faecalis* VKM B1518 случайных мутаций, возникших при проведении полимеразной цепной реакции. Мы решили исследовать, как эти мутации влияют на экспрессию и свойства фермента. В данной работе проведена экспрессия шести мутантных AfПА и фермента дикого типа. Четыре мутанта выделены в высокоочищенном виде, изучены их каталитические свойства и термостабильность.

Экспериментальная часть

Выделение плазмидной ДНК

Плазмиды выделяли из 10 мл ночной культуры клеток *E. coli* DH5 α с помощью коммерческого набора реагентов GeneJetTM Plasmid Miniprep Kit («Fermentas», Литва).

Культивирование

4 мл среды 2YT (триптон 16 г/л, дрожжевой экстракт 10 г/л, NaCl 5 г/л, рН 7,5), содержащей хлорамфеникол в концентрации 34 мкг/мл, инокулировали

культурой клеток из музея (-75°C) *E. coli* TG1, несущих плазмиду с геном AfPA, и инкубировали при 37°C и 180 об/мин в шейкере «Innova 44» (New Brunswick Scientific, США) в течение 13 ч. Затем отбирали 200 мкл культуральной среды и переносили в колбы объемом 100 мл, содержащие 20 мл среды 2YT, хлорамфеникол 34 мкг/мл (37°C , 180 об/мин). При достижении поглощения $A_{600} = 0,8-1,0$ проводили пересев в колбы объемом 1 л с 100 мл среды YE (дрожжевой экстракт 30 г/л, NaCl 5 г/л, хлорамфеникол 34 мкг/мл, pH 7,5). В среду добавляли дополнительно CaCl_2 (до конечной концентрации 2 мМ) и глицерин (до 5 г/л). Концентрация антибиотика (хлорамфеникола) в среде для культивирования составляла 34 мкг/мл. При достижении поглощения $A_{600} = 0,2-0,5$ добавляли индуктор (изопропил- β -D-тиогактопиранозид, ИПТГ) до конечной концентрации 0,1 мМ и продолжали культивирование в течение ~ 65 ч при температуре 15°C и скорости перемешивания 100 об/мин в шейкере «Infors» («Multitron», Швейцария). Клетки осаждали на центрифуге «Eppendorf 5804R» (Германия) при 6000 об/мин и 4°C в течение 5 мин.

Выделение и очистка фермента

Клетки разрушали методом осмотического шока. Осажденные клетки из 100 мл культуры ресуспендировали в 10 мл буфера А (20% сахара, 100 мМ Tris-HCl, 10 мМ ЭДТА; 4°C , pH 8,0) и центрифугировали 10 мин при 5000 об/мин и 4°C . Супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 10 мл буфера В (1 мМ ЭДТА; 4°C , pH 8,0). Затем смесь центрифугировали 15 мин при 7000 об/мин и 4°C в центрифуге «Eppendorf 5804R» (Германия). Периплазматический экстракт обессоливали гель-фильтрацией на колонке с носителем Sephadex G25.

Измерение активности ПА

Активность фермента определяли на спектрофотометре «UV-1800» («Shimadzu», Япония) на длине волны 400 нм по поглощению окрашенного продукта – *n*-нитро-*m*-аминобензойной кислоты (НАВА), образующейся при гидролизе *n*-нитро-*m*-карбоксихлорида фенилуксусной кислоты (NIPAB). За единицу активности принимали такое количество фермента, которое катализировало образование 1 мкмоль НАВА за 1 мин при 30°C и pH 8,0 (0,01 М KH_2PO_4 , 0,1 М KCl). Стандартная концентрация NIPAB в реакционной смеси составляла $2,4 \cdot 10^{-4}$ М.

Кинетические параметры

Для определения значений $V_{\text{макс}}$ и K_m измеряли начальную скорость реакции гидролиза субстра-

та NIPAB при концентрации субстрата в диапазоне 5–50 мкМ. Все измерения проводили в двух повторах. Полученные данные из десяти точек аппроксимировали нелинейной регрессией с помощью программы OriginPro 7,0.

Титрование активных центров

Титрование активных центров фермента AfPA не-обратимым ингибитором фенилметансульфонилфторидом (PMSF) проводили при pH 6,0 в калий-фосфатном буферном растворе (0,01 М KH_2PO_4 , 0,1 М KCl; pH 6,0). Смесь фермента с разным количеством ингибитора инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре, после чего измеряли остаточную активность. Все измерения проводили в двух повторах. Полученные данные были аппроксимированы по десяти экспериментальным точкам методом линейной регрессии с помощью программы OriginPro 7,0.

