



УДК 577.152.313\*1.04

© 1992 г. С. Н. Наметкин, А. Б. Дадали,  
А. В. Кабанов, А. В. ЛевашовМОДУЛЯЦИЯ МЕМБРАНОАКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТА В СИСТЕМЕ  
ОБРАЩЕННЫХ МИЦЕЛЛ ИЗМЕНЕНИЕМ pH СРЕДЫ (НА ПРИМЕРЕ  
ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ)*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,  
кафедра химической энзимологии*

Изучена регуляция мембраноактивных свойств щелочной фосфатазы из кишок телят в системе обращенных мицелл аэрозоля ОТ (АОТ) в октане. Найдено, что зависимость каталитической активности щелочной фосфатазы от концентрации ПАВ при постоянной степени гидратации, характеризующая мембранотропность ферментов, модулируется изменением pH среды. Не исключено, что при изменении pH происходит изменение конформации белковой молекулы, сопровождающееся экспонированием наружу якорных участков, обеспечивающих взаимодействие фермента с мицеллярной матрицей.

Многие ферменты в процессе метаболизма изменяют свою локализацию, переходя из растворимой формы в мембраносвязанную и наоборот [1]. Такой переход может быть обусловлен, например, введением в молекулу белка или отщеплением от нее гидрофобного якоря, образованного пептидом или группами небелковой природы (фосфолипидами, жирными кислотами) [2–6]. Появление на поверхности белка якорной группы может быть также обусловлено конформационными переходами белковой глобулы. Выяснение влияния таких переходов на кинетические свойства ферментов представляет значительный интерес. Однако при изучении свойств двух форм ферментов методами классической энзимологии (в водных растворах) различия между ними, как правило, не обнаруживаются [2, 3, 7].

Эта задача может быть решена при использовании в качестве среды для ферментативной реакции систем гидратированных обращенных мицелл ПАВ в органических растворителях: как было показано на примере различных ферментов ( $\gamma$ -глутамилтрансфераза, аминоксипептидаза [8]), по закономерностям катализа в этих системах их мембранные и растворимые формы сильно различаются.

Целью данной работы явилось сравнительное изучение кинетических закономерностей функционирования мембранной и растворимой форм щелочной фосфатазы из кишок телят в системе обращенных мицелл аэрозоля ОТ в октане.

Известно, что варьирование концентрации АОТ при постоянной степени его гидратации сопровождается изменением числа (концентрации) мицелл в системе. При этом в достаточно широком диапазоне концентраций ПАВ основные характеристики мицелл, и в частности их размеры, не изменяются [9, 10]. На этом основании можно полагать, что катали-

Сокращения: ПАВ – поверхностно-активное вещество, аэрозоль ОТ (АОТ) – натриевая соль ди-2-этилгексилового эфира сульфоянтарной кислоты, TNBS – тринитробензолсульфокислота, SDS – додецилсульфат натрия.

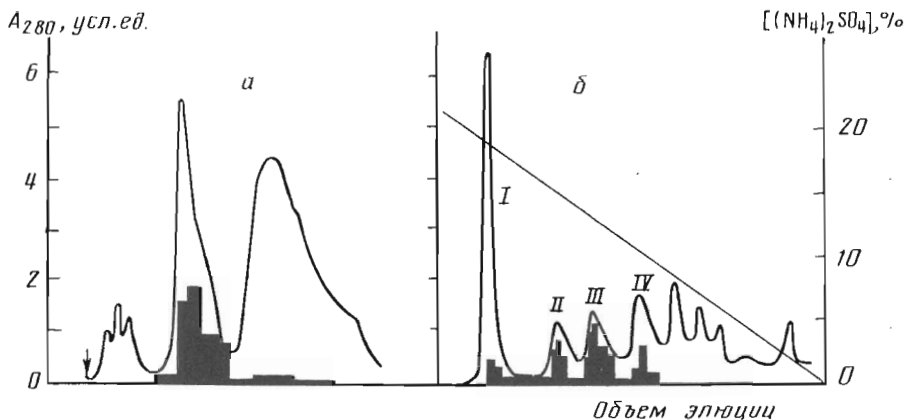


Рис. 1. Очистка щелочной фосфатазы из кишок телянка гель-фильтрацией на Toyopearl HW-45 (а) и хроматографией на октил-силохроме (б). I – гидрофильная, II–IV – гидрофобные фракции. Закрашенными столбиками показаны уровни активности фермента во фракциях. По данным электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS, во фракциях I–IV содержится гомогенная щелочная фосфатаза ( $M_r \approx 70\,000$ )

тическая активность солюбилизированных ферментов при постоянной степени гидратации не должна зависеть от концентрации ПАВ.

Справедливость этого предположения была подтверждена для ряда гидрофильных ферментов, таких, как  $\alpha$ -химотрипсин [11], трипсин [12], липоксигеназа [13], растворимые формы  $\gamma$ -глутамилтрансферазы и аминокептидазы [8].

