



УДК 577.152.342.1*1.03

© 1991 г.

*С. Н. Наметкин, А. В. Кабанов, Н. Л. Клячко,
А. В. Левашов*

ИСКУССТВЕННАЯ ОЛИГОМЕРИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ.— НОВЫЙ ПУТЬ К РЕГУЛЯЦИИ ИХ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ В СИСТЕМАХ ОБРАЩЕННЫХ МИЦЕЛЛ

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

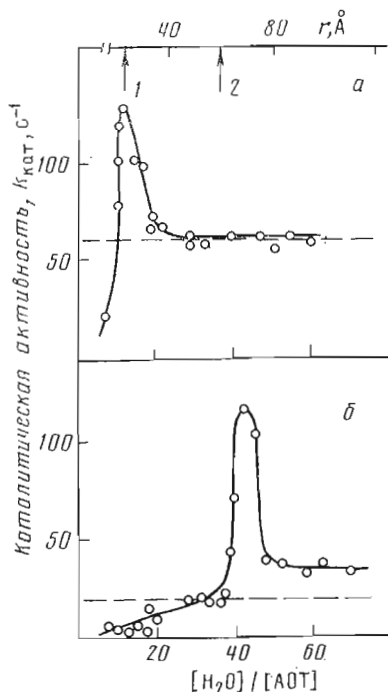
Проведено сравнительное изучение регуляции каталитической активности нативного α -химотрипсина и его искусственной олигомерной формы (гексамера) в системе обращенных мицелл аэрозоля ОТ (АОТ) в октане. С помощью сукцинимидил-3-(2-пиридилглюпропионата) осуществлена ковалентная сшивка молекул мономерного фермента. Полученный конъюгат (M_{150} кДа), соответствующий гексамеру α -химотрипсина, исследован в качестве примера недиссоциирующего олигомерного фермента. Нативный (мономерный) α -химотрипсин проявляет максимальную каталитическую активность в системе обращенных мицелл АОТ в октане при степени гидратации $w_0 \sim 10,0$, т. е. в условиях, когда радиус внутренней полости мицелл равен радиусу молекулы фермента. Для гексамера α -химотрипсина оптимальная каталитическая активность наблюдается при $w_0 \sim 45$. В этих условиях радиус внутренней полости мицелл ($r_e = 68-69 \text{ \AA}$) приблизительно равен радиусу сферы, описывающей правильный октаэдр из шести мономерных молекул белка ($r_{\text{окт}} \sim 61 \text{ \AA}$). Таким образом, можно целенаправленно конструировать соответствующие олигомерные структуры ферментов с тем, чтобы они проявляли оптимальную каталитическую активность в заданной области степеней гидратации.

При солюбилизации в системах обращенных мицелл фермент включается в их внутреннюю водную полость, сохраняя при этом каталитическую активность [1—4]. Размер внутренней полости мицелл можно варьировать в широком диапазоне (от десятка до сотен и более ангстрем), изменяя степень гидратации ПАВ (молярное отношение [вода]/[ПАВ]) в системе, w_0) [5—7].

Одно из наиболее характерных явлений, обнаруживаемых при изучении катализа ферментами в системах обращенных мицелл, — зависимость каталитической активности от степени гидратации (см., например, обзоры [2—4]). К настоящему времени эти зависимости изучены почти для 20 ферментов, причем, несмотря на значительное разнообразие исследованных ферментных систем, наблюдаемые зависимости, как правило, имеют колоколообразный вид [2—4]. Положение оптимума зависимости строго индивидуально для каждого фермента, поскольку максимум каталитической активности обнаруживается при той степени гидратации, когда радиус внутренней полости мицелл равен радиусу белковой глобулы [3, 8, 9]. Таким образом, активность фермента в системе обращенных мицелл регулируется геометрией мицеллярной матрицы. Задача настоящей работы состоит в том, чтобы показать возможность регуляции положения оптимума каталитической активности путем изменения геометрии не матрицы, а самого фермента (например, в результате его искусственной олигомеризации). Объектом нашего исследования явился фермент α -химотрипсин (далее — химотрипсин) в системе обращенных мицелл АОТ в октане.

Использованные сокращения: ПАВ — поверхностно-активное вещество, аэрозоль ОТ (АОТ) — натриевая соль ди-2-этилгексилдолового эфира сульфоянтарной кислоты.