Температурная стабильность

Кинетику термоинактивации измеряли в калий-фосфатном буферном растворе (0,01 М KH_2PO_4 , 0,1 М KCl; pH 8,0) при температуре 54°C . Серию из десяти тонкостенных пластиковых пробирок, содержащих раствор фермента объемом 50 мкл, инкубировали в водном термостате и через определенные промежутки времени вынимали пробирку и охлаждали во льду в течение 5 мин. Остаточную активность измеряли, как описано выше. Все измерения проводили в двух повторах.

Результаты и их обсуждение

Известно, что при проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР) термостабильная ДНК-полимераза может делать ошибки, в результате чего в амплифицируемом фрагменте появляются случайные нуклеотидные замены. Этот эффект был использован при разработке метода неупорядоченного мутагенеза, который получил название «направленная эволюция» (directed evolution), когда ПЦР проводится в неоптимальных условиях. Однако и в случае рутинных ПЦР могут возникать случайные мутации, что мы и наблюдали при проведении ПЦР гена пенициллинацилазы из *A. faecalis* VKM B1518 (AfPA). Было обнаружено шесть клонов, содержащих мутации, которые приводят к замене аминокислот. Ген ПА кодирует неактивный белок-предшественник, в котором на N-конце расположен сигнальный пептид, обеспечивающий транспорт этого пробелка в периплазму, а также две субъединицы, которые соединены спейсером. В табл. 1 представлен список мутантных AfPA с указанием типа и положения аминокислотных замен в

Т а б л и ц а 1

Аминокислотные замены в последовательности пенициллинацилазы из *A. faecalis* VKM В-1518, возникшие в результате случайных мутаций в гене фермента

Мутантная форма AfПА	Аминокислотные замены	Локализация и характер мутации
AfПА М1	sV2A	аминокислотная замена в спейсере
	βQ12stop	стоп-кодон в начале β-субъединицы
AfПА М2	βQ133R	петля в β-листе, на поверхности, в основании конуса активного центра, замена полярной аминокислоты (Gln) на положительно заряженный остаток (Arg)
	βK184E	β-лист, внутри глобулы, замена положительно заряженного остатка (Lys) на отрицательно заряженный (Glu)
AfПА М3	αM43L	α-спираль, внутри глобулы, замена полярной аминокислоты (Met) на неполярную (Leu)
	βY137H	β-лист, внутри глобулы, у входа в конус активного центра, замена полярной аминокислоты (Tyr) на положительно заряженный остаток (His)
AfПА М4	βY90H	β-лист, внутри глобулы, замена неполярной аминокислоты (Tyr) на положительно заряженный остаток (His)
AfПА М5	αD132G	α-спираль, внутри глобулы, замена отрицательно заряженного остатка (Asp) на Gly
	βR97C	β-лист, внутри глобулы, замена положительно заряженной аминокислоты (Arg) на полярный остаток (Cys)
AfПА М6	αV5E	β-лист, поверхность глобулы, замена неполярного остатка (Val) на отрицательно заряженный остаток (Glu)
	αN183S	поверхность глобулы, замена полярного остатка (Asn) на Ser
	βE439G	β-лист, поверхность глобулы, замена отрицательно заряженного остатка (Glu) на Gly

белке-предшественнике. У всех шести мутантов в сигнальном пептиде наблюдалась замена signGly10Val. В мутанте AfПА М1 имеется одна замена в спейсере sVal2Ala. Во всех остальных случаях замены находятся в α- и β-субъединицах. На рис. 1 представлено расположение этих замен в структуре фермента. Как видно из этого рисунка, аминокислотные замены локализованы как внутри белковой глобулы, так и на ее поверхности. Кроме того, в случае мутанта AfПА М1 в гене фермента имеется нуклеотидная замена С829Т, которая приводит к замене остатка βGln12 на стоп-кодон (cag→tag). Такая замена в литературе известна как амбер-мутация.