Однако существует вторая группа ферментов (пероксидаза [14], кислая фосфатаза [15], лакказы [16], мембранные формы  $\gamma$ -глутамилтрансферазы и аминокептидазы [8]), каталитическая активность которых в системах обращенных мицелл существенно зависит от концентрации ПАВ. Причина этого явления, по-видимому, заключается в способности этих ферментов взаимодействовать с мицеллярной матрицей. Дело в том, что для этой группы ферментов характерно наличие в их молекулах якорных групп (углеводной или липидной природы), принимающих участие во взаимодействии таких ферментов с биомембранами. Нами было показано, что искусственное введение гидрофобного якоря (остатка жирной кислоты) в молекулу  $\alpha$ -химотрипсина (фермент первой группы) приводит к появлению зависимости его каталитической активности от концентрации ПАВ, т. е. «превращает» его в фермент второй группы [11].

Рис. 2. Зависимость от степени гидратации ( $w_0 = [\text{H}_2\text{O}]/[\text{AOT}]$ ) удельной максимальной скорости ( $V/[E_0]$ ) гидролиза *n*-нитрофенилфосфата, катализируемого в системе обращенных мицелл АОТ в октано гидрофильной фракцией I (а) и гидрофобной фракцией IV (б) щелочной фосфатазы. Условия определения: 50 мМ карбонатный буфер, pH 11,75;  $[E_0] = 0,5\text{--}5$  мкМ;  $[\text{AOT}]$ , М: 0,038 (1), 0,075 (2), 0,15 (3), 0,3 (4). Приведена шкала радиусов ( $r_c$ ) внутренней полости обращенных мицелл, на которой стрелками отмечены размеры мономера ( $M$ ) и димера ( $M_2$ ) фермента ([21])

Рис. 3. Зависимости от концентрации ПАВ удельной максимальной скорости гидролиза *n*-нитрофенилфосфата, катализируемого в системе обращенных мицелл АОТ в октано гидрофобной фракцией IV щелочной фосфатазы. Условия определения: 50 мМ карбонатный буфер:  $[\text{H}_2\text{O}]/[\text{AOT}] = 25$ ;  $[E_0] = 0,1\text{--}1,0$  мкМ; pH: 9,3 (1), 9,7 (2), 9,9 (3), 10,5 (4), 11,0 (5), 11,75 (6). Зависимости приведены в полугиперболических координатах

Рис. 4. Влияние pH водной фазы на активность гидрофобной фракции IV щелочной фосфатазы (а), выраженную как тангенс угла наклона прямых на рис. 3, и на интенсивность ее флуоресценции (б). Условия определения: среда – обращенные мицеллы АОТ в октано ( $[\text{H}_2\text{O}]/[\text{AOT}] = 25$ ) (1, 4), Бридж 96 в циклогексане ( $[\text{H}_2\text{O}]/[\text{Бридж 96}] = 10$ ) (2) или вода (3),  $\lambda_{\text{возб}} = 290$  нм,  $\lambda_{\text{исп}} = 337$  нм;  $[E_0] = 14$  нМ

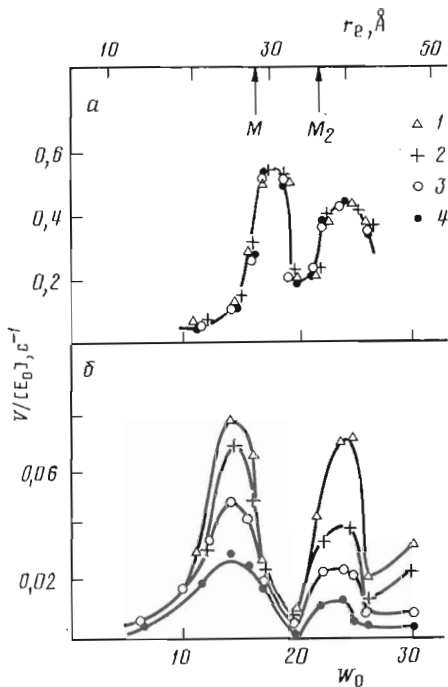


Рис. 2

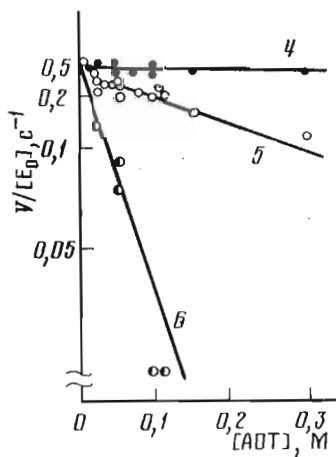
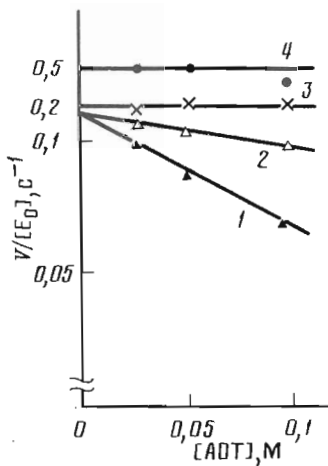


