



УДК 577.452.232*2.04 + 541.182

РЕГУЛЯЦИЯ НАДМОЛЕКУЛЯРНОЙ СТРУКТУРЫ
И КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ γ -ГЛУТАМИЛТРАНСФЕРАЗЫ
В СИСТЕМАХ ОБРАЩЕННЫХ МИЦЕЛЛ

Наметкин С. И., Кабанов А. В., Ештуенко Г. Н. *,
Чернов Н. Н. *, Березов Т. Т. *, Щеголев А. А.,
Рыжова В. В., Клячко Н. Л., Мартинек К. **,
Левашов А. В.

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

* Кафедра биохимии Университета дружбы народов им. Патриса Лумумбы, Москва;

** Институт органической химии и биохимии Академии наук СССР, Прага

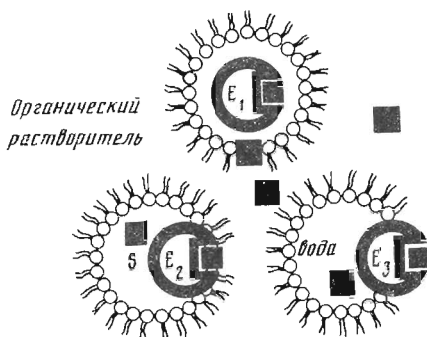
Изучена регуляция надмолекулярной структуры и каталитической активности гетеродимерного фермента — γ -глутамилтрансферазы в системе обращенных мицелл аэрозоля ОТ (АОТ) в октано. При использовании в качестве субстратов *L*- и *D*-изомеров γ -(3-карбоксо-4-нитро)анилида глутаминовой кислоты и глицилглицина исследованы катализируемые ферментом гидролазная, аутотрансферазная и трансферазная реакции. Для всех типов реакций зависимости каталитической активности γ -глутамилтрансферазы от степени гидратации имеют вид кривых с тремя оптимумами при $[H_2O]/[АОТ] = 11, 17$ и 26 , когда радиусы внутренней полости мицелл соответствуют размерам легкой (M_r 21 000), тяжелой (M_r 54 000) субъединиц γ -глутамилтрансферазы и димера (M_r 75 000). Методом скоростной седиментации установлено, что при изменении степени гидратации происходит обратимая диссоциация фермента на легкую и тяжелую субъединицы. Показано, что обе субъединицы обладают способностью катализировать гидролазную и трансферазную реакции; аутотрансферазная реакция обнаруживается только в случае тяжелой субъединицы. На зависимостях каталитической активности субъединиц от степени гидратации наблюдается по одному оптимуму: при $[H_2O]/[АОТ] = 11$ (для легкой) и 17 (для тяжелой субъединиц). При смешении мицеллярных растворов, содержащих легкую и тяжелую субъединицы, обнаруживается третий оптимум, соответствующий димеру ($[H_2O]/[АОТ] = 26$).]

В настоящее время очевидно, что исключительно важную роль в регуляции ферментативной активности играют белок-белковые взаимодействия. Они реализуются, например, при специфическом связывании ферментов с регуляторными белками или образовании мультиферментных и ферментно-транспортных комплексов [1—3]. Для олигомерных ферментов взаимодействие белковых субъединиц не только определяет такие важнейшие свойства, как способность к аллостерической регуляции и др. [3, 4], но часто составляет необходимое условие для проявления самой ферментативной функции [1]. Наконец, даже неспецифические взаимодействия фермента с белками клеточного матрикса могут приводить к существенному изменению его каталитических свойств [1, 5], и в этой связи в литературе рассматривается возможность регуляции ферментативной активности в системах, содержащих обратимо адсорбирующиеся ферменты [6].

