



УДК 577.152.342\*11.03 : 577.112.853.088

© 1994 Р. В. Рарий, Н. Л. Клячко,  
К. Мартинек\*, А. В. Левашов

### ГЛИКОЗИЛИРОВАННЫЙ $\alpha$ -ХИМОТРИПСИН В СИСТЕМАХ ОБРАЩЕННЫХ МИЦЕЛЛ АЭРОЗОЛЯ ОТ В ОКТАНЕ КАК МОДЕЛЬ В ИЗУЧЕНИИ РОЛИ УГЛЕВОДНЫХ ФРАГМЕНТОВ В ГЛИКОПРОТЕИНАХ

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, кафедра  
химической энзимологии химического факультета, Москва;

\* Институт органической химии и биохимии  
АН Чешской Республики, Прага

Ключевые слова:  $\alpha$ -химотрипсин, гликозилирование, катализ, об-  
ращенные мицеллы, олигомеризация, мембранотропность.

Для изучения влияния углеводов фрагментов на олигомерный состав и мембраноактивность гликопротеинов предпринято сравнительное исследование хорошо изученного негликозилированного фермента  $\alpha$ -химотрипсина и его искусственно гликозилированного производного, полученного путем химической модификации белка *D*-глюкозаминном. В качестве среды для ферментативных реакций была использована микрогетерогенная система обращенных мицелл Аэрозоля ОТ в октаноле, моделирующая биомембранное окружение ферментов *in vivo*. Показано, что гликозилирование  $\alpha$ -химотрипсина придает ему способность к олигомеризации и мембранотропность (способность к взаимодействию с мицеллярной матрицей).

Интерес к гликопротеинам значительно возрос в последние годы в связи с установлением ключевой роли этих макромолекул в процессах, протекающих в живых организмах [1]. Показано, что гликопротеины участвуют в связывании различных биорегуляторов на поверхности клеток, в межклеточных взаимодействиях, в транспорте и циркуляции макромолекул [2, 3].

Особенности поведения гликопротеинов обусловлены наличием на их поверхности углеводов фрагментов. Известно [3], что именно благодаря олигосахаридным фрагментам гликопротеины проявляют способность к олигомеризации; гликозилирование необходимо белкам для взаимодействия с биомембраной и стабильности образуемого комплекса. Для изучения влияния углеводов фрагментов на свойства гликопротеинов в настоящее время используются три общих подхода:

1) сравнение свойств природных гликозилированных и негликозилированных форм белка;

Используемые сокращения: ПАВ — поверхностно-активное вещество; АОТ, Аэрозоль ОТ — натриевая соль ди-(2-этил)гексилевого эфира сульфогантарной кислоты; ХТ —  $\alpha$ -химотрипсин; гХТ — гликозилированный  $\alpha$ -химотрипсин, DMSO — диметилсульфоксид, DMFA — диметилформамид.

2) изучение влияния ферментативного или химического удаления олигосахаридов с поверхности гликопротеина на свойства белка;

3) генно-инженерное получение негликозилированных белков с использованием ингибиторов процесса гликозилирования в клетке или клетках, в которых нет механизма гликозилирования [2].

Использование первого подхода для изучения влияния углеводных фрагментов на свойства гликопротеинов ограничено, так как известно довольно небольшое число природных пар гликозилированный — негликозилированный белок [4].

При ферментативном или химическом удалении олигосахаридов с поверхности гликопротеина нельзя быть полностью уверенным в том, что белковая часть остается без изменений (как на первичном, так и на более высоких уровнях организации). Следовательно, результаты эксперимента по сравнению свойств природного гликопротеина и его искусственно дегликозилированного аналога допускают неоднозначную их интерпретацию.

Различия в поведении генно-инженерного негликозилированного белка и природного гликопротеина также могут быть обусловлены не только наличием или отсутствием углеводного фрагмента, но и изменениями в структуре белковой части макромолекулы.

Таким образом, то обстоятельство, что гликопротеины представляют собой сложные биополимерные структуры, делает чрезвычайно трудоемким и трудно интерпретируемым исследование функционирования природных гликопротеинов с целью выяснения роли их углеводных фрагментов. Для решения этой задачи необходим новый подход, иной путь исследования, позволяющий при изучении сложного объекта в полной мере опираться на имеющиеся знания о составляющих его частях. В этой связи для изучения влияния углеводных фрагментов на свойства связанного с ними белка многообещающим кажется использование предложенного нами подхода, суть которого состоит в получении искусственно гликозилированного белка, моделирующего свойства природного гликопротеина, методом химической модификации природного негликозилированного белка.

