



УДК 577.152.232*2.04

© 1991 г.

С. Н. Наметкин, А. В. Кабанов, А. В. Левашов

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНЫХ ЦЕНТРОВ γ-ГЛУТАМИЛТРАНСФЕРАЗЫ В СИСТЕМЕ ОБРАЩЕННЫХ МИЦЕЛЛ АЭРОЗОЛЯ ОТ В ОКТАНЕ МЕТОДОМ ИНГИБИТОРНОГО АНАЛИЗА

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

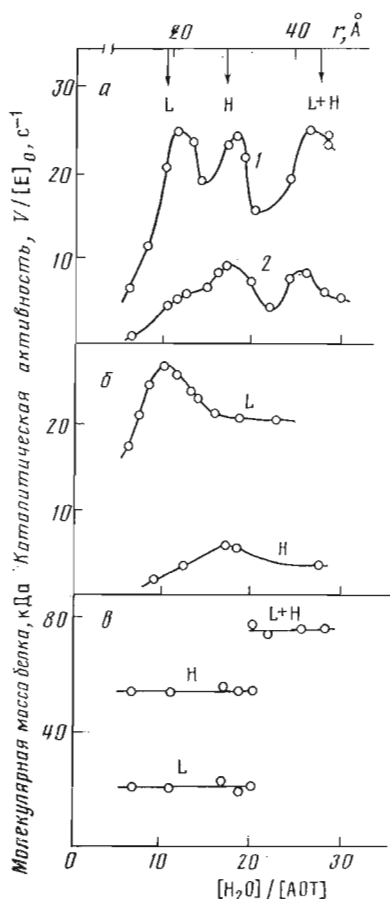
Изучена регуляция надмолекулярной структуры и каталитической активности гетеродимерного фермента — γ-глутамилтрансферазы в системе обращенных мицелл аэрозоля ОТ в октане. Установлено, что при изменении степени гидратации происходит обратимая диссоциация фермента на легкую и тяжелую субъединицы, причем обе субъединицы обладают каталитической активностью. Методом скоростной седиментации осуществлено препаративное разделение субъединиц фермента. Проведено исследование активных центров γ-глутамилтрансферазы с помощью ее необратимого ингибитора — АТ-125 (*L*-(α*S*, 5*S*)-α-амино-3-хлор-4,5-дигидро-5-изоксазолуксусная кислота). Установлено, что разделение субъединиц γ-глутамилтрансферазы в системе обращенных мицелл приводит к «раскрытию» на тяжелой субъединице активного центра, который в составе димерной формы фермента не функционирует и является недоступным действию необратимого ингибитора. Кинетические данные и данные ингибиторного анализа указывают на сходство активных центров, расположенных на легкой и тяжелой субъединицах.

Использование систем обращенных мицелл ПАВ в органических растворителях открывает новые возможности в исследовании олигомерных ферментов. При солюбилизации в таких системах ферменты включаются во внутреннюю полярную полость мицелл, сохраняя при этом каталитическую активность [1—4]. Размер внутренней полости обращенных мицелл можно варьировать в широком диапазоне, изменяя степень гидратации ПАВ (молярное отношение [вода] / [ПАВ] в системе) [4—6]. Таким образом, обращенные мицеллы ПАВ могут служить матрицами регулируемого размера для сборки белковых комплексов различного состава. Принципиальная возможность регуляции надмолекулярной структуры и каталитической активности олигомерных ферментов, солюбилизированных в обращенных мицеллах АОТ в октане, была продемонстрирована на примерах лактатдегидрогеназы [7], γ-глутамилтрансферазы [8] и щелочной фосфатазы [9].

Следует отметить, что разделение олигомерных ферментов на субъединицы *in vitro* часто наблюдается лишь в денатурирующих условиях, что существенно затрудняет возможность исследования каталитических свойств отдельных субъединиц [10]. В системах обращенных мицелл становится возможным получение субъединиц гетеродимерных ферментов в неденатурирующих условиях с последующим фракционированием белоксодержащих мицелл, например, методом скоростной седиментации [8].

Данные, представленные в настоящей работе, являются результатом продолжения исследования структуры и свойств γ-глутамилтрансферазы [8], проводимого в нашей лаборатории с использованием систем обращенных мицелл.

Принятые сокращения: ПАВ — поверхностно-активное вещество, аэрозоль ОТ (АОТ) — натриевая соль ди-2-этилгексилового эфира сульфоянтарной кислоты, АТ-125 — *L*-(α*S*, 5*S*)-α-амино-3-хлор-4,5-дигидро-5-изоксазолуксусная кислота, НА — 4-нитроанилин, СНА — 3-карбокси-4-нитроанилин, Glu(NA) — γ-(4-нитро)анилид *L*-глутаминовой кислоты, Gly(CNA) — γ-(3-карбокси-4-нитро)анилид *L*-глутаминовой кислоты.