Следует отметить, однако, что детальное изучение этих факторов ограничивается отсутствием надежных и универсальных подходов, позволяющих регулировать состав исследуемых белковых комплексов: искусственно осуществлять их сборку или, наоборот, разрушение. Так, в частности, в случае олигомерных ферментов разделение на субъединицы *in vitro* часто наблюдается лишь в денатурирующих условиях, что существенно

Принятые сокращения: ПАВ — поверхностно-активное вещество, аэрозоль ОТ (АОТ) — патриевая соль ди-2-этилгексилевого эфира сульфоянтарной кислоты, CNA — 3-карбоксо-4-нитроанилин, *L* (*D*)-Glu(CNA) — γ -(3-карбоксо-4-нитро)анилид *L* (*D*)-глутаминовой кислоты, Glu(pNA) — γ -(4-нитро)анилид *L*-глутаминовой кислоты, GlyGly — глицилглицин.

Рис. 1. Схематическое представление взаимодействия молекулы субстрата или другого реагента (S), распределенного в системе обращенных мицелл с включенными гидрофильным (E_1), поверхностно-активным (E_2) и гидрофобным (E_3) ферментами [8]



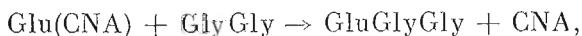
затрудняет возможность исследования каталитических свойств отдельных субъединиц [7].

Мы полагаем, что подобные задачи могут быть решены при использовании в качестве среды для ферментативной реакции систем гидратированных обращенных мицелл ПАВ в органических растворителях [8—11]. При солюбилизации в таких системах ферменты включаются во внутреннюю водную полость мицелл (рис. 1), сохраняя при этом каталитическую активность [12]. Размер внутренней полости мицелл можно варьировать в широком диапазоне (от десятка до сотен и более Å), изменяя степень гидратации ПАВ (молярное отношение [вода]/[ПАВ] в системе) [13—15]. Таким образом, в обращенной мицелле при различных степенях гидратации может помещаться как одна молекула белка, так и крупные белковые комплексы. Иными словами, обращенные мицеллы могут служить матрицами регулируемого размера для сборки белковых комплексов различного состава.

Это обстоятельство может быть использовано, например, для контролируемого синтеза конъюгатов макромолекул [16]. Что же касается кинетических исследований, то принципиальная возможность регуляции активности олигомерного фермента при изменении его субъединичного состава в системе обращенных мицелл была показана на примере лактатдегидрогеназы [17]. По существу лактатдегидрогеназа представляет собой агрегат одинаковых ферментных молекул — она состоит из четырех идентичных субъединиц, каждая из которых обладает каталитической активностью. Совершенно иной случай — исследуемая в настоящей работе γ -глутамилтрансфераза. Этот гетеродимерный фермент образован нековалентно связанными «легкой» и «тяжелой» (M_r 21 000 и 54 000) субъединицами [18]. Имеющиеся в литературе данные указывают на то, что обе субъединицы участвуют в формировании активного центра γ -глутамилтрансферазы [19, 20]. Разделение субъединиц традиционными методами в растворах детергентов и с помощью мочевины вызывает потерю ферментом специфической активности [21, 22]. В настоящей работе представлены результаты изучения закономерности регуляции активности γ -глутамилтрансферазы в системе обращенных мицелл одного из наиболее часто используемых для энзимологических исследований ПАВ — аэрозоля OT в октане.

Каталитическая активность γ -глутамилтрансферазы в системе обращенных мицелл. Водные замечания. γ -Глутамилтрансфераза катализирует реакции переноса γ -глутамильного остатка от молекулы донора (глутатион или другие γ -глутамилсодержащие соединения, например Glu(CNA)) на молекулу акцептора. В зависимости от природы акцептора рассматривают три типа катализируемых реакций [18]:

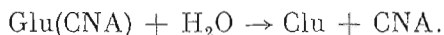
а) трансферазную (перенос γ -глутамильного остатка на аминокислоты или пептиды, например глицилглицин):



б) аутотрансферазную (перенос γ -глутамильного остатка на вторую молекулу субстрата):



в) гидролазную:



Следует подчеркнуть, что катализируемые реакции стереоспецифичны: в качестве донора могут выступать как *L*-, так и *D*- γ -глутамилсодержащие соединения, в то время как акцепторами в реакциях (а) и (б) могут быть только *L*-изомеры аминокислот и пептидов [18].