Так, при искусственном гликозилировании мы имеем возможность не только контролировать и варьировать количество и локализацию углеводов, но и задавать их структуру на стадии синтеза. При таком подходе всегда есть контроль — исходный негликозилированный белок. Это позволяет изучать влияние углеводов «в чистом виде».

В данной работе нами использован хорошо изученный негликозилированный фермент —  $\alpha$ -химотрипсин; путем химической модификации белка *D*-глюкозаминном получен его гликозилированный аналог.

В качестве среды для ферментативных реакций использована микрогетерогенная система обращенных мицелл Аэрозоля ОТ (структурного аналога липидов) в октане, моделирующая биомембранное окружение ферментов *in vivo*. Анализ каталитических констант ферментов, изучаемых в системе Аэрозоль ОТ — вода — октан, позволяет выявлять изменения в их надмолекулярной структуре.

*Зависимость каталитической активности нативного и искусственно гликозилированного  $\alpha$ -химотрипсина от степени гидратации ПАВ*

Зависимости констант скорости гидролиза ( $k_2$ ) *n*-нитроанилида *N*-ацетил-*L*-тирозина, катализируемого  $\alpha$ -химотрипсином и гликозилированным  $\alpha$ -химотрипсином (скоростьлимитирующая стадия — ацилирование), в системе обращенных мицелл АОТ в октане от степени гидратации ПАВ приведены на рис. 1. Для нативного  $\alpha$ -химотрипсина наблюдается классическая колоколообразная зависимость (рис. 1а). Положение оптимума ( $m_0 = [H_2O] / [АОТ] = 10$ ) отвечает геометрическому соответствию размеров белка и внутренней полости мицеллы (концепция «геометрического соответствия») [5, 6].

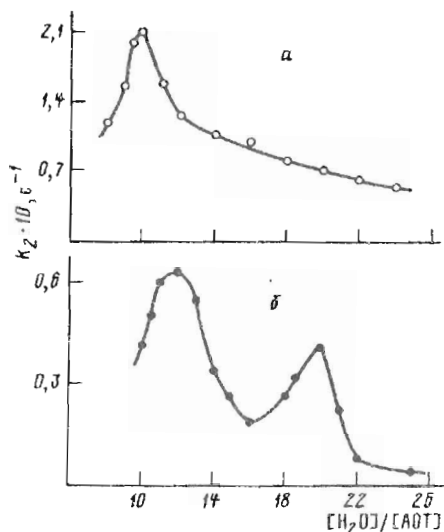


Рис. 1

Рис. 1. Зависимости каталитических констант гидролиза *p*-нитроанилида *N*-ацетил-*L*-тирозина, катализируемого  $\alpha$ -химотрипсином (а) или гликозилированным  $\alpha$ -химотрипсином (б), в системе АОТ — вода — октан от степени гидратации ПАВ. Условия эксперимента: [АОТ] 0,1 М; 50 мМ трис-НСl-буфер, рН 8,5; [ХТ] 0,14 мкМ; [гХТ] 0,25 мкМ

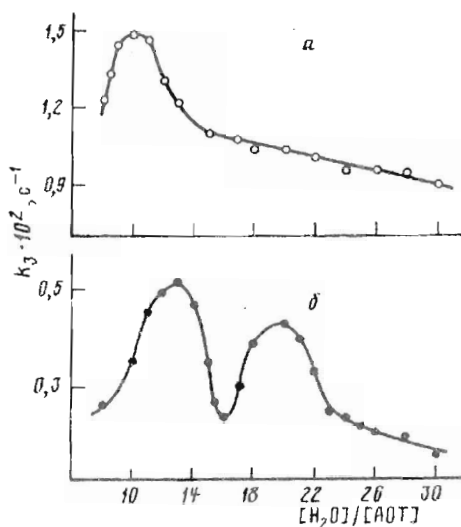


Рис. 2

Рис. 2. Зависимости каталитических констант гидролиза *N*-транс-циннамоилимидазола, катализируемого  $\alpha$ -химотрипсином (а) или гликозилированным  $\alpha$ -химотрипсином (б), в системе АОТ — вода — октан от степени гидратации ПАВ. Условия эксперимента: [АОТ] 0,2 М; 50 мМ трис-НСl-буфер, рН 8,0; [ХТ] 2,4 мкМ; [гХТ] 0,9 мкМ

