



УДК 577.152:541.183

АНГИОТЕНЗИНПРЕВРАЩАЮЩИЙ ФЕРМЕНТ В СИСТЕМЕ ОБРАЩЕННЫХ МИЦЕЛЛ АОТ В ОКТАНЕ: ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С МАТРИЦЕЙ

© 1995 г. О. А. Кост*, Т. А. Орт, И. И. Никольская, С. Н. Наметкин, А. В. Левашов

Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Поступила в редакцию 04.07.94 г. После доработки 30.01.95 г.

Изучена регуляция каталитической активности и надмолекулярной структуры ангиотензинпревращающего фермента из легких быка в системе обращенных мицелл АОТ-вода-октан, моделирующей мембранное окружение ферментов *in vivo*. Оценены каталитические параметры мономерной и димерной форм фермента в системе обращенных мицелл. Показано, что выделенный из легких быка экстракцией тритоном X-100 фермент не проявляет зависимости каталитической активности от концентрации АОТ при постоянной степени гидратации. Получен искусственно гидрофобизованный ангиотензинпревращающий фермент путем модификации хлорангидридом стеариновой кислоты. Показано, что модификация приводит к появлению зависимости каталитической активности от концентрации ПАВ, что свидетельствует о взаимодействии фермента с мицеллярной матрицей, при этом модифицированный фермент обнаруживает существенное увеличение каталитической активности в системе обращенных мицелл.

Ключевые слова: ангиотензинпревращающий фермент, искусственно гидрофобизованный; обращенные мицеллы; аэрозоль ОТ; кинетические параметры; мембранотропность.

Ангиотензинпревращающий фермент (дипептидилкарбоксипептидаза, КФ 3.4.15.1, АПФ) широко распространен в организме человека и животных. Одной из наиболее важных его функций является регуляция кровяного давления [1, 2]. Фермент существует в организме в двух формах: растворимой и мембраносвязанной. Полагают [3, 4], что АПФ функционирует в основном на наружной мембране эндотелиальных и эпителиальных клеток, при этом фермент в разных тканях встроен в мембрану клеток сходным образом с помощью небольшого якорного пептида, расположенного на С-конце пептидной цепи [5, 6]. Показано [6], что небольшой концевой фрагмент якорного пептида может находиться внутри клетки. Таким образом, АПФ представляет собой классический интегральный белок, функционирующий в тесном контакте с биологическими мембранами. Для изучения поведения ферментов такого класса в условиях, моделирующих условия *in vivo*, часто используют в качестве среды для ферментативной реакции системы обращенных мицелл ПАВ в органических растворителях [7]. Известно, что подобные системы могут служить матрицами регулируемого размера для сборки белковых комплексов различного состава, а их использование

в качестве реакционной среды позволяет исследовать особенности поведения ферментов различной природы и определить влияние мембранной организации на проявляемые ферментами характеристические свойства.

В настоящей работе представлены результаты изучения закономерности регуляции активности растворимой и модифицированной форм АПФ из легких быка в системе обращенных мицелл аэрозоля ОТ в октаноле.

Зависимость каталитической активности АПФ от степени гидратации. Показано, что в системе обращенных мицелл АОТ в октаноле в зависимости от степени гидратации $w_0 = [H_2O]/[АОТ]$ (параметра, определяющего размеры внутренней полости мицеллы) АПФ может функционировать как в мономерной форме (при $w_0 < 30$), так и в димерной (при $w_0 > 30$) (рис. 1). Эти результаты подтверждены методом седиментационного анализа [8].

Кинетические параметры гидролиза FA-Phe-Gly-Gly под действием мономера и димера АПФ. В независимом эксперименте были определены молярные коэффициенты поглощения субстрата FA-Phe-Gly-Gly (ϵ_s) и продукта реакции FA-Phe (ϵ_p) в системе обращенных мицелл АОТ в октаноле при разных степенях гидратации ($w_0 = 22 - 33$). Оказалось, что разностные молярные коэффициенты поглощения (ϵ_{s-p}) не зависели от степени

Использованные нестандартные сокращения: АПФ – ангиотензинпревращающий фермент; FA-Phe-Gly-Gly – фурилакрилоил.

* Автор для переписки.