Реакции (а)—(б) подчиняются простым кинетическим закономерностям [23]. В изученном нами диапазоне концентраций *L(D)*-Glu(CNA) (см. «Экспериментальную часть») зависимости скоростей реакции от концентрации субстрата линеаризовались в координатах Лайнуивера — Берка. В качестве параметра, характеризующего каталитическую активность γ -глутамилтрансферазы, мы использовали отношение максимальной скорости реакции к концентрации фермента — $V/[E]_0$, с^{-1} . Эту величину определяли в условиях насыщения фермента субстратами: *L*-Glu(CNA) и GlyGly (трансферазная реакция); *L*-Glu(CNA) (аутотрансферазная реакция) или *D*-Glu(CNA) (гидролазная реакция) [18, 23].

Следует, очевидно, допустить, что в первых двух случаях (а и б) наблюдаемая скорость образования CNA может складываться из скоростей двух процессов: гидролиза *L*-Glu(CNA) и переноса γ -глутамильного остатка на аминогруппу акцептора. Дискриминация этих двух составляющих скорости ферментативной реакции требует детального кинетического исследования (см., например, [23]). Известно, однако, что вклад гидролазной составляющей, как правило, невелик [23]. Полученные нами данные указывают на то, что этот вывод, сделанный при изучении фермента в водном растворе, справедлив и для систем обращенных мицелл. Так, в частности, введение в реакционную систему нуклеофила (GlyGly) приводит не менее чем к 5-кратному увеличению скорости по сравнению с наблюдаемой для гидролазной реакции.

Зависимость каталитической активности γ -глутамилтрансферазы от степени гидратации. Один из наиболее ярких эффектов, обнаруживаемых при изучении катализа ферментами в системах обращенных мицелл, — это зависимость каталитической активности от степени гидратации [8—11], параметра, определяющего при постоянной концентрации ПАВ размер внутренней водной полости обращенных мицелл [13—15]. К настоящему времени эти зависимости изучены почти для двух десятков ферментов. Несмотря на значительное разнообразие исследованных ферментных систем, наблюдаемые зависимости оказались весьма схожими: как правило, они имеют колоколообразный вид. Максимум каталитической активности обнаруживается при той степени гидратации, когда радиус внутренней полости мицелл равен радиусу белковой глобулы [24].

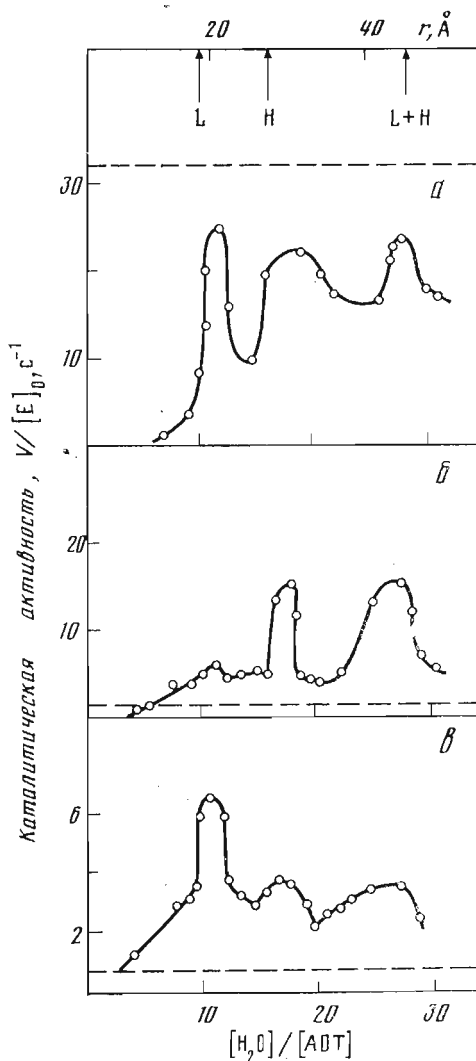
Подобные зависимости характерны и для γ -глутамилтрансферазы (рис. 2). Однако в этом случае для всех типов катализируемых γ -глутамилтрансферазой реакций обнаруживается не один, а три максимума при степенях гидратации 11, 17 и 26.