Результаты культивирования рекомбинантных штаммов *E. coli* (продуцентов мутантных AfПА и фермента дикого типа) представлены в табл. 2. Как видно

из этой таблицы, во всех случаях очень близки значения выхода биомассы и наблюдается синтез активных ферментов, однако уровни активности сильно отличаются. На рис. 2 представлены результаты аналитического электрофореза полученных препаратов. Из этого рисунка видно, что во всех препаратах имеются две полосы, соответствующие α- и β-субъединице фермента (23,8 и 62,7 кДа соответственно). Сравнение данных табл. 2 и рис. 2 показывает, что наблюдается четкая корреляция между интенсивностью окраски полос субъединиц в электрофорезе и величиной активности – самые высокие уровни экспрессии и активности наблюдаются для фермента дикого типа (wt-AfПА) и мутантов AfПА М2, М5 и М6. Особый интерес вызывают результаты культивирования мутанта AfПА М1, в гене которого имеется замена

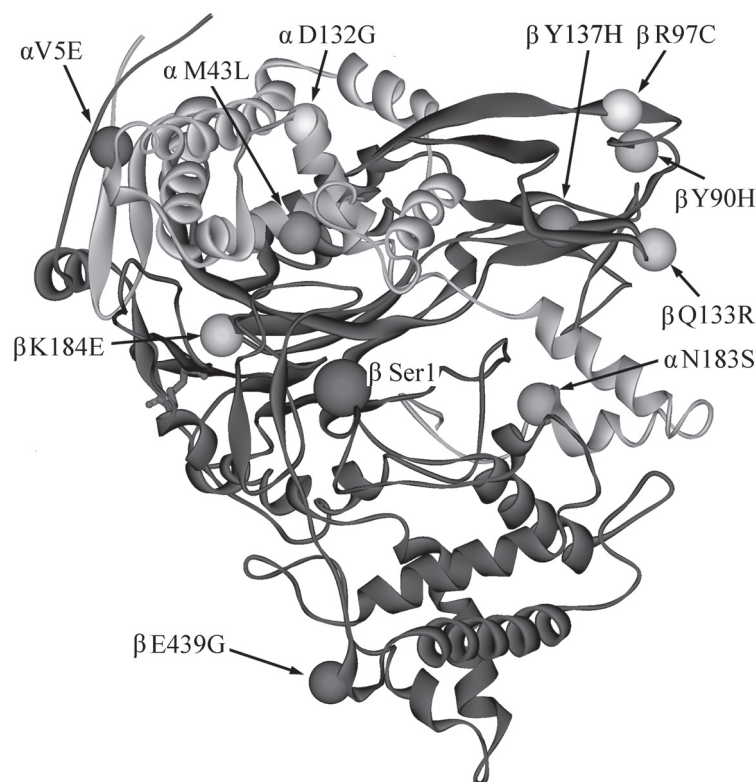


Рис. 1. Пространственное расположение аминокислотных замен в трехмерной структуре AfPA. Каталитический остаток β Ser1 расположен в центре и указан шариком большего размера

β Gln12Stop. Поэтому в случае этого мутанта следует ожидать синтез пептида, состоящего главным образом из α -субъединицы и спейсера, и отсутствие активности в полученной биомассе. В то же время данные аналитического электрофореза свидетельствуют о том, что α - и β -субъединицы синтезируются в равных молярных количествах. По-видимому, такой результат связан с тем, что стоп-кодон tag в клетках *E.*

coli не является самым эффективным. В литературе имеется много примеров, когда в присутствии соответствующих супрессоров такой кодон не приводит к остановке синтеза рекомбинантных белков в клетках *E. coli*. Причины низкого уровня биосинтеза в случае мутанта AfPA M3 неизвестны.

Поскольку выход активного фермента в случае мутантов AfPA M1 и M3 был более, чем в 10 раз ниже по сравнению с ферментом дикого типа, для дальнейшей очистки и изучения свойств были использованы только 4 мутанта AfPA: M2, M4, M5 и M6. Поскольку в случае AfPA для исследования термостабильности и каталитических свойств не требуется использования гомогенных препаратов, из процедуры очистки исключили стадию гидрофобной хроматографии на butyl-Toyopearl. Тем не менее чистота полученных препаратов составляла не менее 86%.