Зависимость каталитической активности нативной (1) и обработанной АТ-125 (2) глутамилтрансферазы (а), а также ее легкой (L) и тяжелой (H) субъединиц (б) в трансферазной реакции в системе обращенных мицелл АОТ в октаноле от степени гидратации системы. Для сравнения на верхней оси рисунка «а» приведена шкала средних радиусов (r) внутренней полости обращенных мицелл; стрелками отмечены значения радиусов легкой (L) и тяжелой (H) субъединиц, а также их сумма (L + H). б — определение методом скоростной седиментации молекулярной массы солюбилизованного белка в белоксодержащих обращенных мицеллах при различных степенях гидратации ПАВ

Зависимость каталитической активности от степени гидратации. Известно, что зависимость каталитической активности ферментов от степени гидратации ПАВ, как правило, имеет колоколообразный вид [2—4], причем максимум каталитической активности обнаруживается при той степени гидратации, когда радиус внутренней полости мицелл равен радиусу белковой глобулы [3, 11, 12].

Зависимость каталитической активности γ -глутамилтрансферазы от степени гидратации системы обращенных мицелл АОТ в октаноле имеет вид кривой с тремя максимумами при $[H_2O]/[AOT] = 11, 17$ и 26 (рисунок, а, 1). Объяснение такой необычной зависимости было дано нами ранее [8]. Оно основано на том, что в системе обращенных мицелл происходит обратимая диссоциация фермента на каталитически активные субъединицы. Таким образом, наблюдаемые максимумы соответствуют функционированию легкой ($M_r 21\,000$), тяжелой ($M_r 54\,000$) субъединиц γ -глутамилтрансферазы и их комплекса (димера) ($M_r 75\,000$) [8].

Данные седиментационного анализа (рисунок, б) свидетельствуют о том, что при $[H_2O]/[AOT] > 20$ γ -глутамилтрансфераза существует только в форме димера, а при $[H_2O]/[AOT] < 20$ на седиментограмме обнаруживаются два типа содержащих белок мицелл: мицеллы с легкой (L) и тяжелой (H) субъединицами.

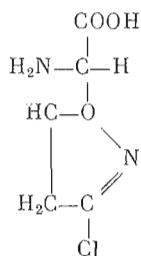
Значительное различие в коэффициентах седиментации этих двух типов мицелл позволяет провести препаративное разделение легкой и тяжелой субъединиц γ -глутамилтрансферазы с помощью скоростной седиментации. Данные электрофореза показывают, что осадок содержит исключительно тяжелую субъединицу, а в супернатанте содержится в основном легкая субъединица и небольшое количество (не более 5 вес.%) тяжелой.

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 (рисунок, б). В случае легкой субъединицы (L) оптимум каталитической активности обнаруживается при степени гидратации 11, в случае тяжелой (H) — при степени гидратации 17. При смешении же мицеллярных растворов, содержащих легкую и тяжелую субъединицы, на кривой зависимости каталитической активности от степени гидратации появляется третий максимум при $[H_2O]/[AOT] = 26$ (на рисунке не показано), соответствующий димеру, т. е. происходит реконструкция олигомерной формы фермента с профилем активности, аналогичным приведенному на рисунке а.

Ингибиторный анализ γ -глутамилтрансферазы. Полагают [13, 14], что активный центр γ -глутамилтрансферазы содержит по крайней мере три различных участка: донорный и два акцепторных, локализация этих участков не до конца ясна. Считают [15, 16], однако, что донорный участок расположен на легкой субъединице фермента, а в формировании акцепторных участвуют как легкая, так и тяжелая субъединицы, причем каталитической активностью обладает только легкая субъединица.

Полученные нами данные не согласуются с такой точкой зрения. Тот факт, что обе субъединицы обладают каталитической активностью, в частности в трансферазной реакции (рисунок, б), заставляет предположить наличие *L* (*D*)- γ -глутамилсвязывающих и глициновых акцепторных участков как на легкой, так и на тяжелой субъединицах. Для того чтобы убедиться в существовании нескольких каталитических участков в молекуле γ -глутамилтрансферазы, мы провели ингибиторный анализ с использованием специфического необратимого ингибитора АТ-125 [17, 18] следующей структуры:



Использованные схемы ингибирования приведены в таблице.

Прежде всего отметим, что солюбилизация фермента в системе обращенных мицелл и его выделение из этой системы (в условиях эксперимента) не приводят к необратимой потере каталитической активности фермента (таблица, схема А).