Для объяснения этого явления мы предположили, что при варьировании степени гидратации в системе обращенных мицелл может происходить изменение олигомерного состава γ -глутамилтрансферазы. В этом случае наблюдаемые максимумы обусловлены функционированием различных олигомерных форм фермента. В этой связи отметим, что при оптимальных степенях гидратации 11, 17 и 26 радиусы внутренней полости мицелл равны соответственно размерам легкой, тяжелой субъединиц γ -глутамилтрансферазы и их димера (рис. 2).

Действительно, данные седиментационного анализа свидетельствуют о том, что в системе обращенных мицелл может происходить обратимая диссоциация γ -глутамилтрансферазы на субъединицы. При степенях гидратации, больших 20, фермент существует только в форме димера (рис. 3). При меньших же степенях гидратации на седиментограмме обнаруживаются два типа содержащих белок мицелл: мицеллы с легкой (L) и тяжелой (H) субъединицами.

Значительное различие в коэффициентах седиментации этих двух типов

Рис. 2. Зависимость каталитической активности γ -глутамилтрансферазы в системе обращенных мицелл аэрозоля ОТ в октаноле от степени гидратации: *a* — трансферазная; *b* — аутооттрансферазная, *в* — гидролазная реакции. Условия эксперимента см. в «Экспер. части». Пунктиром показаны значения каталитической активности фермента в водном растворе, измеренные в условиях рН-оптимумов реакций. Для сравнения приведена шкала средних радиусов (r) внутренней полости обращенных мицелл [24]. Стрелками отмечены значения радиусов легкой (L) и тяжелой (H) субъединиц, а также их сумма (L+H). (Радиусы легкой и тяжелой субъединиц оценивали по эмпирической формуле $r_0 = 0,71 \sqrt[3]{M_r}$, где r_0 и M_r — соответственно радиус и масса белковой глобулы [24])



мицелл позволяет провести разделение легкой и тяжелой субъединиц. При скоростной седиментации (см. «Экспериментальную часть») мицеллы, содержащие тяжелую субъединицу, могут быть осаждены, в то время как мицеллы с легкой субъединицей остаются в растворе.

Зависимости каталитической активности полученных таким образом легкой и тяжелой субъединиц от степени гидратации для всех катализируемых γ -глутамилтрансферазой типов реакций имеют вид кривых с одним максимумом (рис. 4). В случае легкой субъединицы (рис. 4*a*) оптимум каталитической активности обнаруживается при степени гидратации 11; в случае тяжелой (рис. 4*б*) — при степени гидратации 17. При смешении же мицеллярных растворов, содержащих легкую и тяжелую субъединицу, на зависимости каталитической активности от степени гидратации появляется и третий максимум при $[H_2O]/[AOT] = 26$, соответствующий димеру (рис. 4*в*).

γ -Глутамилтрансфераза — полиферментный комплекс? Из литературных данных известно, что активный центр γ -глутамилтрансферазы содержит по крайней мере три различных участка: донорный и два акцепторных [18]. В донорном участке осуществляется связывание и каталитическое превращение *L*- и *D*- γ -глутамилсодержащих молекул доноров. С акцепторными участками (глициновым и цистеиновым) связываются *L*-изомеры соответствующих акцепторов. В частности, трансферазная реакция в присутствии глицилглицина (*a*) протекает с участием глицинового, а аутооттрансферазная (*б*) — с участием цистеинового участка [18].

Рис. 3. Зависимость коэффициентов седиментации обращенных мицелл, содержащих γ -глутамилтрансферазу, от степени гидратации. Сплошными линиями показаны кривые теоретически рассчитанных зависимостей для мицелл, содержащих легкую (L), тяжелую (H) субъединицы γ -глутамилтрансферазы и димер (L + H), а штриховой — для пустых (не содержащих белок) мицелл. Условия эксперимента и принцип построения теоретических кривых см. в «Экспер. части»

Рис. 4. Зависимость от степени гидратации каталитической активности легкой (а), тяжелой (б) субъединиц γ -глутамилтрансферазы и их смеси (в) для трансферазной (1), гидролазной (2) и аутотрансферазной (3) реакций. Условия эксперимента см. в «Экспер. части»