Кинетические параметры $V_{\text{макс}}$ и K_m для мутантных AfPA и фермента дикого типа определены из зависимости начальной скорости реакции гидролиза NIPAB от концентрации субстрата. Для расчета величины каталитической константы определяли концентрацию активных центров фермента титрованием необратимым ингибитором фенилметансульфонилфторидом (PMSF). На рис. 3 в качестве

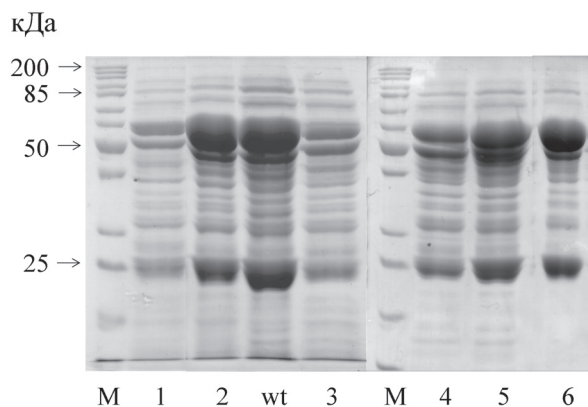


Рис. 2. Аналитический электрофорез в присутствии ДДС-Na образцов wt-AfPA и мутантных AfPA по окончании культивирования. М – маркеры молекулярной массы, дорожки 1–6 соответствуют мутантам M1–M6

Т а б л и ц а 2

Экспрессия AfPA дикого типа и ее мутантов в клетках *E. coli* TG1

Клон	Выход биомассы, г/л	Активность в периплазматическом экстракте, Ед/л среды	Удельная активность, Ед/г биомассы	Активность в культуральной жидкости, Ед/л среды
wt-AfPA	25,6	11540	451	349
AfPA M1	27,9	950	34,0	288
AfPA M2	29,7	10060	339	259
AfPA M3	26,5	990	37,4	144
AfPA M4	28,7	1680	58,5	104
AfPA M5	30,8	7580	246	213
AfPA M6	29,2	9485	323	247

Т а б л и ц а 3

Значения каталитических параметров и констант скорости инактивации AfPA

Фермент	Каталитические параметры			Константа скорости термоинактивации $k_{ин}, 10^4 \text{ c}^{-1}$
	$k_{кат}, \text{c}^{-1}$	$K_m, \text{мкМ}$	$k_{кат} / K_m, \text{мкМ}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$	
wt-AfPA	138±5	5,2±0,4	27±3	3,97±0,08
AfPA M2	104±4	3,6±0,3	29±3	4,21±0,07
AfPA M4	152±5	5,5±0,2	28±2	9,59±0,16
AfPA M5	154±4	5,7±0,3	27±2	11,0±1,4
AfPA M6	159±7	6,2±0,5	26±3	33,1±6,2

примера приведены результаты титрования активных центров для мутанта AfPA M5. Как видно из рис. 3, вплоть до величины остаточной активности менее 10% наблюдается линейная зависимость от количества добавленного PMSF. Полученные значения $k_{кат}$ и K_m приведены в табл. 3, откуда видно, что в случае мутанта AfPA M2 введение замен приводит к одновременному уменьшению и $k_{кат}$ и K_m , а в случае трех остальных мутантов AfPA (M4, M5 и M6) эти параметры одновременно увеличиваются. Следует отметить два момента. Во-первых, все замены в исследованных мутантах не являются важными (и тем более критическими). В случае мутанта AfPA M2 уменьшение кинетических параметров составляет 25%, а в случае увеличения – не более 10–15%. Во-вторых, величина каталитической эффективности полученных мутантов и фермента дикого типа в пределах ошибки эксперимента остается одной и той же. Анализ положения аминокислотных замен в глобуле AfPA (рис. 1) показывает, что они расположены достаточно далеко от активного центра. Слабое влияние

на каталитические свойства свидетельствует, что вводимые замены не приводят к сильному изменению структуры фермента.