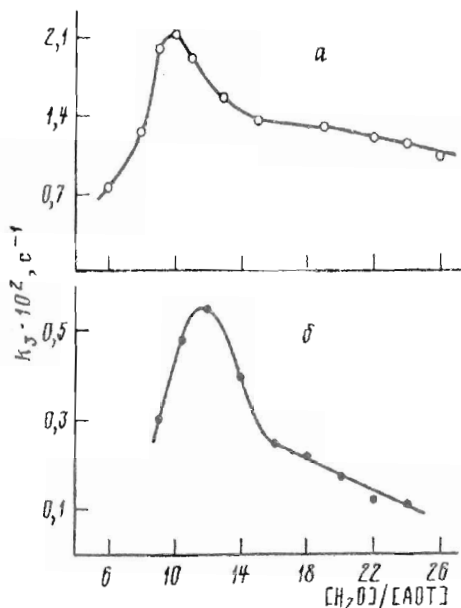


Рис. 3

Рис. 3. Зависимости каталитических констант гидролиза *N*-транс-циннамоилимидазола, катализируемого  $\alpha$ -химотрипсином (а) или гликозилированным  $\alpha$ -химотрипсином (б), в системе АОТ — 1 М глюкоза в воде — октан от степени гидратации ПАВ. Условия эксперимента: [АОТ] 0,2 М; 1 М глюкоза в 50 мМ трис-НСl-буфере, рН 8,0; [ХТ] 2,4 мкМ; [гХТ] 2,0 мкМ

Математический аппарат этой концепции позволяет, в принципе, предсказать для фермента с известной молекулярной массой величину степени гидратации обращенных мицелл АОТ, при которой можно ожидать проявления максимальной каталитической активности. И наоборот, можно оценить неизвестную молекулярную массу белка по величине наблюдаемой оптимальной степени гидратации [5—7].

Для гликозилированного  $\alpha$ -химотрипсина вид зависимости изменяется принципиальным образом (рис. 1б). Наблюдаются два максимума при степенях гидратации АОТ 12 и 20. Можно предположить, что первый оптимум соответствует функционированию мономерной формы гликозилированного фермента, а второй — олигомерной. Из рис. 1 видно, что значения оптимальной степени гидратации

для нативного  $\alpha$ -химотрипсина и мономерной формы гликозилированного фермента различаются на две единицы, что соответствует увеличению радиуса внутренней полости мицеллы на 3 Å ( $r = 1,5w_0 + 4$ , где  $r$  — радиус внутренней полости мицеллы [7]). Этот факт отражает, по-видимому, увеличение радиуса модифицированного белка, что находится в хорошем соответствии с размером молекулы *D*-глюкозамина [8].

В рамках концепции «геометрического соответствия» появление оптимума, соответствующего функционированию димера гликозилированного  $\alpha$ -химотрипсина, можно ожидать в интервале  $w_0$  от 14,5 (при аппроксимации димера шариком с массой 50 кДа и радиусом 28 Å) до 27 (два жестких шарика с массой 25 кДа каждый, радиус сферы, описываемой вокруг них, 44 Å). Экспериментально обнаруженное значение  $w_0$  попадает в этот интервал.

Для того чтобы убедиться в независимости обнаруженного эффекта от природы субстрата, нами был использован другой субстрат, *N-транс*-циннамоилимидазол, для которого скоростылимитирующей стадией является дезацилирование.

Зависимости констант скорости гидролиза ( $k_3$ ) *N-транс*-циннамоилимидазола, катализируемого  $\alpha$ -химотрипсином и его гликозилированным производным в системе обращенных мицелл АОТ от степени гидратации ПАВ, представлены на рис. 2. Сравнивая характер зависимостей, приведенных на рис. 1 и 2, легко заметить, что они имеют аналогичный вид.

Из литературы известно [3], что именно благодаря углеводным фрагментам гликопротеины проявляют способность к олигомеризации, но молекулярные причины этого явления до сих пор не изучены. Чтобы убедиться в том, что способность к олигомеризации у гликозилированного  $\alpha$ -химотрипсина появилась благодаря наличию на его поверхности *D*-глюкозамина, мы ввели в систему низкомолекулярный сахар — *D*-глюкозу. *D*-Глюкоза, по нашему мнению, должна разрушить нековалентные связи, существующие в димере, что, в свою очередь, должно привести к диссоциации димера на мономеры.

Зависимости констант скорости гидролиза ( $k_3$ ) *N-транс*-циннамоилимидазола, катализируемого  $\alpha$ -химотрипсином и гликозилированным  $\alpha$ -химотрипсином, от степени гидратации ПАВ в системе обращенных мицелл, содержащих 1 М глюкозу, приведены на рис. 3. Необходимо отметить, что оптимум, соответствующий функционированию мономерной формы нативного и гликозилированного ферментов, сохранился и в том, и в другом случаях. Оптимум же, соответствующий функционированию димера гликозилированного  $\alpha$ -химотрипсина, в присутствии глюкозы исчезает.