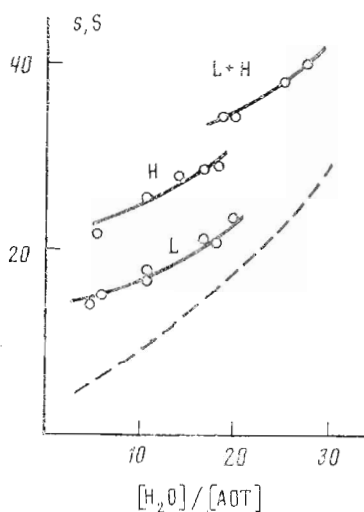


Рис. 3

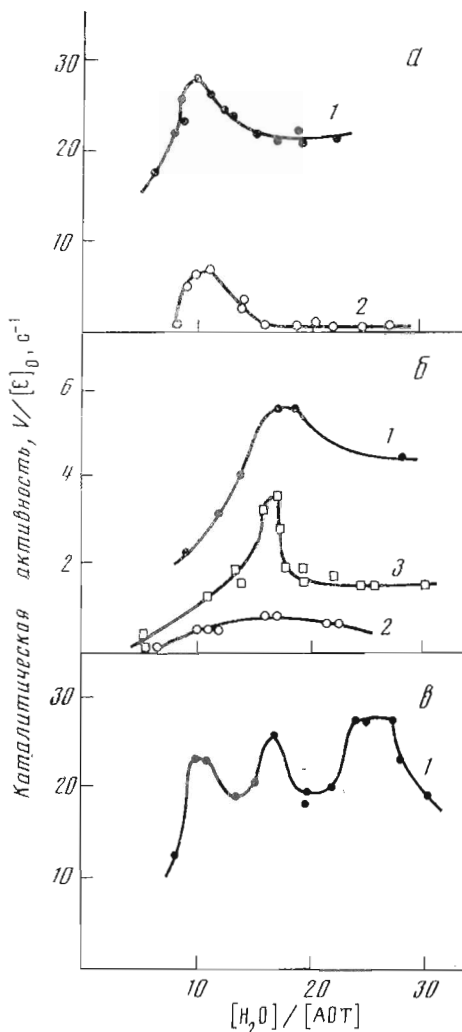


Рис. 4

Локализация этих участков не до конца ясна. Считают, однако, что донорный участок расположен на легкой субъединице фермента, а в формировании акцепторных участвуют как легкая, так и тяжелая субъединицы [19, 20].

Полученные нами данные не согласуются с такой точкой зрения. Тот факт, что обе субъединицы обладают каталитической активностью, в частности в гидролазной реакции (рис. 2в; 4а, б), заставляет предположить наличие $L(D)$ - γ -глутамилсвязывающих участков как на легкой, так и на тяжелой субъединицах. Обе субъединицы обнаруживают трансферазную активность (рис. 2а; 4а, б), что, возможно, указывает на наличие у них и глициновых акцепторных участков. В то же время аутотрансферазная реакция в значительной степени более выражена для тяжелой субъединицы (рис. 2б). (В случае легкой субъединицы скорость аутотрансферазной реакции не превышает скорости гидролазной.) Не исключено, таким образом, что связывающий вторую молекулу L -Glu(CNA) акцепторный участок расположен именно на тяжелой субъединице.

Следует отметить, что доступность всех этих участков молекулам субстратов может быть различной для разделенных субъединиц и субъединиц, находящихся в составе димера. Возможно, именно в этом следует искать причину расхождения между нашими данными и данными, полученными ранее при изучении димерной формы фермента в водном растворе [18]. В любом случае мы полагаем, что сочетание традиционных энзимоло-

гических подходов, в частности ингибиторного анализа [18], с возможностями, предоставляемыми системами обращенных мицелл, окажется полезным для изучения структуры активных центров и механизма действия γ -глутамилтрансферазы.

Авторы выражают глубокую благодарность В. Я. Черняку и П. А. Калмыкову за помощь в проведении и обсуждении результатов седиментационных экспериментов.