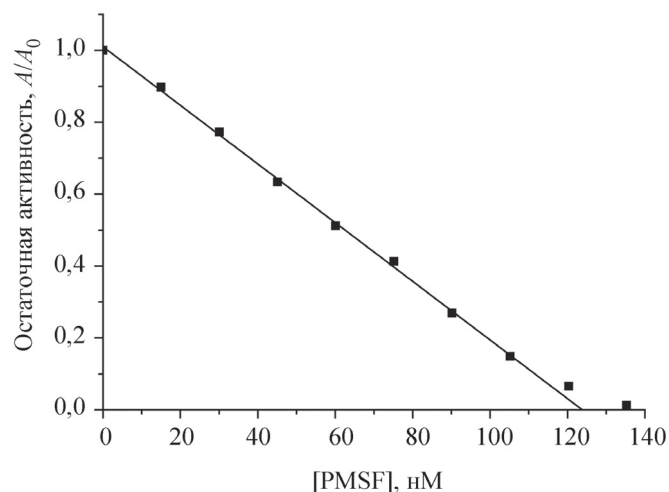


Рис. 3. Титрование активных центров AfPA M5 необратимым ингибитором PMSF

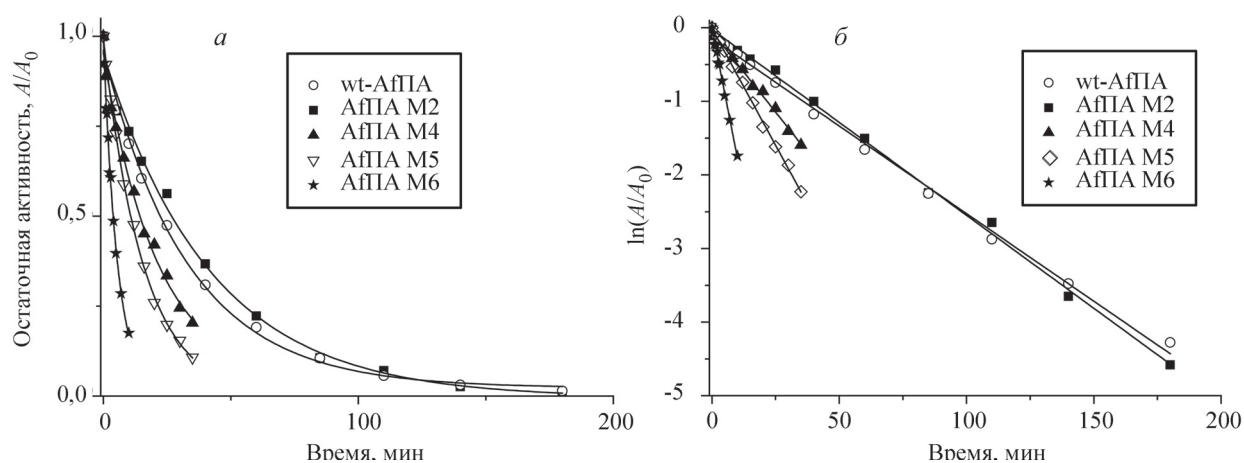


Рис. 4. Зависимости остаточной активности мутантных AfПА и фермента дикого типа (wt-AfПА) от времени в обычных (а) и полулогарифмических (б) координатах (0,01 М KH_2PO_4 , 0,1 М KCl ; рН 8,0, 54°C)

Для мутантных AfПА (M2, M4, M5, M6) и фермента дикого типа была изучена кинетика термоинактивации при температуре 54°C (рис. 4, а). В полулогарифмических координатах зависимости остаточной активности от времени представляют собой прямые (рис. 4, б). Это свидетельствует о том, что кривые термоинактивации можно аппроксимировать экспоненциальной функцией, а сам процесс инактивации протекает в соответствии с кинетикой реакции первого порядка. Для характеристики термостабильности фермента можно использовать величину наблюдаемой константы скорости инактивации первого порядка. Величины наблюдаемых констант скорости инактивации $k_{\text{ин}}$ представлены в табл. 3.

Из табл. 3 и рис. 4 видно, что в случае мутанта AfПА M2 введение замен βQ133R и βK184E не влияет на термостабильность фермента, в то время как в случае остальных трех мутантов AfПА (M4, M5 и M6) наблюдается хорошо заметная корреляция – чем больше величины $k_{\text{кат}}$ и K_m , тем ниже стабильность ферментов. В случае мутанта AfПА M6 с самой большой величиной $k_{\text{кат}}$ стабильность фермента падает более, чем

в 8 раз. В настоящее время установить роль каждой из аминокислотных замен в стабильности AfПА не представляется возможным. Для этого необходимо провести дополнительные эксперименты. Однако по ряду замен можно сказать следующее. В AfПА M3 аминокислотная замена βY137H локализована в центре β -листа, внутри глобулы. Вероятно, замена неполярного остатка Тут на полярный остаток His внутри белковой глобулы является причиной дестабилизации в этом ферменте. Замена βE439G в случае мутанта AfПА M6 находится в α -спирали, и здесь возможны два механизма дестабилизации – повышение гибкости и, как следствие, снижение стабильности α -спирали за счет остатка введенного Gly и (или) удаление отрицательного заряда с поверхности белковой глобулы.