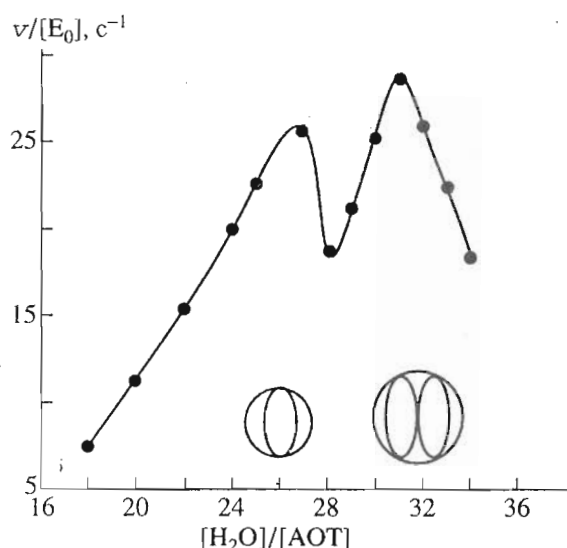


Рис. 1. Зависимость каталитической активности АПФ, солюбилизированного в системе обращенных мицелл, от степени гидратации.

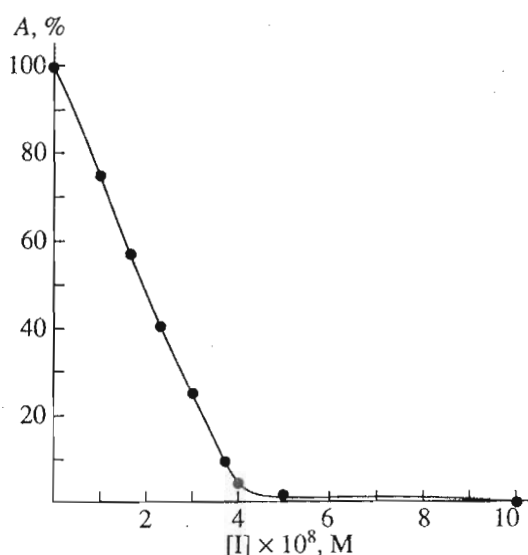


Рис. 2. Титрование солюбилизированного в системе обращенных мицелл АОТ в октане (w_0 27) мономера АПФ специфическим ингибитором лизиноприлом.

гидратации и составляли при 328, 335 и 340 нм соответственно 1400, 1120, 680 М⁻¹ см⁻¹. Порядок добавления субстрата и фермента в реакционную смесь, а также инкубация фермента в системе обращенных мицелл в течение 0 - 3.5 ч не оказывали влияния на наблюдаемую активность фермента. Показано, что в мицеллах зависимости начальных скоростей гидролиза субстрата от его начальной концентрации подчиняются кинетике Михаэлиса-Ментен.

Для полученного препарата АПФ методом стехиометрического титрования [9, 10] была определена концентрация активных молекул фермента в водной среде и в обращенных мицеллах. В качестве специфического конкурентного ингибитора использовали лизиноприл с константой ингибирования для фермента из легких быка менее 10⁻⁹ М. В водной среде содержание активных молекул в полученном нами препарате АПФ составляло практически 100%. В то же время концентрация активных центров фермента в системе обращенных мицелл составила лишь 20% как для мономера, так и для димера и не зависела от степени гидратации (типичная кривая титрования приведена на рис. 2). С учетом полученных данных рассчитаны значения каталитических кон-

стант гидролиза субстрата FA-Phe-Gly-Gly под действием мономерной и димерной форм АПФ в системе АОТ-вода-октан (таблица). Величины k_{cat} в системе АОТ-вода-октан для обеих форм примерно в 2 раза ниже соответствующей величины k_{cat} в водной среде. Важно отметить, что каталитические константы практически одинаковы для мономера и димера, т.е., по-видимому, образование димеров не приводит к экранированию активных центров АПФ.