Экспериментальная часть

γ -Глутамилтрансферазу (КФ 2.3.2.2) выделяли из перевивной низкодифференцированной гепатомы Г-27 по методике, включающей солиubilизацию фермента папайном [25]. Фермент очищали гель-фильтрацией на сефадексе G-150. Чистоту полученного препарата (M_r 75 000) контролировали с помощью электрофореза на полиакриламидных пластинках в присутствии додецилсульфата натрия. Активность выделенного фермента составляла 30 усл. ед. (одна условная единица соответствует активности, при которой 1 мг фермента за 1 мин гидролизует 1 мкмоль Glu(pNA) при pH 8,5 и 25° С).

Аэрозоль ОТ (Merck, ФРГ) использовали без дополнительной очистки. Методом ИК-спектроскопии [26], установлено, что в этом препарате содержалось 0,5 моль воды на 1 моль АОТ.

3-Карбокси-4-нитроанилин (CNA, Fluka, ФРГ) очищали перекристаллизацией из спирта. D-Glu(CNA) синтезировали из CNA и D-глутаминовой кислоты по методикам [27, 28]. L-Glu(CNA), L-Glu(pNA) и глицилглицин — препараты фирмы Sigma (США).

Остальные использованные в работе реактивы были отечественного производства.

Измерение скорости ферментативной реакции в системе обращенных мицелл проводили по стандартной методике [26]. В 2 мл 0,1 М раствора АОТ в октанолизували 5—10 мкл 1 мкМ раствора γ -глутамилтрансферазы и 10—120 мкл 0,5—50 мМ раствора L-Glu(CNA) или D-Glu(CNA) в 25 мМ трис-HCl-буфере (pH 7,5—9,2) или в 25 мМ трис-аминопропанол-буфере (pH 9,0—10,0). При измерении скорости трансферазной реакции солиubilизируемые водные растворы содержали 0,1 М GlyGly.

Скорость реакции образования CNA определяли спектрофотометрически при 400 нм и 25° С. (В независимом эксперименте измеряли коэффициенты молярного поглощения CNA в системе обращенных мицелл при различных значениях pH и степенях гидратации.) Использовали спектрофотометр Hitachi 124 (Япония) с термостатируемым кюветным отделением.

pH-Зависимости в системе обращенных мицелл для всех типов катализируемых γ -глутамилтрансферазой реакций отличались от наблюдаемых в водном растворе (подобно тому как это было ранее обнаружено для ряда других ферментативных процессов [9—11] и характеризовались сдвигом pH-оптимумов реакции на 0,5—0,8 единиц в щелочную область. Для трансферазной реакции pH-оптимум в мицеллярной системе наблюдался при pH 8,5, для аутотрансферазной — при pH 8,8, а для гидролазной — при pH 9,0—9,2. В работе анализируются pH-независимые кинетические параметры.

Коэффициенты седиментации пустых и содержащих белок обращенных мицелл [29] определяли при 20° С на аналитической центрифуге Beckman E, снабженной фотоэлектрическим сканирующим устройством с монохроматором и мультиплексором с использованием 12-мм двухсекторных ячеек и ретора Al-G-Ti при скоростях 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. В случае систем, содержащих 4—10 мкМ белок, сканирование проводили при 280 нм (в этих условиях поглощение пустых мицелл не превышало 10% от поглощения мицелл, содержащих белок). Из экспериментальных данных коэффициенты седиментации пустых и содержащих белок мицелл рассчитывали по классической методике [30].

Разделение легкой и тяжелой субъединиц γ -глутамилтрансферазы. В 25 мл 0,1 М раствора АОТ октанолизували 225 мкл 4 мкМ раствора γ -глутамилтрансферазы в 25 мМ трис-HCl-буфере, pH 7,5 ($[H_2O]/[AOT] = 5$).

Фракцию мицелл, содержащих тяжелую субъединицу, осаждали при 30 000 об/мин в течение 40 мин на центрифуге MSE Superspeed 65 (США). Отделяли супернатант, содержащий легкую субъединицу. Осадок солиubilизировали в 10 мл 0,1 М АОТ в октано.

Теоретический анализ зависимостей коэффициентов седиментации обращенных мицелл от степени гидратации провели аналогично тому, как это списано в работе [29].