Таким образом, нами были экспрессированы шесть мутантных AfПА. Результаты свидетельствуют о влиянии ряда нуклеотидных замен на уровень биосинтеза белка. Исследование кинетических параметров и температурной стабильности фермента дикого типа и четырех мутантных AfПА показало, что мутации могут оказывать существенное влияние на свойства фермента.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 13-04-01907-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gang Cai, Songcheng Zhu, Sheng Yang, Guoping Zhao, Weihong Jiang // *Appl. Environ. Microbiol.* 2004. **70**. N 5. P. 2764.
2. R. M. D. Verhaert, A. M. Riemens, J.-M. Van der Laan, J. van Duin, W. J. Quax // *Appl. Environ. Microbiol.* 1997. **63**. N 9. P. 3412.
3. Zhou Zheng, Zhou Li-Ping, Chen Mei-Juan, Zhang Yan-Liang, Li Ren-Bao, Yang Sheng, Yuan Zhong-Yi // *Acta Biochim. Biophys. Sinica.* 2003. **35**. N 5. P. 416.
4. Hiroshi Ohashi, Yumiko Katsuta, Terutaka Hashizume, Shin-Nosuke Abe, Hiroko Kajiura, Hiroyuki Hattori, Toshio Kamei, Mitsuo Yano // *Appl. Environ. Microbiol.* 1988. **54**. N 11. P. 2603.

5. Laura Martín, María A. Prieto, E. Cortés, José L. García // FEMS Microbiology Letters. 1995. **125**. N 2-3. P. 287.
6. Jeyaprakash Rajendhran, Paramasamy Gunasekaran // J.Biosc.Bioeng. 2007. **103**. N 5. P. 457.
7. Gümüsel F, Kiremit N, İşsever S, Oğras TT, Bermek E. // Biochem Mol Biol Int. 1996. **38**. N 2. P. 315.
8. Varshney NK, Ramasamy S, Brannigan JA, Wilkinson AJ, Suresh CG. // Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun. 2013. **69**. N 8. P. 925.
9. Ljubijankić G, Konstantinović M, Glisin V. // DNA Seq. 1992. **3**. N 3. P. 195.
10. Švedas V, Guranda D, van Langen L, van Rantwijk F, Sheldon R. // FEBS Lett. 1997. **417**. N 3. P. 414
11. Ясная А.С. // Клонирование и экспрессия в *E. coli* пенициллинацилаз для получения мутантных форм с улучшенными свойствами. Дис. ... канд. хим. наук, М., 2009.

Поступила в редакцию 11.11.13

EXPRESSION AND CHARACTERIZATION OF MUTANT FORMS OF PENICILLIN ACYLASE FROM *Alcaligenes faecalis*

A.V. Stepashkina^{1,2}, S.S. Savin^{2,3}, O.E. Skirgello^{1,2} and V.I. Tishkov^{1,2,3*}

(¹Department of Chemical Enzymology, Faculty of Chemistry, Moscow State University, Moscow, Russia, ²Innovations and High Technologies MSU Ltd., Moscow, Russia, ³A.N. Bakh Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; e-mail: vitishkov@gmail.com)

Sequencing of six plasmids with gene of penicillin acylase from *Alcaligenes faecalis* VKM B1518 (AfPA) revealed presence of random nucleotide mutations resulted aroused after polymerase chain reaction. Six mutant AfPAs as well as wild-type enzyme were expressed in *E.coli* cells. Data obtained showed that some amino acid changes influenced on enzyme activity and level of expression of the mutants as well as on speed of cell growth. Four mutant AfPAs were purified and characterized. It was found that studied amino acid replacements did not change catalytic efficiency Amino acid changes β Q133R and β K184E (mutant AfPA M2) are not essential for thermal stability while in the case of mutants AfPA M4 (β Y90H), M5 (α D132G, β R97C) and M6 (α V5E, α N183S and β E439G) inactivation rate constant in comparison with wild-type enzyme increased 2.4, 2.75 and 8.3 fold, respectively.

Key words: penicillin acylase, *Alcaligenes faecalis*, random mutagenesis, expression, catalytic properties, thermal stability.

Сведения об авторах: Степашикина Анастасия Владимировна – аспирант химического факультета МГУ; Савин Святослав Сергеевич – науч. сотр. лаборатории молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха РАН; ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», канд. биол. наук; Скиргелло Ольга Евгеньевна – науч. сотр. кафедры химической энзимологии МГУ; ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», канд. хим. наук; Тишков Владимир Иванович – профессор кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, зав. лабораторией молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха РАН, докт. хим. наук (e-mail: vitishkov@gmail.com).