Таким образом, введение в систему низкомолекулярного сахара — инструмент регуляции надмолекулярной структуры гликозилированного  $\alpha$ -химотрипсина.

### Седиментационный анализ белоксодержащих мицелл

Результаты седиментационного анализа, позволяющего [9] независимым физическим методом определять массу белка, включенного в мицеллу, приведены в таблице. Видно, что в условиях эксперимента (при концентрациях белка 2—5 мкМ) нативный  $\alpha$ -химотрипсин включается в мицеллу в виде мономера при малых и больших степенях гидратации ( $w_0 = 10, 20, 25$ ). Гликозилированный  $\alpha$ -химотрипсин при  $w_0 = 12$  также функционирует в мицелле в виде мономера. Однако при  $w_0 = 20$ , где, согласно теоретическим расчетам, в одну мицеллу может включаться димер, в системе действительно наряду с мономером обнаруживаются частицы, молекулярная масса которых соответствует димеру молекулы гликозилированного  $\alpha$ -химотрипсина.

Полученные данные, таким образом, подтверждают высказанное предположение о существовании при  $w_0 = 20$  димерной формы гликозилированного  $\alpha$ -химотрипсина (см. рис. 1б, 2б).

Результаты седиментационного анализа

Степень гидратации АОТ	Белок	Олигомерный состав
10	$\alpha$ -Химотрипсин	Мономер
20	»	»
25	»	»
12	Гликозилированный $\alpha$ -химотрипсин	»
20	То же	Мономер + димер
25	»	То же
20 (Глюкозосодержащие мицеллы)	»	Мономер

Данные седиментационного эксперимента подтверждают также наше предположение, что нивелирование второго оптимума на зависимости каталитической активности гликозилированного  $\alpha$ -химотрипсина от степени гидратации (рис. 3), происходящее при введении в систему низкомолекулярного сахара, действительно обусловлено диссоциацией димера белка на мономеры.

*Зависимость каталитической активности нативного и искусственно гликозилированного  $\alpha$ -химотрипсина от концентрации ПАВ*

Зависимость  $k_{\text{кат,набл}}$  от концентрации АОТ является критерием способности белка взаимодействовать с мембраной [5, 6]. Мембраноактивный белок, взаимодействуя с молекулами воды и ПАВ, формирует «свою» мицеллу, радиус внутренней полости которой равен радиусу белка. Поскольку ферментсодержащая мицелла находится в динамическом равновесии с пустыми мицеллами (в данном случае другого размера), межмицеллярные взаимодействия могут приводить к частичным неблагоприятным перестройкам оптимальной белоксодержащей мицеллы, сопровождающимся снижением каталитической активности включенного фермента. В тех же случаях, когда сольubilизация фермента не приводит к изменению внешних размеров мицеллы, варьирование их концентрации в системе при постоянной степени гидратации не влияет на каталитическую активность сольubilизованного фермента.

Зависимость константы скорости гидролиза ( $k_3$ ) *N-транс*-циннамоилимидазола, катализируемого  $\alpha$ -химотрипсином и его искусственно гликозилированным аналогом, от концентрации АОТ приведена на рис. 4.  $\alpha$ -Химотрипсин, водорастворимый немембранный фермент, не проявляет зависимости  $k_3$  от концентрации ПАВ. Модифицированный  $\alpha$ -химотрипсин, как видно из рисунка, такую зависимость обнаруживает ( $w_0 = 16$ ). Полученные данные указывают на то, что гликозилирование  $\alpha$ -химотрипсина придает ему способность взаимодействовать с мембраной.

Таким образом, в данной работе предложен принципиально новый подход, позволяющий изучать влияние углеводных фрагментов на свойства гликопротеинов. Сравнительное исследование нативного и искусственно гликозилированного  $\alpha$ -химотрипсина показало, что гликозилирование  $\alpha$ -химотрипсина придает ему способность к олигомеризации и мембранотропность (способность взаимодействовать с мицеллярной матрицей).