Следует отметить, что наблюдаемое снижение активности АПФ в системе обращенных мицелл является обратимым. Так, при выделении АПФ из системы обращенных мицелл экстракцией в водную среду доля титруемых активных молекул увеличивается до 65%. Повторное включение такого препарата фермента в систему обращенных мицелл вновь вызывало пятикратное снижение активности, и доля титруемых активных молекул составляла при этом 13%. Таким образом, наблюдаемая инактивация АПФ, по-видимому, объясняется свойствами системы, и одним из объяснений полученных результатов может служить существование долгоуставливающегося равновесия между активной и неактивной формами фермента в системе обращенных мицелл, при

Кинетические параметры реакции гидролиза FA-Phe-Gly-Gly под действием нативного (I) и модифицированного (II) хлорангидридом стеариновой кислоты АПФ в водной и мицеллярной среде

Кинетические параметры	(I)				(II)	
	Водная среда	Система обращенных мицелл		Водная среда	Система обращенных мицелл (w_0 27)	
		мономер АПФ (w_0 27)	димер АПФ (w_0 31)			
k_{cat} , с ⁻¹	280 ± 20	130 ± 14	145 ± 15	230 ± 30	1600 ± 100	
K_m , мМ	0.7 ± 0.06	1.1 ± 0.3	1.3 ± 0.4	0.68 ± 0.07	0.9 ± 0.08	

этом полученные кинетические параметры могут отвечать квазиравновесному состоянию системы.

Зависимость каталитической активности АПФ от концентрации АОТ. При изучении свойств мембранной (с якорным пептидом) и растворимой (без якорного пептида) форм ферментов кинетическими методами классической энзимологии в водных растворах различия между ними, как правило, не обнаруживаются, что было показано как для АПФ [11], так и для ряда других ферментов [12, 13]. Эти различия могут быть выявлены при использовании в качестве среды для ферментативной реакции систем обращенных мицелл ПАВ в органических растворителях. В этом случае зависимость каталитической активности от концентрации ПАВ при постоянной степени гидратации может служить простым и информативным тестом на мембранотропность ферментов [14, 15]. В последние годы показано, что многие ферменты, обладающие якорными группами (в том числе и углеводной природы [16]), способные активно взаимодействовать с мицеллярной матрицей, проявляют существенную зависимость каталитической активности от концентрации ПАВ при постоянной степени гидратации [14 - 17].

Для выделенного препарата фермента не наблюдалось зависимости каталитической константы гидролиза FA-Phe-Gly-Gly от концентрации АОТ при нескольких степенях гидратации ($w_0 = 25, 28, 33$) (типичная зависимость приведена на рис. 3а), что, вероятнее всего, объясняется отщеплением мембранного якоря в процессе выделения. Однако нельзя исключать и того, что в данной системе и выбранных условиях мембранотропные свойства фермента по каким-то причинам не проявляются (например, в случае щелочной фосфатазы зависимость каталитической активности от концентрации ПАВ проявлялась только при определенных значениях pH, далеких от величины pH-оптимума ферментативной активности [15]).

Для выяснения принципиальной возможности проявления ферментом мембранотропных свойств в системе обращенных мицелл было искусственно введение в состав белковой глобулы гидрофобного якоря.

Как было показано на примере α -химотрипсина [17], растворимых форм аминопептидазы [14], γ -глутамилтрансферазы [14] и щелочной фосфатазы [15], искусственная гидрофобизация фермента остатками жирных кислот может приводить к появлению мембранотропных свойств. Действительно, препарат модифицированного остатками стеариновой кислоты АПФ проявляет зависимость каталитической активности от концентрации АОТ (рис. 3б). Титрованием тринитробензолсульфокислотой показано, что на по-

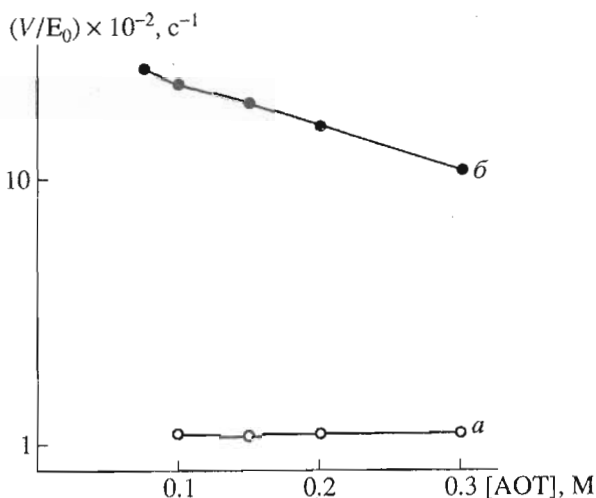


Рис. 3. Зависимость каталитической константы гидролиза FA-Phe-Gly-Gly в системе обращенных мицелл АОТ в октане под действием нативной (а) и модифицированной (б) форм АПФ от концентрации АОТ при степени гидратации w_0 25 в полугиперболических координатах.