При высоких степенях гидратации, когда размер внутренней полости мицелл превосходит размер белковой глобулы, солиubilизация молекулы белка происходит без изменения гидродинамического радиуса мицеллы [29]. В этом случае коэффициент седиментации мицелл, содержащих белок, S_{bc} , может быть выражен через коэффициент седиментации «пустых» мицелл следующим образом:

$$S_{bc} = S_0 \left(1 + \frac{M_r}{M_0} \frac{1}{1 - \bar{v}_{00}} \right), \quad (1)$$

где M_r — молекулярная масса белка, M_0 и \bar{v}_0 — молекулярная масса и парциальный удельный объем пустых мицелл, ρ — плотность растворителя.

При низких степенях гидратации, когда радиус внутренней полости исходных пустых мицелл оказывается меньше белковой глобулы, соллоблизированный белок «создает» собственную мицеллу путем образования вокруг своей молекулы монолодия гидратированного ПАВ, причем с той же степенью гидратации, что и в исходных пустых мицеллах [29]. В этом случае коэффициент седиментации мицелл, содержащих белок, может быть вычислен по формуле

$$S_{\text{бс}} = S_{\text{опт}} \left(1 + \frac{M_r - n_{\text{опт}}(W_{\text{опт}} - W_0)_m}{M_{\text{опт}}} \cdot \frac{1}{1 - \bar{v}_0 \rho} \right), \quad (2)$$

где $W_{\text{опт}}$ — оптимальная степень гидратации, при которой радиус внутренней полости мицелл равен радиусу белковой глобулы; $S_{\text{опт}}$, $M_{\text{опт}}$ и $n_{\text{опт}}$ — коэффициент седиментации, молекулярная масса и число агрегации ПАВ мицелл при оптимальной степени гидратации, m — молекулярная масса воды.

Уравнения (1) и (2) были использованы для построения теоретических зависимостей коэффициентов седиментации от степени гидратации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Friedrich P. Supramolecular enzyme organization. Oxford: Pergamon Press, 1984. 300 P.
2. Moses V. // Microenvironments and metabolic compartmentation / Eds Srere P. A., Estabrook R. W. N. Y.: Acad. Press, 1978. P. 168—185.
3. Werner M., Garret C., Chiu A., Klempner L. // Clin. Chem. 1982. V. 28. P. 2351—2358.
4. Курганов В. И. Аллостерические ферменты. М.: Наука, 1978. С. 248.
5. Masters C. J. // Crit. Rev. Biochem. (CRC). 1981. V. 11. P. 105—143.
6. Kurganov B. I., Loboda M. I. // J. Theor. Biol. 1979. V. 79. P. 281—301.
7. Муродец В. И., Наградова Н. К. Имобилизованные олигомерные ферменты. М.: Наука, 1984. 208 с.
8. Martinek K., Levashov A. V., Khmelnski Y. L., Klyachko N. L., Berezin I. V. // Science. 1982. V. 218, P. 889—891.
9. Luisi P. L. // Angew. Chem. Int. Engl. Ed. 1985. V. 24. P. 439—450.
10. Shield J. W., Ferguson H. O., Bommarlus A. S., Hatton T. A. // IEC Fundam. 1987. V. 25. P. 603—612.
11. Martinek K., Levashov A. V., Klyachko N. L., Khmelnski Y. L., Berezin I. V. // Eur. J. Biochem. 1986. V. 155. P. 453—468.
12. Мартинек К., Левашов А. В., Клячко Н. Л., Березин И. В. // Докл. АН СССР. 1977. Т. 236. С. 920—923.
13. Zulauf M., Eicke H.-F. // J. Phys. Chem. 1979. V. 83. P. 480—486.
14. Fletcher P. D. I., Howe A. M., Perrins N. M., Robinson B. H., Toprakcioglu C., Dore J. C. // Surfactants in solution. V. 2. / Eds Mittal K. L., Lindmann B. N. Y.: Plenum Press, 1984. V. 2. P. 1745—1753.
15. Ravey J. C., Buzier M. // Surfactants in solution. V. 2. / Eds Mittal K. L., Lindmann B. N. Y.: Plenum Press, 1984. V. 2 P. 1759—1779.
16. Кабанов А. В., Алазов В. Ю., Клиникий Е. Ю., Хруцкая М. М., Рахнянская А. А., Полинский А. С., Ярославов А. А., Северин Е. С., Левашов А. В., Кабанов В. А. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 302. № 3.
17. 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. С. 1479—1481.
18. Tate S. S., Meister A. // Mol. and Cell. Biochem. 1981. V. 39. P. 357—368.
19. Gardell S. J., Tate S. S. // Arch. Biochem. and Biophys. 1982. V. 216. P. 719—726.
20. Tate S. S., Khadse V. // Arch. Biochem. and Biophys. 1987. V. 255. P. 304—308.
21. Gardell S. J., Tate S. S. // J. Biol. Chem. 1979. V. 254. P. 4942—4945.
22. Gardell S. J., Tate S. S. // J. Biol. Chem. 1981. V. 256. P. 4799—4804.
23. Thompson G. A., Meister A. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1976. V. 71. P. 32—36.
24. Левашов А. В. // Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология. Т. 4. М.: ВИНТИ, 1987. С. 112—158.
25. Логинов В. А., Чернов Н. Н., Березов Т. Т. // Бюл. экспер. биол. 1980. № 7. С. 58—60.
26. Клячко Н. Л., Левашов А. В., Мартинек К. // Молекулярн. биология. 1984. Т. 18. С. 1019—1030.
27. Orlovski M. // Arch. Immun. Ther. Experim. 1965. V. 13. P. 538—541.
28. Elberling J. A., Zera R. T., Margan S. D. V., Nagasawa H. T. // Org. Prep. and Proc. Int. 1978. V. 11. P. 67—70.
29. Хмельницкий Ю. Л., Левашов А. В., Клячко Н. Л., Черняк В. Я., Мартинек К. // Биохимия. 1982. Т. 47. С. 86—99.
30. Черняк В. Я. // Физико-химические методы в молекулярной биологии. М.: Изд-во МГУ, 1978. С. 65—95.