Экспериментальная часть

В работе были использованы этил(диметиламинопропил)карбодиимид и *п*-нитроанилид *N*-ацетил-*L*-тирозина (Serva, Германия), трис-гидроксиметилами-

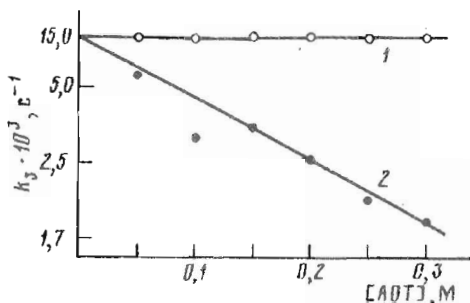


Рис. 4. Зависимости каталитических констант гидролиза *N-транс*-циннамолимидазола, катализируемого  $\alpha$ -химотрипсином  $\omega_0 = 10$  (1) или гликозилированным  $\alpha$ -химотрипсином,  $\omega_0 = 16$  (2), в системе АОТ — вода — октан от концентрации ПАВ. Условия эксперимента: 50 мМ трис-НСl-буфер, рН 8,0, концентрация ферментов изменялась в диапазоне 0,3—0,9 мкМ в зависимости от концентрации ПАВ

нометан и *N-транс*-циннамолимидазол (Sigma, США), Аэрозоль ОТ, АОТ (Merck, Германия). Препарат не подвергали дополнительной очистке. По данным ИК-спектроскопии, препарат АОТ содержит 0,6 моль  $\text{H}_2\text{O}$  на 1 моль АОТ. Эта величина использовалась при расчете общего содержания воды в исследуемой системе и степени гидратации АОТ. Гидрохлорид *D*-глюкозамина был любезно предоставлен д-ром хим. наук И. А. Ямсковым (ИНЭОС РАН).

В работе были также использованы растворители и низкомолекулярные вещества (марок ч.д.а. и ос.ч.) без дополнительной очистки.

$\alpha$ -Химотрипсин (КФ 3.4.21.1) из поджелудочной железы быка (Koch-Light Laboratories Ltd) использовали без дополнительной очистки. По данным титрования активных центров *N-транс*-циннамолимидазолом по методике [10], содержание активного фермента в препарате составляло 56%.

**Модификация  $\alpha$ -химотрипсина *D*-глюкозамином.** 320 мг  $\alpha$ -химотрипсина растворяли в 20 мл 0,05 М натрий-фосфатного буфера, рН 5,0, содержащего 0,15 М NaCl. К раствору добавляли 70 мг *N*-ацетил-*L*-тирозинамида (в качестве конкурентного ингибитора  $\alpha$ -химотрипсина для защиты его активного центра), затем 247 мг этил (диметиламинопропил)карбодиимида и 830 мг гидрохлорида *D*-глюкозамина. Избыток реагентов на одну экспонированную карбоксильную группу белка составил: карбодиимида — 10 раз; гидрохлорида *D*-глюкозамина — 30 раз. Реакцию проводили 18 ч при 20° С и постоянном перемешивании реакционной смеси. После завершения реакции модифицированный  $\alpha$ -химотрипсин очищали от избытка непрореагировавших низкомолекулярных соединений диализом в течение 1 сут против  $10^{-3}$  М HCl при 4° С. За ходом диализа следили спектрофотометрически ( $\lambda$  280 нм) и кондуктометрически. После завершения диализа препарат лиофильно высушивали. Выход модифицированного  $\alpha$ -химо-трипсина составил 236 мг.

**Характеристики модифицированного препарата  $\alpha$ -химотрипсина.** По данным титрования активных центров  $\alpha$ -химотрипсина по стандартной методике [10], гликозилированный препарат содержал 50% активных центров по отношению к исходному нативному ферменту.

Кинетические параметры, измеренные с использованием специфического субстрата *p*-нитроанилида *N*-бензоил-*L*-тирозина, в водном растворе для нативного и гликозилированного  $\alpha$ -химотрипсина практически не различаются.

Контроль за чистотой фермента осуществляли по стандартной методике электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях, рекомендованной фирмой Bio-Rad (США). Наличие одной узкой полосы на электрофореграмме, соответствующей молекулярной массе белка 25 кДа (молекулярная масса нативного  $\alpha$ -химотрипсина), свидетельствует о гомогенности полученного препарата и отсутствии межмолекулярных сшивок.

Определение изоэлектрической точки нативного и модифицированного белков проводили методом изоэлектрофокусирования по стандартной методике фирмы Bio-Rad (США). Изоэлектрическая точка модифицированного препарата белка смещена в щелочную область (*pI* нативного  $\alpha$ -химотрипсина равна 8,3, что совпадает с литературными данными [11], *pI* модифицированного белка — 9,6).