верхности фермента модифицируется около 40% всех аминокрупп.

Кинетические параметры гидролиза FA-Phe-Gly-Gly в системе обращенных мицелл под действием модифицированного АПФ. Титрование фермента специфическим ингибитором показало, что после модификации хлорангидридом стеариновой кислоты в системе обращенных мицелл остается лишь 6% активных молекул (по сравнению с 20% для немодифицированного фермента). Низкое число активных молекул может быть вызвано модификацией остатка Lys активного центра фермента. На основе данных по титрованию были вычислены кинетические константы гидролиза FA-Phe-Gly-Gly в системе обращенных мицелл под действием модифицированного фермента (таблица). В то время как константа Михаэлиса практически не изменяется, каталитическая константа, определенная для модифицированного фермента, существенно увеличилась даже по сравнению с ее значением в водной среде. Для того чтобы доказать, что увеличение каталитической константы в данном случае связано с взаимодействием модифицированного фермента с мицеллярной матрицей, а не со специфической модификацией белковых групп, искусственно гидрофобизованный АПФ был перенесен из системы обращенных мицелл в водную среду путем осаждения белка ацетоном с последующим растворением. После титрования активных молекул модифицированного фермента в водной среде были определены кинетические параметры гидролиза FA-Phe-Gly-Gly (таблица), которые практически не отличаются от таковых для гидролиза нативным ферментом. Можно полагать, что

наблюдаемое увеличение каталитической активности искусственно гидрофобизованного АПФ в системе обращенных мицелл обусловлено взаимодействием фермента с матрицей.

Таким образом, можно заключить, что система обращенных мицелл АОТ в октане в целом благоприятна именно для функционирования мембранной формы АПФ. Можно ожидать, что фермент с нативным гидрофобным якорем проявит в данной системе большую каталитическую активность, чем в водной среде. Поэтому исследование в дальнейшем этой формы АПФ в системе АОТ–вода–октан представляется перспективным.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали 0.05 М HEPES-буфер, содержащий 0.15 М NaCl, 1 мкМ $ZnCl_2$, pH 7.5 (А) и 0.1 М боратный буфер, pH 9.5 (Б), фурилакритоил-*L*-фенилаланил-глицил-глицин (FA-Phe-Gly-Gly) и лизиноприл (N^{α} -[(*S*)-1-карбокси-3-фенилпропил]-*L*-лизил-*L*-пролин) фирмы Sigma (США), натриевую соль ди(2-этил)гексилевого эфира сульфоянтарной кислоты (АОТ) фирмы Merck (США), HEPES (Boehringer-Mannheim, Германия), другие реактивы были отечественного производства марки ос. ч. и х. ч.

Ангиотензинпревращающий фермент (АПФ) выделяли из легких быка и очищали методом каскадной аффинной хроматографии, разработанной в нашей лаборатории (методика выделения будет опубликована позже в отдельной статье). Полученный фермент был гомогенным по данным электрофореза в 7.5% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия и содержал практически 100% активных молекул, определенных стехиометрическим титрованием специфическим ингибитором лизиноприлом. Концентрацию белка определяли методом Лоури [18] или спектрофотометрическим методом [18].

Активность ангиотензинпревращающего фермента определяли по скорости гидролиза FA-Phe-Gly-Gly [19]. В водной среде: в кювету спектрофотометра Shimadzu UV-265FW (Япония) помещали 980 мкл 7×10^{-5} - 1×10^{-3} М раствора субстрата в буфере А, термостатировали при 25°C, затем добавляли 20 мкл 4×10^{-7} - 1×10^{-6} М исследуемого раствора фермента в том же буфере, реакционную смесь перемешивали и регистрировали скорость изменения оптического поглощения при длинах волн 328, 335 или 340 нм.

