

IBM-compatible personal computer is described. Presented software package allows to compare the results obtained by the new method with the traditional ones. A sufficient criteria for protein classification have been developed.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dayhoff M. O. Atlas of protein sequence and structure.— Washington, 1973.— Suppl. 1.— P. 112.
2. Fitch W. M., Margoliash E. Construction of phylogenetic trees // Science.— 1967.— 155, N 2.— P. 279—284.
3. Вапник В. Н. Восстановление зависимостей по эмпирическим данным.— М.: Наука, 1979.— 340 с.
4. Классификация и идентификация токсических полипептидов методом распознавания образов / И. И. Парилис, Г. Л. Буссель, Л. Я. Юкельсон, Д. Х. Хамидов // Молекуляр. биология.— 1988.— 22, № 6.— С. 1697—1701.
5. Сравнительный анализ факторов роста нервов (ФРН) с применением компьютерных программ / И. И. Парилис, Р. С. Салихов, Д. Б. Мирходжаев и др. // Докл. АН УзССР.— 1990.— 11, № 1.— С. 53—55.
6. Айла Ф. Дж. Эволюция: Молекулярная биология предлагает эффективные методы реконструкции филогении // Журн. общ. биологии.— 1986.— 47, № 4.— С. 479—493.
7. Selby M. J., Edwards R. H., Rutter W. J. Cobra NGF: structure and evolutionary comparison // Neurosci. Res.— 1987.— 18, N 2.— С. 293—298.
8. Homology between snake venom sarafotoxins and mammalian endothelins / D. Graur, A. Bdelah, Z. Wollberg, E. Kochva // Isr. J. Zool.— 1988/1989.— 35.— P. 171—175.
9. Taniya N., Maeda N., Cogger H. G. Neurotoxins from the venoms of the sea snakes *Hydrophis ornatus* and *Hydrophis lapemoides* // Biochem. J.— 1983.— 213, N 1.— P. 36—38.
10. Зыкова Т. А., Козловская Э. П. Аминокислотная последовательность нейротоксина I из актинии *Radianthus macrodactylus* // Биоорг. химия.— 1989.— 15, № 10.— С. 1301—1306.

Ин-т биохимии АН УзССР, Ташкент

Получено 26.03.91

УДК 577.15

Е. О. Кальчева, М. М. Файзишев, С. С. Малюта

УРИДИНДИФОСФАТ-N- АЦЕТИЛМУРАМИЛ-L-АЛАНИЛ-D-ГЛЮТАМАТ: МЕЗО-2, 6-ДИАМИНОПИМЕЛАТЛИГАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ В ЭКСТРАКТАХ КЛЕТОК *BACILLUS SUBTILIS*, *STREPTOCOCCUS BOVIS* И *ENTEROCOCCUS FAECIUM*

В экстрактах клеток *B. subtilis*, *S. bovis*, *E. faecium* обнаружена УДФ-N-ацетилмурамил-L-аланил-D-глутамат: мезо-2,6-ДАП-лигазная активность. УДФ-N-ацетилмурамил-L-аланил-D-глутамат: мезо-2,6-ДАП-лигаза *B. subtilis* выделена и очищена гель-фильтрацией и ионообменной хроматографией. Молекулярная масса фермента, определенная методом гель-фильтрации, составляет 120 000.

Введение. Мезо-диаминопимелиновая кислота (мезо-ДАП) является непосредственным предшественником лизина в его биосинтетическом пути и в то же время — важным компонентом пептидогликана бактериальной клеточной стенки (рис. 1). Декарбоксилирование мезо-ДАП в лизин осуществляется ферментом мезо-ДАП-декарбоксилазой (ЕС 4.1.1.20), а включение мезо-ДАП в состав УДФ-N-ацетилмурамил-трипептида катализируется УДФ-N-ацетилмурамил-L-аланил-D-глутамат: мезо-2,6-ДАП-лигазой (ЕС 6. 3. 2. 13). ДАП-лигазная активность обнаруживается в клетках бактерий, клеточная стенка которых содержит мезо-ДАП [1, 2]. В настоящее время указанный фермент выделен из *Corynebacterium xerosis* [3], *B. cereus* [4], *Escherichia coli* [5]; показана его способность функционировать как в прямом, так и в обратном

© Е. О. КАЛЬЧЕВА, М. М. ФАЙЗИШЕВ, С. С. МАЛЮТА, 1991

направлениях. В ходе обратной реакции происходит выщепление мезо-ДАП из УДФ-N-ацетилмурамил-трипептида, что сопровождается образованием АДФ:



