

Diss. ETH ex A

Diss. ETH Nr. 9114

***Biological Function and Conformation of
Proteases in Reverse Micelles***

A dissertation submitted to the
Swiss Federal Institute of Technology Zürich
for the degree of Doctor of Natural Science

Presented by
Qiaoqian Peng
Born on March 28, 1959
in Beijing, People's Republic of China

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. P.L. Luisi, referee

Prof. Dr. H. Hauser, co-referee

Zürich 1990



Abstract

In this thesis two proteases, α -chymotrypsin and trypsin, have been systematically investigated in reverse micelles derived from di(2-ethylhexyl) sodium sulfosuccinate ("Aerosol OT", AOT) in isooctane, or chemically synthesized short chain lecithin (C₅ - C₈ phosphatidylcholine) in a mixture of isooctane and aliphatic alcohol.

For the first time the thermodynamics (e.g. phase diagram) and aggregation structure (form and size) of such synthetic lecithin reverse micellar systems have been studied. The aggregates could be described, to a first approximation, by a spherical model having a lecithin and aliphatic alcohol monolayer shell and an inner water core. The combination of the information from phase behavior studies (the location of the L₂ phase) and the dependence of the apparent hydrodynamic radius (as studied by quasi elastic light scattering) on the solution composition was helpful to qualitatively understand the strong influence of both lecithin and aliphatic alcohol chain lengths on the inter-micellar interaction. Such qualitative knowledge is useful for understanding the strong variation in the activity of the enzymes observed in this work.

The pH and the physical state of the water in the water pool were investigated by ³¹P-NMR and ¹H-NMR techniques.

The enzymatic properties of α -chymotrypsin and trypsin have been studied in the above mentioned reverse micellar systems. Three substrates were used: N _{α} -benzoyl-L-Arg ethyl ester (BAEE); N _{α} -benzoyl-L-Phe-L-Val-L-Arg-p-nitroanilide (BPVAPA) and N _{α} -glutaryl-L-Phe-p-nitroanilide (GPNA). One of the main aims of the work was to compare the behavior of trypsin in reverse micelles with that of α -chymotrypsin. For α -chymotrypsin an enhanced k_{cat} had

been obtained in reverse micelles with respect to aqueous solutions. The stability of trypsin in AOT reverse micelles, and of both enzymes in various short chain lecithin reverse micellar solutions, is similar and occasionally better than that in aqueous solutions. The same holds for the kinetic parameters (k_{cat} and K_m have been determined for a few systems).

Bell-shaped curves of pH/activity profiles as well as of w_o /activity profiles of the two enzymes in reverse micellar solutions were obtained.

Spectroscopic studies (ultraviolet absorption, circular dichroism and fluorescence) have been carried out as a function of w_o and salt concentration. The results indicate that there is only a minute conformational difference between the enzymes in reverse micellar media and in aqueous solutions.

Two myelin proteins (the myelin basic protein that is water soluble and the proteolipid protein that is water insoluble) which constitute 80 % of myelin proteins have also been incorporated into lecithin reverse micelles derived from synthetic lecithins in a mixture of isooctane/aliphatic alcohol. Solubility properties and spectral characteristics of the two myelin proteins in lecithin reverse micellar solutions were studied in order to gain insight into the interaction of the two myelin proteins with the phosphatidylcholine polar head group within the micelles.

The studies on enzymes in reverse micellar systems are briefly summarized in this thesis. Some potential applications relevant to both basic science and technology are also discussed.

Kurzfassung

In der vorliegenden Arbeit sind zwei Proteasen, nämlich α -Chymotrypsin und Trypsin in umgekehrten Mizellen, die von Bis-(2-Ethylhexyl)-sulfobernsteinsäureester ("Aerosol OT" oder AOT) in Isooktan oder von synthetisiertem, kurzkettigem Lecithin (C_5 bis C_8 Phosphatidylcholin) in einem Gemisch von Isooktan und aliphatischem Alkohol gebildet wurden, systematisch untersucht worden.