Результаты седиментационного анализа

Степень гидратации АОТ	Белок	Олигомерный состав
10	$\alpha$ -Химотрипсин	Мономер
20	»	»
25	»	»
12	Гликозилированный $\alpha$ -химотрипсин	»
20	То же	Мономер + димер
25	»	То же
20 (Глюкозосодержащие мицеллы)	»	Мономер

Данные седиментационного эксперимента подтверждают также наше предположение, что нивелирование второго оптимума на зависимости каталитической активности гликозилированного  $\alpha$ -химотрипсина от степени гидратации (рис. 3), происходящее при введении в систему низкомолекулярного сахара, действительно обусловлено диссоциацией димера белка на мономеры.

*Зависимость каталитической активности нативного и искусственно гликозилированного  $\alpha$ -химотрипсина от концентрации ПАВ*

Зависимость  $k_{\text{кат,набл}}$  от концентрации АОТ является критерием способности белка взаимодействовать с мембраной [5, 6]. Мембраноактивный белок, взаимодействуя с молекулами воды и ПАВ, формирует «свою» мицеллу, радиус внутренней полости которой равен радиусу белка. Поскольку ферментсодержащая мицелла находится в динамическом равновесии с пустыми мицеллами (в данном случае другого размера), межмицеллярные взаимодействия могут приводить к частичным неблагоприятным перестройкам оптимальной белоксодержащей мицеллы, сопровождающимся снижением каталитической активности включенного фермента. В тех же случаях, когда сольюбилизация фермента не приводит к изменению внешних размеров мицеллы, варьирование их концентрации в системе при постоянной степени гидратации не влияет на каталитическую активность сольюбилизованного фермента.

Зависимость константы скорости гидролиза ( $k_3$ ) *N-транс*-циннамоилимидазола, катализируемого  $\alpha$ -химотрипсином и его искусственно гликозилированным аналогом, от концентрации АОТ приведена на рис. 4.  $\alpha$ -Химотрипсин, водорастворимый немембранный фермент, не проявляет зависимости  $k_3$  от концентрации ПАВ. Модифицированный  $\alpha$ -химотрипсин, как видно из рисунка, такую зависимость обнаруживает ( $w_0 = 16$ ). Полученные данные указывают на то, что гликозилирование  $\alpha$ -химотрипсина придает ему способность взаимодействовать с мембраной.

Таким образом, в данной работе предложен принципиально новый подход, позволяющий изучать влияние углеводных фрагментов на свойства гликопротеинов. Сравнительное исследование нативного и искусственно гликозилированного  $\alpha$ -химотрипсина показало, что гликозилирование  $\alpha$ -химотрипсина придает ему способность к олигомеризации и мембранотропность (способность взаимодействовать с мицеллярной матрицей).

Экспериментальная часть

В работе были использованы этил(диметиламинопропил)карбодиимид и *n*-нитроанилид *N*-ацетил-*L*-тирозина (Serva, Германия), трис-гидрокси-метилами-

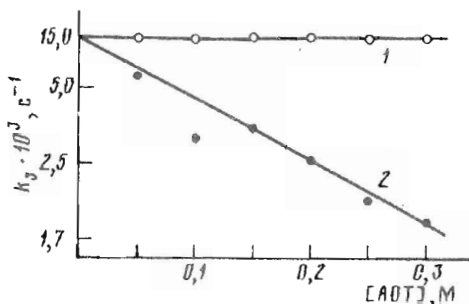


Рис. 4. Зависимости каталитических констант гидролиза *N-транс*-циннамоилимидазола, катализируемого  $\alpha$ -химотрипсином  $w_0 = 10$  (1) или гликозилированным  $\alpha$ -химотрипсином,  $w_0 = 16$  (2), в системе АОТ — вода — октан от концентрации ПАВ. Условия эксперимента: 50 мМ трис-НСI-буфер, рН 8,0, концентрация ферментов изменялась в диапазоне 0,3—0,9 мкМ в зависимости от концентрации ПАВ

нометан и *N-транс*-циннамоилимидазол (Sigma, США), Аэрозоль ОТ, АОТ (Merck, Германия). Препарат не подвергали дополнительной очистке. По данным ИК-спектроскопии, препарат АОТ содержит 0,6 моль  $\text{H}_2\text{O}$  на 1 моль АОТ. Эта величина использовалась при расчете общего содержания воды в исследуемой системе и степени гидратации АОТ. Гидрохлорид *D*-глюкозамина был любезно предоставлен д-ром хим. наук И. А. Ямсковым (ИНЭОС РАН).

В работе были также использованы растворители и низкомолекулярные вещества (марок ч.д.а. и ос.ч.) без дополнительной очистки.

$\alpha$ -Химотрипсин (КФ 3.4.21.1) из поджелудочной железы быка (Koch-Light Laboratories Ltd) использовали без дополнительной очистки. По данным титрования активных центров *N-транс*-циннамоилимидазолом по методике [10], содержание активного фермента в препарате составляло 56%.