В стандартных условиях скорость обратной реакции составляет лишь малый процент от реакции в прямом направлении [4]. Однако в экстрактах исследуемых нами микроорганизмов *B. subtilis*, *S. bovis*

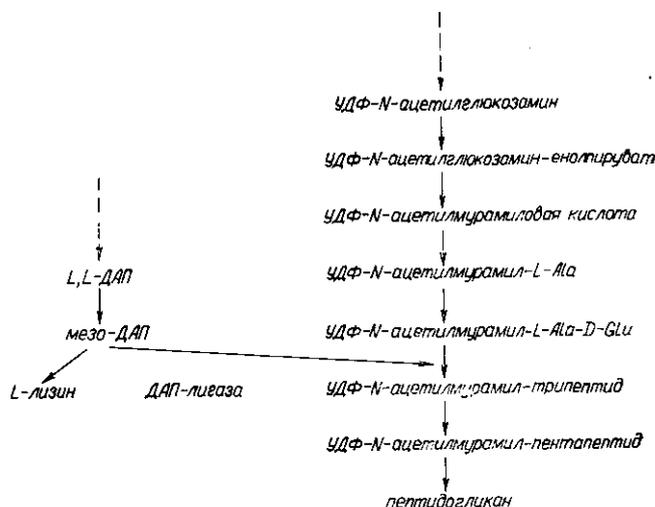


Рис. 1. Схематическое изображение пути биосинтеза пептидогликана [13]

и *E. faecium* даже при неспецифических ферментативных условиях наблюдалось образование спектрофотометрически тестируемого количества мезо-ДАП. С помощью методов гель-фильтрации и ионообменной хроматографии мы очистили фермент, катализирующий накопление мезо-ДАП в экстрактах клеток *B. subtilis*, до гомогенного состояния и установили его молекулярную массу.

Материалы и методы. Штаммы и среды. В работе использованы следующие бактериальные штаммы; *B. subtilis* SHgW, который культивировали на среде Spizizen [6]; *S. bovis* AO24/85 и *E. faecium* AL6, выращенные на модифицированной нами среде Henderson and Snell [7], содержащей (г/л): глюкозу 20, цитрат Na 20, K_2HPO_4 5, NH_4Cl 3, ацетат Na 1, MgSO_4 0,1, гидролизат казеина 0,1. Инкубация при 37 °С.

Получение бесклеточных экстрактов. Бактериальные клетки после отделения от культуральной среды центрифугированием и промыванием 0,15 М фосфатным буфером, pH 7,1, суспендировали в буфере того же состава. Клеточные стенки разрушали ультразвуком с частотой 20 кГц 3 раза по 30 с на установке «MSE» (Англия). Полученный гомогенат центрифугировали либо 20 мин при 15 000 g, либо 60 мин при 100 000 g. Образовавшийся супернатант использовали в качестве бесклеточного экстракта.

Выделение ДАП-лигазы *B. subtilis* осуществляли согласно рекомендациям Michaud et al. [5], после чего ферментативный препарат нанесли на колонку с сефадексом G-200 (0,9×100 см), предварительно уравновешенную буфером А (0,15 М фосфатный буфер, pH 7,1, 1 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1 мМ MgCl_2). Элюцию вели со скоростью 20 мл/ч. Полученные после гель-фильтрации активные фракции объединяли и подвергали дальнейшей очистке на колонке MonoQ («Pharmacia», Швеция), также уравновешенной буфером А. Адсорбированный материал элюировали возрастающим градиентом концентрации KCl (0—1 М) со скоростью 60 мл/ч в течение 30 мин.

Методы анализа. Активность ДАП-декарбоксилазы определяли по методу Wolk [8], активность ДАП-лигазы — по скорости образования мезо-ДАП в реакционной среде (конечный объем 0,5 мл), содержащей 0,3 М фосфатный буфер, рН 8,5, 4 мМ АДФ и бесклеточный экстракт, полученный центрифугированием при 15 000 *g* в течение 20 мин. После инкубации при 37 °С в течение 30 мин реакцию останавливали добавлением 0,12 мл ледяной уксусной кислоты. Удельную ферментативную активность измеряли по количеству микромолей мезо-