После обработки водного раствора препарата фермента необратимым ингибитором и отделения от избытка последнего гель-фильтрацией трансферазная активность (в водном растворе) не обнаруживается (таблица, схема Б, стадия 2). Однако после солюбилизации в системе обращенных мицелл в условиях $[H_2O]/[AOT] = 17$, когда происходит диссоциация γ -глутамилтрансферазы на субъединицы (рисунок, в), ее активность частично восстанавливается (до 40%, таблица, схема Б, стадия 3). Отметим, что на кривой зависимости каталитической активности этого препарата фермента от степени гидратации исчезает первый максимум, соответствующий активности легкой субъединицы (рисунок, а, 2).

Чтобы убедиться, что проявляемая активность обусловлена функционированием именно тяжелой субъединицы фермента, мы провели разделение субъединиц γ -глутамилтрансферазы, предварительно обработанной ингибитором АТ-125, в системе обращенных мицелл методом скоростной седиментации. Действительно, каталитическая активность обнаруживалась исключительно в осадке, содержащем тяжелую субъединицу, тогда как в супернатанте, содержащем только легкую субъединицу, активность не обнаруживалась.

После осаждения белка из мицеллярной системы ацетоном с последующим переводом его в водный раствор (таблица, схема Б, стадия 5) частично проявившаяся каталитическая активность фермента сохраняется. Можно

щееся появлением каталитической активности у тяжелой субъединицы γ -глутамилтрансферазы. То обстоятельство, что обработка тяжелой субъединицы АТ-125 приводит к ее необратимой инактивации, а также данные по ее каталитической активности (см. также [8]) указывают на сходство активных центров, расположенных на обеих субъединицах.

Авторы глубоко признательны проф. Н. Н. Чернову (Университет дружбы народов им. П. Лумумбы), любезно предоставившему препарат АТ-125.

Экспериментальная часть

γ -Глутамилтрансферазу (КФ 2.3.2.2) выделяли из перевивной низкодифференцированной гепатомы Г-27 по методике, включающей в себя солюбилизацию фермента папаином [19]. Метод очистки фермента включал следующие стадии: солюбилизацию фермента из мембран свежeweыделенных 20-дневных гепатом смесью луброла (Sigma, США) и дезоксихолата натрия (Serva, ФРГ) (2 ч, 20° С), фракционирование раствора γ -глутамилтрансферазы сульфатом аммония, обработку раствора фермента папаином, фракционирование сульфатом аммония и гель-фильтрацию 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 ед./мг (единица соответствует активности, при которой за 1 мин гидролизует 1 мкмоль Glu(NA) при 8,5 и 25° С). Концентрацию белка в полученных ферментных препаратах определяли по методу Бредфорд [20].

Каталитическая активность γ -глутамилтрансферазы в системе обращенных мицелл [8]. В 2 мл 0,1 М раствора АОТ (Merck) в октane солюбилизировали 10 мкл 1 мкМ γ -глутамилтрансферазы и 10—120 мкл 0,5—50 мМ Glu(CNA) (Sigma) в 25 мМ трис-HCl-буфере (pH 8,8). При измерении скорости трансферазной реакции солюбилизируемые водные растворы содержали 0,1 М глицилглицин.

Скорость реакции образования CNA определяли спектрофотометрически при 400 нм и 25° С. Использовали спектрофотометр Beckman 25 (США) с термостатируемым кюветным отделением (в независимом эксперименте измеряли коэффициенты молярного поглощения CNA в системе обращенных мицелл АОТ при различных степенях гидратации и концентрациях ПАВ).

Значения $V/[E]_0$ определяли в условиях насыщения фермента субстратами: Gly(CNA) и Gly-Gly (трансферазная реакция). В работе анализируют pH-независимые кинетические параметры.

Коэффициенты седиментации пустых и содержащих белок обращенных мицелл определяли как описано в работе [8].

Разделение легкой и тяжелой субъединиц γ -глутамилтрансферазы. В 25 мл 0,1 М раствора АОТ в октane солюбилизировали 225 мкл 4 мкМ раствора фермента 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 солюбилизировали в 10 мл 0,1 М АОТ в октane.