Zum ersten Mal sind die Thermodynamik (z. Bsp. das Phasendiagramm) und die Aggregationsstruktur (Form und Grösse) von umgekehrten Mizellen, die aus synthetischem Lecithin gebildet werden, intensiv untersucht worden. Die Aggregate wurden in einer ersten Approximation durch ein sphärisches Modell beschrieben. In diesem Modell wird ein Wassertröpfchen durch eine einzige Schicht von Lecithin und dem aliphatischen Alkohol umgeben. Die Informationen, die man aus den Untersuchungen über das Phasenverhalten (Lokalisation der L_2 -Phase) und aus der Abhängigkeit des hydrodynamischen Radius (QELS-Messungen) von der Zusammensetzung der Lösung erhielt, waren hilfreich, den Einfluss, den die Kettenlänge von Lecithin und vom Alkohol auf die mizellaren Wechselwirkungen ausübt, qualitativ zu verstehen. Diese Untersuchungen waren wichtig, um die grossen Aktivitätsunterschiede der Enzyme interpretieren zu können.

Ein anderer Teil der Arbeit beschäftigte sich mit dem pH und dem physikalischen Zustand des Wassers innerhalb der Mizellen, wobei ^{31}P -NMR- und ^1H -NMR-Spektroskopie eingesetzt wurden.

Die Eigenschaften von α -Chymotrypsin und Trypsin sind untersucht worden in den oben erwähnten umgekehrt mizellaren Systemen, und drei Substrate für die Aktivitätsmessungen sind benutzt worden, nämlich: BAEE, BPVAPA und GPNA. Eines der Hauptziele der Arbeit war der Vergleich der Eigenschaften von Trypsin mit den Eigenschaften von α -Chymotrypsin in

umgekehrten Mizellen. Ein grösserer k_{kat} -Wert wurde für α -Chymotrypsin in umgekehrten Mizellen im Vergleich zu Wasser gefunden. Die Stabilität von Trypsin in AOT umgekehrten Mizellen und den beiden Enzymen in mizellaren Lösungen, die mit kurzkettigem Lecithin gebildet werden, ist ähnlich und etwas besser als die Stabilität, die diese Enzyme im Wasser ausweisen. Aehnliche Resultate wurden für k_{kat} und K_m gefunden. Die Abhängigkeit der Aktivität vom pH und w_o -Wert verläuft über ein Maximum.

Ein weiterer Teil der Arbeit beschäftigt sich mit spektroskopischen Untersuchungen (UV-Absorption, Cirkular Dichroismus und Fluoreszenz-Spektroskopie); dabei wurde besonders die Salzkonzentration und die Abhängigkeit von den w_o -Werten untersucht. Die Resultate zeigen, dass nur geringe konformationelle Unterschiede der Enzyme, die in umgekehrten Mizellen solubilisiert sind, im Vergleich mit Wasser auftreten.

Zwei Myelinproteine (das basische Myelinprotein, das wasserlöslich ist und das Proteolipid Protein, das wasserunlöslich ist), die zu 80% aus Myelinprotein bestehen, sind ebenfalls in Lecithin umgekehrten Mizellen solubilisiert worden. Löslichkeits- und spektroskopische Eigenschaften der zwei Myelinproteine in umgekehrten Mizellen sind erforscht worden, um Einsicht zu gewinnen in die Wechselwirkungen der beiden Proteine mit den Phosphatidylcholin Gruppen innerhalb der Mizellen.

Die Arbeit wurde abgerundet durch einen kurzen Ueberblick über untersuchte Enzyme, die in umgekehrt mizellarem Medium solubilisiert worden sind. Einige potentielle Anwendungen, die sowohl in der Grundlagenforschung als auch in einem technischen Einsatz von umgekehrt mizellaren Systemen zu finden sind, wurden ebenfalls diskutiert.