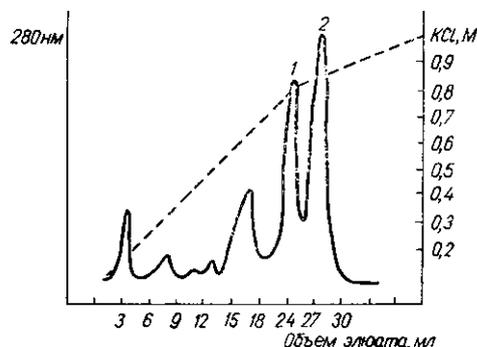


Рис. 3. Разделение ДАП-лигазы (2) и ДАП-декарбоксилазы (1) на колонке MonoQ

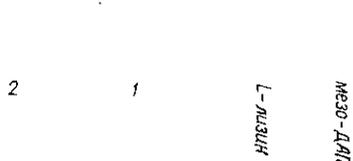


Рис. 2. Электрофорез на бумаге реакционной смеси с бесклеточным экстрактом *B. subtilis*. После инкубации в течение 0 (1) и 30 мин (2) 20 мкл реакционной пробы анализировали электрофоретически

ДАП, образовавшейся за 1 мин в присутствии 1 мг белка бесклеточного экстракта.

Концентрацию белка определяли методом Bradford [9].

Высоковольтный электрофорез на бумаге проводили в растворе уксусная кислота : муравьиная кислота : вода (10 : 41,2 : 948, V/V), рН 1,9, 45 мин, 4000 В. Электрофореграммы проявляли 1 %-ным раствором пингидрина в ацетоне.

Молекулярную массу ферментов определяли гель-фильтрацией [10]. В качестве белков-маркеров использовали набор LW Kit («Pharmacia»).

Результаты и обсуждение. Фермент ДАП-декарбоксилаза преобразует мезо-ДАП в лизин. Его активность измеряют по скорости переработки мезо-ДАП [8].

При определении ДАП-декарбоксилазной активности в экстрактах клеток *B. subtilis*, *S. bovis* и *E. faecium*, достигших конца экспоненциальной фазы роста, мы часто тестировали не уменьшение, а увеличение содержания ДАП. Известно, что у бацилл максимальная ДАП-декарбоксилазная активность приходится на конец ростового цикла [11]. Тем не менее в ходе ферментативной реакции мы отмечали именно возрастание концентрации мезо-ДАП (рис. 2).

Наблюдаемое повышение содержания этой аминокислоты могло быть обусловлено наличием другого фермента, катализирующего накопление мезо-ДАП и способного эффективно функционировать в условиях, оптимальных для проявления ДАП-декарбоксилазной активности.

Фермент ДАП-лигаза, ускоряя реакцию в обратном направлении,

отщепляет от предшественника пептидогликана клеточной стенки УДФ-N-ацетилмурамил-трипептида мезо-ДАП и увеличивает тем самым содержание диаминопимелиновой кислоты в свободном состоянии. Данный уридиновый трипептид накапливается в бактериальных экстрактах, получаемых в результате разрушения оболочек клеток ультразвуком и последующего центрифугирования при 15 000 g в течение 20 мин [12]. Использование другого режима центрифугирования (100 000 g, 60 мин) позволяет отделить ферментативные образцы от пептидогликана [12]. Действительно, в бесклеточных экстрактах *B. subtilis*, *S. bovis*, *E. faecium*, отобранных после осаждения при 100 000 g, не отмечалось увеличения содержания ДАП в случае их использования для определения ДАП-декарбоксилазной активности. Добавление же к таким экстрактам полученного при центрифугировании осадка приводило к заметному повышению концентрации этой аминокислоты в реакционной пробе. Уровень содержания ДАП становился еще выше при смещении рН реакции в щелочную сторону (рН 9) и при увеличении молярности 0,15 М фосфатного буфера до значения 0,3 М (таблица). Перечисленные условия (слабощелочное значение рН, наличие неорганического фосфора, а также АДФ) являются оптимальными для функционирования ДАП-лигазы в обратном направлении [4, 5]. Внесение нами в реакционную среду, содержащую 0,3 М фосфатный буфер (рН 8,5) и бесклеточный экстракт любого из исследуемых микроорганизмов, полученный центрифугированием при 15 000 g (что определяет наличие в нем как ферментативного препарата, так и УДФ-N-ацетилмурамил-трипептида), 4 мМ АДФ способствовало трехкратному увеличению содержания ДАП (см. таблицу). Таким образом, чем ближе становились условия реакции к специфически подобранным для проявления ДАП-лигазной активности, тем значительно возрастал уровень содержания ДАП.