Ингибирование γ -глутамилтрансферазы. К 0,3—3 мл ($1,4 \cdot 10^{-5}$ М раствора фермента в 25 мМ трис-HCl-буфере (pH 7,6) добавляли 10—150 мкл $5,6 \cdot 10^{-3}$ М раствора АТ-125 (10—20-кратный избыток); инкубировали не менее 2 ч. Фермент отделяли от несвязанного ингибитора гель-фильтрацией на биогеле Р-2. К 60 мкл $2,3 \cdot 10^{-5}$ М раствора обработанной ингибитором γ -глутамилтрансферазы добавляли 60 мкл 0,1 М раствора Gly(CNA) и 72 мкл 50 мМ раствора Gly-Gly в 50 мМ трис-HCl-буфере (pH 8,8), инкубировали не менее 2 ч и солюбилизировали в 6 мл 0,1 М раствора АОТ (конечное соотношение $[H_2O]/[AOT] = 17$). Фермент осаждали ацетоном и высушивали в вакууме. Ацетоновый порошок растворяли в 0,1 М трис-HCl-буфере (pH 8,2), диализом отделяли примеси субстратов, фермент повторно обрабатывали 10-кратным избытком ингибитора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мартинек К., Левашов А. В., Клячко Н. Л., Березин И. В. // Докл. АН СССР. 1977. Т. 236. № 4. С. 920—923.
2. Luisi P. L., Magid L. J. // Crit. Rev. Biochem. (CRC). 1986. V. 20. P. 409—474.
3. Martinek K., Klyachko N. L., Kabanov A. V., Khmel'nitsky Yu. L., Levashov A. V. // Biochim. et biophys. acta. 1989. V. 981. P. 161—172.
4. Structure and Reactivity in Reverse Micelles / Ed. Pileni M. P. Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo: Elsevier, 1989.
5. Zulauf M., Eicke H. F. // J. Phys. Chem. 1979. V. 83. P. 480—486.
6. 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. P. 1745—1753.
7. 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. № 6. С. 1479—1481.
8. Наметкин С. Н., Кабанов А. В., Евтушенко Г. Н., Чернов Н. Н., Березов Т. Т., Щеголев А. А., Рыжова В. В., Клячко Н. Л., Мартинек К., Левашов А. В. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 1. С. 70—77.
9. Наметкин С. Н., Кабанов А. В., Клячко Н. Л., Левашов А. В. // Биоорган. химия. 1991. Т. 17. № 5. С. 606—609.
10. Муронец В. И., Наградова Н. К. Имобилизованные олигомерные ферменты. М.: Наука, 1984. 208 с.
11. Левашов А. В. // Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология. Т. 4. М.: ВИНТИ, 1987. С. 112—158.
12. Клячко Н. Л., Пшежецкий А. В., Кабанов А. В., Вакула С. В., Мартинек К., Левашов А. В. // Бюл. мембраны. 1990. Т. 7. № 5. С. 467—472.
13. Березов Т. Т., Чернов Н. Н. // Вестн. АМН СССР, 1986. № 8. С. 68—76.
14. Tate S. S., Meister A. // Mol. and Cell Biochem. 1981. V. 39. P. 357—368.
15. Gardell S. J., Tate S. S. // Arch. Biochem. and Biophys. 1982. V. 216. № 2. P. 719—726.
16. Tate S. S., Khadse V. // Arch. Biochem. and Biophys. 1987. V. 255. № 2. P. 304—308.
17. Reed D. J., Ellis W. W., Meck R. A. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1980. V. 94. P. 1273—1277.
18. Schasteen C. S., Curtoys N. P., Reed D. J. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1983. V. 112. № 2. P. 564—570.
19. Логинов В. А., Чернов Н. Н., Березов Т. Т. // Бюл. экспер. биол. 1980. № 7. С. 58—60.
20. Bradford M. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. № 1. P. 248—254.

Поступила в редакцию
12.XII.1990

S. N. NAMETKIN, A. V. KABANOV, A. V. LEVASHOV

THE STUDY OF ACTIVE SITES OF γ -GLUTAMYLTRANSFERASE IN THE SYSTEM OF AEROSOL OT REVERSED MICELLES IN OCTANE BY THE INHIBITOR METHOD

Department of Chemical Enzymology, M. V. Lomonosov Moscow State University

Regulation of the supramolecular structure and catalytic activity of the heterodimeric enzyme γ -glutamyltransferase in the system of Aerosol OT reversed micelles in octane was studied. Variation of the hydration degree causes a reversible dissociation of the enzyme to the light and heavy subunits, both possessing the catalytic activity. The subunits were separated on the preparative scale in the reversed micelle system using ultracentrifugation. The active centres of γ -glutamyltransferase were studied using the enzyme's irreversible inhibitor AT-125 (L -(α S, 5S)- α -amino-3-chloro-4,5-dihydro-5-isoxazoleacetic acid). It is shown that the separation of the γ -glutamyltransferase subunits results in «opening» of a new active centre in the heavy subunit, whereas in the enzyme's dimeric form this centre is masked and not accessible to the inhibitor's molecule. The kinetic and inhibitor analysis data indicate that the active centres in the light and heavy subunits are similar.