В системе обращенных мицелл АОТ в октане: к 1 мл 0.3 М раствора АОТ в октане добавляли 61 - 160 мкл (в зависимости от необходимой степени гидратации) 5×10^{-5} - 1×10^{-3} М раствора субстрата в буфере А и 20 мкл ацетонитрила. Реакционную смесь интенсивно встряхивали до

получения прозрачного раствора и добавляли 20 - 30 мкл 4×10^{-7} - 1×10^{-6} М раствора фермента в буфере А. Для достижения в системе нужной степени гидратации варьировали объем буфера.

Данные анализировали в координатах Лайнуивера–Берка. Статистическую обработку результатов проводили по стандартным программам с использованием метода наименьших квадратов на ПЭВМ IBM PC/XT. Ошибка эксперимента составляла не более 10%.

Концентрацию активных молекул АПФ в водной среде определяли методом стехиометрического титрования [9, 10] лизиноприлом. Для этого 1.3 мл реакционной смеси, содержащей $0 - 6 \times 10^{-7}$ М ингибитор и 2×10^{-7} М фермент в буфере А, инкубировали 20 мин для установления равновесия, затем вносили 20 мкл субстрата (конечная концентрация 5×10^{-5} М) и измеряли активность фермента как описано выше.

Для определения концентрации активных молекул АПФ в системе АОТ–вода–октан предварительно показали, что для установления равновесия в системе обращенных мицелл, содержащей фермент и ингибитор, достаточно 30 мин. В 1 мл 0.3 М АОТ в октане вносили 115 - 160 мкл буфера А, содержащего $0 - 1 \times 10^{-7}$ М лизиноприл и 2×10^{-7} М фермент. Смесь инкубировали 30 мин при 25°C, затем определяли остаточную активность фермента как описано выше. Концентрация субстрата в реакционной смеси составляла 4.5×10^{-5} М. Титрование проводили при степенях гидратации w_0 , равных 25, 27, 31.

Экстракция ангиотензинпревращающего фермента из системы обращенных мицелл АОТ в октане в водную среду. К 5 мл мицеллярного раствора, содержащего 1×10^{-7} М фермент, добавляли равный объем 1 М NaCl (pH 6.0). Смесь интенсивно встряхивали и отстаивали около 20 мин до полного расслоения системы. Водную фракцию отбирали и содержащийся в ней фермент освобождали от избытка соли и возможных примесей АОТ на ячейке для концентрирования Amicon (США) с использованием мембраны YM-30.

Модификацию ангиотензинпревращающего фермента хлорангидридом стеариновой кислоты проводили по методике [20]. К 5 мл 0.3 М раствора АОТ в октане (w_0 23), содержащего 5×10^{-6} М фермент в буфере Б, добавляли 10 мкл 5×10^{-3} М раствора хлорангидрида стеариновой кислоты в октане. Реакционную смесь инкубировали 1 ч при 25°C. Для определения активности полученного фермента в системе обращенных мицелл АОТ в октане отбирали аликвоту (50 мкл) и добавляли в реакционную смесь с субстратом, измеряли активность как описано выше.

Выделение модифицированного фермента из мицеллярной системы. К ферментсодержащему мицеллярному раствору прибавляли равный

объем охлажденного ацетона, выпавший осадок отделяли центрифугированием. Процедуру повторяли многократно. Осадок сушили в вакууме.

Определение свободных аминогрупп на поверхности фермента. К 1 мл буфера Б, содержащего 2×10^{-8} М нативный или модифицированный АПФ, добавляли раствор тринитробензолсульфо кислоты (конечная концентрация 0.1 М) в том же буфере. Регистрировали изменение оптического поглощения при 420 нм относительно раствора сравнения, не содержащего белок.