Зависимость каталитической активности нативного (а) и олигомерного (сшитого) (б) химотрипсина от степени гидратации в системе обращенных мицелл АОТ в октаноле. Штриховой линией показаны значения каталитической активности ферментов в водном растворе, измеренные в условиях рН-оптимумов реакций. Для сравнения приведена шкала средних радиусов (r) внутренней полости обращенных мицелл [8]. Стрелками отмечены радиус глобулы нативного химотрипсина (1) и радиус сферы, описывающей октаэдр из шести молекул фермента (2)



Сравнение закономерностей регуляции каталитической активности мономерной и искусственно полученной гексамерной формы химотрипсина в системе обращенных мицелл. На рисунке приведены данные по влиянию степени гидратации на каталитическую активность химотрипсина и его гексамерной формы в системе обращенных мицелл. Для нативного фермента (рисунок, а) оптимум каталитической активности наблюдается при $w_0 \sim 10,0$, в условиях, когда радиус внутренней полости мицелл равен радиусу молекулы химотрипсина. В отличие от нативного фермента конъюгат проявляет максимальную активность при существенно более высоком значении $w_0 \sim 45$ (рисунок, б). В этих условиях радиус внутренней полости мицелл ($r_e = 68-69 \text{ \AA}$) соответствует радиусу сферы, описывающей правильный октаэдр из шести мономерных молекул белка ($r_{\text{окт}} \sim 61 \text{ \AA}$). (Небольшые различия в значениях этих радиусов, вероятно, связаны с тем, что упаковка белковых глобул в полученном гексамере отличается от идеальной октаэдрической, а также с тем, что молекулы химотрипсина не контактируют непосредственно друг с другом, а соединены через относительно длинные ножки.)

Таким образом, мы показали возможность регулировать положение оптимума зависимости каталитической активности фермента от степени гидратации в системе обращенных мицелл путем искусственной олигомеризации.

Экспериментальная часть

α -Химотрипсин (КФ 3.4.21.1) из поджелудочной железы быка (Sigma, США) использовали без дополнительной очистки. По данным титрования активных центров *N*-транс-циннамолимидазолом (Sigma) по методике [10], содержание активного фермента в препарате составляло 50%.

Аэрозоль ОТ (Мерск, ФРГ) использовали без дополнительной очистки. Методом ИК-спектроскопии [11] установлено, что в этом препарате содержалось 0,5 моль воды на 1 моль АОТ.

n-Нитрофениловый эфир *N*-бензилоксикарбонил-*L*-тирозина — производства ВДН (Англия). Остальные использованные в работе реактивы были отечественного производства.

Синтез конъюгата химотрипсина. 50 мг химотрипсина (2 мкмоль) растворили в 1 мл буфера (0,2 М H_3BO_3 , 0,1 М Na_2PO_4 , 0,1 М NaCl , рН 7,4), содержащего 0,05 М ацетилфенилаланин (буфер А). К раствору

добавили 2,5 мг сукцинимидил-3-(2-пиридилтиопропionato), растворенного в 150 мкл этилового спирта (4-кратный избыток). Через 1 ч отобрали половину раствора фермента и отделили непрореагировавший модифицирующий агент гель-фильтрацией на сефадексе G-10. В полученном препарате определяли степень модификации фермента: к аликвоте раствора в спектрофотометрической кювете добавляли избыток дитиотрепта и наблюдали резкое возрастание оптической плотности на длине волны 343 нм, обусловленное образованием пиридин-2-тиола ($\epsilon_{343} = 8,08 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Концентрация последнего эквивалентна концентрации 2-пиридилсульфидных остатков в ферменте. Степень модификации полученного препарата химотрипсина составляла 1,8.

Вторую половину раствора модифицированного химотрипсина подкислили до pH 4,7 (для предотвращения восстановления собственных S—S-связей фермента) и добавили 12,4 мг дитиотрепта (200-кратный избыток по отношению к модифицирующему агенту). Через 0,5 ч модифицированный фермент с восстановленными S—S-связями отделили гель-фильтрацией на сефадексе G-10, сконцентрировали до 700 мкл и добавили к первой части раствора химотрипсина (которую также предварительно сконцентрировали до 700 мкл). Реакционную систему оставили на 20 ч для сшивания (условия — буфер А, 25° С). Полученный конъюгат обес-соливали гель-фильтрацией на сефадексе G-10 и лиофилизовали. Далее конъюгат был подвергнут фракционированию на Topearl HW-55. Была выделена узкая фракция конъюгата (20 вес. % от общего количества) с молекулярной массой, по данным электрофореза в полнакриламидном геле, около 150 кДа, что соответствует гексамеру химотрипсина (M 25 кДа).