Поступила в редакцию
30.V.1988

REGULATION OF THE SUPRAMOLECULAR STRUCTURE
AND THE CATALYTIC ACTIVITY OF γ -GLUTAMYLTRANSFERASE
IN THE REVERSED MICELLE SYSTEMS

NAMETKIN S. N., KABANOV A. V., EVTUSHENKO G. N. *, CHERNOV N. N. *,
BEREZOV T. T. *, SCHOGOLEV A. A., RYZHOVA V. V., KLYACHKO N. L., MARTINEK K. **,
LEVASHOV A. V.

Department of Chemistry, M. V. Lomonosov Moscow State University;

** P. Lumumba State University, Chair of Biochemistry, Moscow;*

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

Regulation mechanisms of the supramolecular structure and the catalytic activity of a heterodimeric enzyme, γ -glutamyltransferase, in the system of Aerosol OT (AOT) reversed micelles in octane have been studied. γ -(3-carboxy-4-nitro)-glutamic acid anilide (*L*- and *D*-isomers) and glycylglycine were used as substrates to explore the enzyme-catalyzed hydrolase, autotransferase, and transferase reactions. For all types of reactions, the catalytic activity of γ -glutamyltransferase as a function of the hydration degree has a shape of curves with three optima. The optima of the catalytic activity were detected at hydration degrees ($[H_2O]/[AOT] = 11, 17, \text{ and } 26$) when radii of the micelle's inner cavity are commensurate with the light and heavy subunits (M_r 21 000 and 54 000, respectively) of γ -glutamyltransferase as well as with the dimer (M_r 75 000). As ultracentrifugation the change in hydration degree caused a reversible dissociation of the enzyme to the light and heavy subunits. Both subunits catalyze the hydrolase and transferase reactions, whereas the autotransferase activity was detected only for the heavy subunit. Dependencies of catalytic activities of the subunits on the hydration degree have one optimum each (at $[H_2O]/[AOT] = 11$ and 17 for the light and heavy subunits, respectively). When mixing micellar solutions containing both subunits, a third optimum was detected corresponding to the dimer ($[H_2O]/[AOT] = 26$).