**Модификация  $\alpha$ -химотрипсина *D*-глюкозамином.** 320 мг  $\alpha$ -химотрипсина растворяли в 20 мл 0,05 М натрий-фосфатного буфера, рН 5,0, содержащего 0,15 М NaCl. К раствору добавляли 70 мг *N*-ацетил-*L*-тирозиламида (в качестве конкурентного ингибитора  $\alpha$ -химотрипсина для защиты его активного центра), затем 247 мг этил (диметиламинопропил)карбодиимида и 830 мг гидрохлорида *D*-глюкозамина. Избыток реагентов на одну экспонированную карбоксильную группу белка составил: карбодиимида — 10 раз; гидрохлорида *D*-глюкозамина — 30 раз. Реакцию проводили 18 ч при 20° С и постоянном перемешивании реакционной смеси. После завершения реакции модифицированный  $\alpha$ -химотрипсин очищали от избытка непрореагировавших низкомолекулярных соединений диализом в течение 1 сут против  $10^{-3}$  М HCl при 4° С. За ходом диализа следили спектрофотометрически ( $\lambda$  280 нм) и кондуктометрически. После завершения диализа препарат лиофильно высушивали. Выход модифицированного  $\alpha$ -химо-трипсина составил 236 мг.

**Характеристики модифицированного препарата  $\alpha$ -химотрипсина.** По данным титрования активных центров  $\alpha$ -химотрипсина по стандартной методике [10], гликозилированный препарат содержал 50% активных центров по отношению к исходному нативному ферменту.

Кинетические параметры, измеренные с использованием специфического субстрата *n*-нитроанилида *N*-бензоил-*L*-тирозина, в водном растворе для нативного и гликозилированного  $\alpha$ -химотрипсина практически не различаются.

Контроль за чистотой фермента осуществляли по стандартной методике электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях, рекомендованной фирмой Bio-Rad (США). Наличие одной узкой полосы на электрофореграмме, соответствующей молекулярной массе белка 25 кДа (молекулярная масса нативного  $\alpha$ -химотрипсина), свидетельствует о гомогенности полученного препарата и отсутствии межмолекулярных сшивок.

Определение изоэлектрической точки нативного и модифицированного белков проводили методом изоэлектрофокусирования по стандартной методике фирмы Bio-Rad (США). Изоэлектрическая точка модифицированного препарата белка смещена в щелочную область (рI нативного  $\alpha$ -химотрипсина равна 8,3, что совпадает с литературными данными [11], рI модифицированного белка — 9,6).



Результаты изоэлектрофокусирования косвенно подтверждают, что фермент действительно модифицирован. Наличие одной узкой полосы в геле свидетельствует о том, что препарат гликозилированного  $\alpha$ -химотрипсина практически гомогенен.

Степень модификации  $\alpha$ -химотрипсина *D*-глюкозаминном, определенная титрованием карбоксильных групп белка реактивом Вудворда К по методике [12], составила  $7 \pm 2$  из 10 доступных COOH-групп.

*Определение каталитической активности нативного  
и гликозилированного  $\alpha$ -химотрипсина в обращенных мицеллах АОТ*

*А. Субстрат — N-транс-циннамоилимидазол.* В 2 мл 0,2 М раствора АОТ в октане солюбилизovali 40—200 мкл 50 мМ трис-НСI-буфера, рН 8,0 (или 1,0 М глюкозы в том же буфере) и 5 мкл 40 мМ раствора субстрата в ацетонитриле, регистрировали фоновый гидролиз субстрата. Затем добавляли 5 мкл раствора  $\alpha$ -химотрипсина (или его гликозилированного производного) с известной концентрацией активных центров. За ходом реакции следили спектрофотометрически по убыли *N-транс*-циннамоилимидазола (25° С,  $\lambda$  335 нм). Использовали однолучевой спектрофотометр Philips PU-8620 (Англия) с термостатируемым кюветным отделением. Скорость ферментативного гидролиза определяли по разности скоростей реакции после и до добавления фермента.

В независимом эксперименте определяли коэффициенты молярного поглощения *N-транс*-циннамоилимидазола в системе обращенных мицелл АОТ в октане при различных степенях гидратации ПАВ.