Данная работа частично финансировалась из средств Государственной научно-технической программы 08.05 "Новейшие методы биоинженерии" (направление – "Инженерная энзимология", грант № 1-535/0) и Международного научного фонда Сороса (грант № МСК 000).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Елисева Ю.В., Павлихина Л.В., Орехович В.Н.* // Докл. АН СССР. 1974. Т. 217. № 4. С. 953 - 956.
2. *Ondetti M.A., Cushman D.W.* // Crit. Rev. Biochem. 1984. V. 16. № 4. P. 381 - 411.
3. *Erdos E.G., Skidgel R.A.* // Lab. Invest. 1987. V. 56. № 4. P. 345 - 348.
4. *Dzau V.J.* // Circulation. 1988. V. 77 (Suppl). № 1. P. 4 - 13.
5. *Erdos E.C., Gafford J.T.* // Clin. Exp. Hyper.-Theory and Practice. 1983. V. A5. № 7, 8. P. 1251 - 1262.
6. *Naim N.Y.* // Biochem. J. 1992. V. 286. № 2. P. 451 - 457.
7. *Martinek K., Levashov A.V., Klyachko N.L., Khmelinski Yu.L., Berezin I.V.* // Eur. J. Biochem. 1986. V. 155. P. 453 - 468.
8. *Kost O.A., Ort T.A., Никольская И.И., Наметкин С.Н., Левашов А.В.* // Биохимия. 1994. Т. 59. № 11. С. 1301 - 1306.
9. *Ларионова Н.И., Маслов Е.В., Елисева Ю.Е.* // Биохимия. 1982. Т. 47. № 8. С. 1332 - 1337.
10. *Ehlers M., Riordan J.F.* // Biochemistry. 1992. V. 30. P. 7118 - 7126.
11. *Lanzillo J.J., Stevens J., Dasarathy Y., Yotsumoto H., Fanburg B.L.* // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. № 28. P. 14938 - 14944.
12. *Tate S.S., Meister A.* // Mol. Cell. Biochem. 1981. V. 39. P. 357 - 368.
13. *Колесанова Е.Ф., Ротанова Т.В., Америк А.Ю., Гиноман Л.М., Антонов В.К.* // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 3. С. 340 - 356.
14. *Наметкин С.Н., Кабанов А.В., Евтушенко Г.Н., Клячко Н.Л., Колесанова Е.Ф., Ротанова Т.В., Чернов Н.Н., Левашов А.В.* // Биоорган. химия. 1991. Т. 17. № 4. С. 442 - 447.
15. *Наметкин С.Н., Дадаян А.К., Кабанов А.В., Левашов А.В.* // Биоорган. химия. 1992. Т. 18. № 6. С. 777 - 783.
16. *Рарий Р.В., Клячко Н.Л., Мартинек К., Левашов А.В.* // Биоорган. химия. 1994. Т. 20. № 3. С. 249 - 256.
17. *Левашов А.В., Кабанов А.В., Наметкин С.Н., Мартинек К., Бerezin И.В.* // Докл. АН СССР. 1985. Т. 284. № 3. С. 755 - 758.
18. *Кочетов Г.А.* Практическое руководство по энзимологии: М: Высш. школа, 1980.
19. *Holmquist B., Bunning P., Riordan J.F.* // Anal. Biochem. 1979. V. 95. № 5. P. 540 - 549.
20. *Kabanov A.V., Levashov A.V., Martinek K.* // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1987. V. 501. P. 63 - 66.

Angiotensin-Converting Enzyme in the System of Reversed Micelles of Docusate Sodium in Octane: Interaction with the Matrix

O. A. Kost*, T. A. Ort, I. I. Nikolskaya, S. N. Nametkin, and A. V. Levashov

Faculty of Chemistry, Moscow State University, Moscow, 119899 Russia

Abstract – Regulation of catalytic activity and intramolecular structure of the bovine lung angiotensin-converting enzyme was studied using reversed micelles in a sodium docusate–water–octane system, which model the enzyme's environment *in vivo*. The catalytic parameters of monomeric and dimeric forms of the enzyme in the reversed micellar system were evaluated. The catalytic activity of the angiotensin-converting enzyme extracted from bovine lung with Triton X-100 did not depend on the detergent concentration at a constant level of hydration. An artificially hydrophobized form of the angiotensin-converting enzyme was obtained by modifying the enzyme with stearic acid chloride. The modification leads to the dependence of the catalytic activity on the surfactant concentration, which provides evidence that the enzyme interacts with the micellar matrix. The modified enzyme showed a significant increase in catalytic activity in the reversed micellar system.

Key words: *angiotensin-converting enzyme, artificially hydrophobized, reversed micelles, aerosol OT, kinetic parameters.*

* To whom correspondence should be addressed.