Образование мезо-ДАП в бесклеточных экстрактах *B. subtilis*, *S. bovis* и *E. faecium*

Компоненты реакционной смеси, мМ				Компоненты реакционной смеси, мМ			
КН ₂ РО ₄	Пиридоксаль-фосфат	АДФ	Мезо-ДАП, мкмоль	КН ₂ РО ₄	Пиридоксаль-фосфат	АДФ	Мезо-ДАП, мкмоль
150	16	—	2±1	300	—	—	6±2
300	16	—	6±2	300	—	4	18±1

Для дальнейшей характеристики ферментативного препарата, осуществляющего накопление мезо-ДАП в экстрактах *B. subtilis*, он был изолирован согласно рекомендациям Michaud et al. [5] и очищен гель-фильтрацией на сефадексе G-200. После элюции с колонки 0,15 М фосфатным буфером выявлен один активный белковый пик, *M_r* которого 120 000. Помимо ДАП-лигазной, он содержал и ДАП-декарбоксилазную активность. Разделение этих ферментативных активностей достигалось посредством ионообменной хроматографии. ДАП-лигазная фракция элюировалась с MonoQ при более высокой концентрации KCl, чем ДАП-декарбоксилазная (рис. 3). Установленная гель-фильтрацией в указанных условиях величина молекулярной массы ДАП-лигазы *B. subtilis* фактически не отличается от таковой у ДАП-лигазы *E. coli* (*M_r* 106 000±3000) [5]. Такая молекулярная масса характерна для димерных белков. Выяснение предполагаемого субъединичного строения ДАП-лигазы *B. subtilis* и ее физико-химических свойств составляют предмет наших дальнейших исследований.

Резюме

В экстрактах клеток *B. subtilis*, *S. bovis*, *E. faecium* выявлена УДФ-N-ацетилмурамил-L-аланил-D-глутамат: мезо-2, 6-ДАП-лигазная активность. УДФ-N-ацетилмурамил-L-ала-

ніл-*D*-глутамат: мезо-2, 6-ДАП-лігаза *B. subtilis* виділена і очищена гел-фільтрацією та іонообмінною хроматографією. Молекулярна маса ферменту, визначена методом гел-фільтрації, становить 120 000.

С у м м а г у

Uridine-diphosphate-N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-glutamate: meso-2, 6-diaminopimelate ligase activity was found in extracts of *B. subtilis*, *S. bovis*, *E. faecium*. UDP-N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-glutamate: meso-2, 6-diaminopimelate ligase from *B. subtilis* was purified by gel-filtration and ion-exchange chromatography. The molecular weight of enzyme as determined by gel-filtration is 120 000.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Strominger J. L., Ito E., Threnn R. H. Comparative biochemistry of cell wall peptide synthesis in bacteria // Fed. Proc.—1961.—20.—P. 228.
2. Formation of YDP-acetylmuramyl peptides / E. Ito, S. G. Nathenson, D. N. Dietzler et al. // Meth. Enzymol.—New York: Acad. press, 1966.—Vol. 8.—P. 324—328.
3. Preparation and fractionation of DAP-adding enzyme from *Corynebacterium xerosis* / E. Ito, S. G. Nathenson, D. N. Dietzler et al. // Ibid.—P. 329—337.
4. Mizuno Y., Ito E. Purification and properties of uridine diphosphate N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-glutamate: meso-2, 6-diaminopimelate ligase // J. Biol. Chem.—1968.—243, N 10.—P. 2665—2672.
5. Over-production, purification and properties of the uridine-diphosphate-N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-glutamate: meso-2, 6-diaminopimelate ligase from *Escherichia coli* / C. Michaud, D. Mengin-Lecreulx, J. van Heijenoort, D. Blanot // Eur. J. Biochem.—1990.—194, N 3.—P. 853—861.
6. Spizizen C., Reilly B. E., Evans A. H. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis* // Ann. Rev. Microbiol.—1966.—20, N 1.—P. 341—400.
7. Henderson L. M., Snell E. E. Uniform medium for determination of amino acids with various microorganisms // J. Biol. Chem.—1948.—172, N 1.—P. 15—29.
8. Work E. Reaction of ninhydrin in acid solution with straight-chain amino acids containing two amino groups and its application to the estimation of α -diaminopimelic acid // Biochem. J.—1967.—67, N 3.—P. 416—423.
9. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // J. Anal. Biochem.—1976.—72, N 2.—P. 248—254.
10. Andrews P. Estimation of the molecular weight of proteins by sephadex gel-filtration // J. Biochem.—1964.—91, N 2.—P. 222—333.
11. Grandgenett D. P., Stahly D. P. Diaminopimelate decarboxylase of sporulating bacteria // J. Bacteriol.—1968.—96, N 6.—P. 2099—2109.
12. Mengin-Lecreulx D., Flouret B., van Heijenoort J. Cytoplasmic steps of peptidoglycan synthesis in *Escherichia coli* // Ibid.—1982.—151, N 3.—P. 1109—1117.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 15.05.91