*Б. Субстрат — *n*-нитроанилид *N*-ацетил-*L*-тирозина.* В 2 мл 0,1 М раствора АОТ в октане солюбилизovali 20—100 мкл 50 мМ трис-НСI-буфера (рН 8,5), 2 мкл 1,4 М раствора АТНА в смеси DMSO — DMFA (1 : 1) и 2 мкл раствора  $\alpha$ -химотрипсина (или его гликозилированного производного) с известной концентрацией активных центров. За ходом реакции следили спектрофотометрически по образованию продукта реакции *n*-нитроанилина ( $\lambda$  380 нм).

В независимом эксперименте определяли коэффициент молярного поглощения *n*-нитроанилина в системе обращенных мицелл АОТ в октане при различных степенях гидратации ПАВ.

*Седиментационный анализ белоксодержащих мицелл.* Препараты  $\alpha$ -химотрипсина и гликозилированного  $\alpha$ -химотрипсина в обращенных мицеллах анализировали методом скоростной седиментации на ультрацентрифуге «Beckman E», снабженной фотоэлектрическим сканирующим устройством с монохроматором и мультиплексором, с использованием 12-мм двухсекторных ячеек и ротора Ap-G-Ti при скоростях 20 000—40 000 об/мин и длине волны 280 нм.

Коэффициенты седиментации пустых мицелл и пустых глюкозосодержащих мицелл АОТ определяли в независимом эксперименте.

Теоретический анализ зависимостей коэффициентов седиментации обращенных мицелл от степени гидратации и расчет массы белка, включенного в мицеллу, проводили аналогично тому, как это описано в работе [9].

Данная работа финансировалась из средств Государственной научно-технической программы 08.05 «Новейшие методы биоинженерии», направление — «Инженерная энзимология», грант 1-77.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shylaja M., Seshadri H. S.//Biochem. Ed. 1989. V. 17. P. 170—178.
2. Cole C. R., Smith C. A.//Biochem. Ed. 1989. V. 17. P. 179—189.
3. Smith C. A., Gaffney J. J., Sead L. H., Gordon A. N., Freemont A. J.//Biochem. Ed. 1991. V. 19. P. 106—116.
4. Reddy A. V., MacColl R., Maley F.//Biochemistry. 1990. V. 29. P. 2482—2487.

5. Мартинек К., Левашов А. В., Клячко Н. Л., Хмельницкий Ю. Л., Березин И. В. // Биол. мембраны. 1985. Т. 2. С. 669—696.
6. 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.
7. Клячко Н. Л., Пшежецкий А. В., Кабанов А. В., Вакула С. В., Мартинек К., Левашов А. В. // Биол. мембраны. 1990. Т. 7. С. 467—472.
8. Синицын А. П., Клесов А. А., Рабинович М. Л., Гусаков А. В., Морозов А. М. Биотехнология ферментативного превращения целлюлозы. М.: ВИНТИ, 1988. Т. 12. С. 4—151.
9. Хмельницкий Ю. Л., Левашов А. В., Клячко Н. Л., Черняк В. Я., Мартинек К. // Биохимия. 1982. Т. 47. С. 86—93.
10. Schonbaum G. R., Zerner B., Bender M. L. // J. Biol. Chem. 1961. V. 236. P. 2930—2935.
11. Tsai C. S., White J. H. // Biochem. J. 1983. V. 209. P. 309—314.
12. Мелик-Нубаров Н. С. Стабилизация ферментов путем гидрофилизации их поверхности методом химической модификации (на примере трипсина и  $\alpha$ -химотрипсина): Дис... канд. хим. наук. М.: МГУ, 1988.

Поступила в редакцию  
8.VII.1993

R. V. Rariy, N. L. Klyachko, K. Martinek\*, A. V. Levashov

GLYCOSYLATED  $\alpha$ -CHYMOTRYPSIN IN REVERSED MICELLES  
OF AEROSOL OT IN OCTANE AS A MODEL IN STUDYING THE ROLE  
OF CARBOHYDRATE FRAGMENTS IN GLYCOPROTEINS

*Division of Chemical Enzymology, Department of Chemistry,*

*M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow;*

*\* Institute of Organic Chemistry and Biochemistry,  
Academy of Sciences of Czech Republic, Prague*

A comparative study of the well known non-glycosylated enzyme  $\alpha$ -chymotrypsin, and its derivative artificially glycosylated with *D*-glucosamine was carried out to reveal the effect of carbohydrate fragments on oligomeric composition and membrane activity of glycoproteins. A microheterogeneous system of reversed micelles of Aerosol OT in octane, which can be a model of the biomembrane environment of enzymes *in vivo*, was used as a medium for enzymatic reactions. It was found that the glycosylation of  $\alpha$ -chymotrypsin makes the protein to be enables to oligomerization and interaction with the micellar matrix (membrane affinity).