Определение каталитической активности химотрипсина и его конъюгата в системе обращенных мицелл проводили по стандартной методике [11]. В 1 мл раствора 0,1 М АОТ в октане солиubilizировали 5—130 мкл 0,025 М трис-НСI-карбонатного буфера, 5 мкл 85 мМ раствора Z-Тур-ОНр в ацетонитриле и 2 мкл 10—30 мМ раствора фермента в 1 мМ НСI.

В качестве параметра, характеризующего каталитическую активность нативного и олигомерного химотрипсина, мы использовали каталитическую константу ($k_{\text{кат}}$, с^{-1}). Эту величину определяли как максимальную скорость реакции (измеренную в условиях насыщения фермента субстратом), деленную на величину общей концентрации активных центров фермента в системе. В работе анализируются pH-оптимальные значения $k_{\text{кат}}$.

Скорость реакции образования *n*-нитрофенолят-иона определяли спектрофотометрически при 400 нм и 25° С. (В независимом эксперименте измеряли коэффициенты молярного поглощения *n*-нитрофенолят-иона в системе обращенных мицелл при различных значениях pH и степенях гидратации.) Использовали спектрофотометр Beckman 25 (США) с термостатируемым кюветным отделением.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мартинек К., Левашов А. В., Клячко Н. Л., Березин И. В. // Докл. АН СССР. 1977. Т. 236. С. 920—923.
2. Structure and Reactivity in Revers Micelles / Ed. Pileni M. P. Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo: Elsevier, 1989.
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. Luisi P. L., Magid L. J. // CRC Crit. Rev. Biochem. 1986. V. 20. P. 409—474.
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., Topracchioglu C., Dore J. C. // Surfactants in Solution. V. 2 / Eds Mittal K. L., Lindmann B. N. Y.: Plenum Press, 1984. P. 1745—1753.
7. Ravey J. C., Buzier M. // Surfactants in Solution. V. 2 / Eds Mittal K. L., Lindmann B. N. Y.: Plenum Press, 1984. P. 1759—1779.
8. Левашов А. В. // Итоги науки и техники. Сер. «Биотехнология». Т. 4. М.: ВИНТИ, 1987. С. 112—158.
9. Клячко Н. Л., Пшежецкий А. В., Кабанов А. В., Вакула С. В., Мартинек К., Левашов А. В. // Бпол. мембраны. 1990. Т. 7. С. 467—472.
10. Schonbaum G. R., Zerner B., Bender M. L. // J. Biol. Chem. 1961. V. 236. P. 2930—2935.

11. Клячко Н. Л., Левашов А. В., Мартинек К. // Молекулярн. биология. 1984. Т. 18. С. 1019—1030.

Поступила в редакцию
18.X.1990

S. N. NAMETKIN, A. V. KABANOV, N. L. KLYACHKO, A. V. LEVASHOV
**ARTIFICIAL OLIGOMERIZATION OF ENZYMES — A NEW APPROACH
TO THE CATALYTIC ACTIVITY REGULATION IN REVERSED MICELLES**

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

Comparative studies were carried out in the catalytic activity regulation of native α -chymotrypsin and its artificially produced hexameric form as an example of non-dissociating oligomeric enzyme (covalently cross-linked by means of succinimidyl-3-(2-pyridylthiopropionate)) in the Aerosol OT reversed micelles in octane. Native (monomeric) α -chymotrypsin exhibits maximal catalytic activity in the reversed micelles at the hydration degree $w_0 = 10$, when the radius of the micelle inner cavity is equal to the radius of the α -chymotrypsin globule. For the α -chymotrypsin hexamer, optimum is observed at $w_0 = 45$, with the inner micellar cavity radius ($r = 68 \text{ \AA}$) being approximately equal to the radius of the sphere surrounding the octahedral combination of the six monomeric α -chymotrypsin molecules ($r = 61 \text{ \AA}$). Thus, construction of the corresponding oligomeric structures is made easy, with the optimal catalytic activity in a preset range of the hydration degrees.