Рис. 3

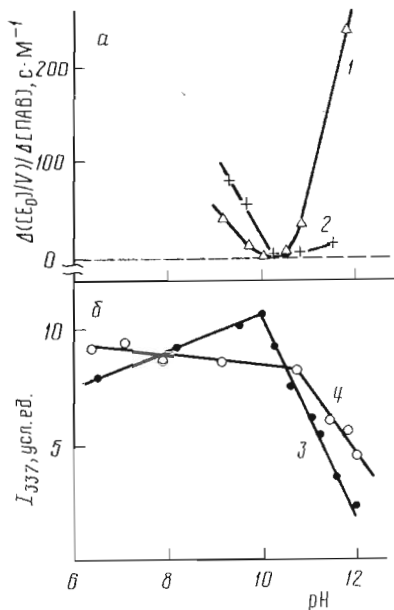


Рис. 4

Таким образом, зависимость каталитической активности от концентрации ПАВ может служить простым информативным тестом на мембранотропность ферментов [8, 11].

Ранее в работе [16] был сделан вывод, что каталитическая активность щелочной фосфатазы из кишечника телянка в системе обращенных мицелл АОТ в октане не зависит от концентрации ПАВ. Вместе с тем хорошо известно, что щелочная фосфатаза — классический мембранный фермент, связанный со щеточной каймой с помощью гидрофобного якоря [17, 18].

Как правило, в препаратах щелочной фосфатазы содержится множество изоформ фермента [19, 20] (как природных, так, по-видимому, и ис-

куственно образовавшихся в процессе выделения). Мы провели очистку коммерческого образца щелочной фосфатазы (препарат фирмы «Sigma») гель-фильтрацией на Toyorearí TSK-45 и гидрофобной хроматографией на октил-силохроме. Оказалось (рис. 1), что в исследованном образце фермента содержится по крайней мере четыре изоформы, различающиеся по гидрофобности.

Вид зависимостей каталитической активности от степени гидратации в системе обращенных мицелл АОТ в октане для этих изоформ оказывается схожим (рис. 2): во всех случаях на этих зависимостях обнаруживаются два максимума. Объяснение такого вида зависимости дано в работе [21]: при варьировании степени гидратации ПАВ происходит изменение надмолекулярной структуры щелочной фосфатазы, и наблюдаемые максимумы соответствуют функционированию мономера и димера фермента [21].

Каталитическая активность наиболее гидрофильной изоформы (фракция I, рис. 1) не зависит от концентрации АОТ (данные не приведены на рисунках). Для остальных (гидрофобных) изоформ (фракции II – IV) обнаруживается зависимость каталитической активности от концентрации АОТ, которая, как следует из проведенного выше обсуждения, указывает на мембранотропность фермента. В отличие от ранее обсуждавшихся случаев на проявление этих зависимостей влияет рН водной микрофазы обращенных мицелл.

В условиях рН-оптимума ферментативной реакции (рН 10,0–10,5), наблюдаемого в водном растворе, каталитическая активность гидрофобных изоформ щелочной фосфатазы не зависит от концентрации ПАВ (рис. 3). Такая зависимость, однако, проявляется в системе обращенных мицелл при рН < 9,7 и рН > 10,5 (рис. 3). Наблюдаемые в этих условиях зависимости линеаризуются в полугиперболических координатах. Тангенс угла наклона соответствующих прямых, характеризующий «чувствительность» фермента к изменению концентрации ПАВ, определяется величиной рН вводимого в мицеллярную систему водного раствора (рис. 4а).

Полученные результаты можно представить в тройной системе координат, в которой по осям отложены каталитическая активность ( $V/[E_0]$ ), степень гидратации  $[H_2O]/[AOT]$  и концентрация ПАВ ( $[AOT]$ ) (рис. 5). При этом зависимости, приведенные на рис. 2, являются соответствующими сечениями поверхностей каталитической активности. В случае немембранной формы щелочной фосфатазы значения каталитической активности при постоянных степенях гидратации не зависят от концентрации ПАВ (рис. 5б).

Следует отметить, что зависимость каталитической активности от концентрации ПАВ, модулируемая рН, обнаруживается для щелочной фосфатазы и в системе обращенных мицелл, образованных неполным ПАВ – бридик 9б в циклогексане (данные не приведены на рисунках). Таким образом, наблюдаемое явление, по-видимому, не может быть объяснено электростатическим взаимодействием фермента с отрицательно заряженными сульфатными группами АОТ.

Мы предполагаем, что при изменении рН происходят изменения конформации щелочной фосфатазы, сопровождающиеся экранированием/экспонированием участков белковой глобулы, обуславливающих взаимодействие этого фермента с мембраной. Действительно, при рН  $\approx 10,0$ –10,5 на зависимостях интенсивности флуоресценции щелочной фосфатазы от рН наблюдается излом, указывающий на конформационный переход в белковой молекуле (рис. 4б).

Отметим, что, согласно данным [22], мембранотропные свойства щелочной фосфатазы, и в частности связанная с ними способность фермента к транспорту фосфата через мембрану, модулируются изменением рН.

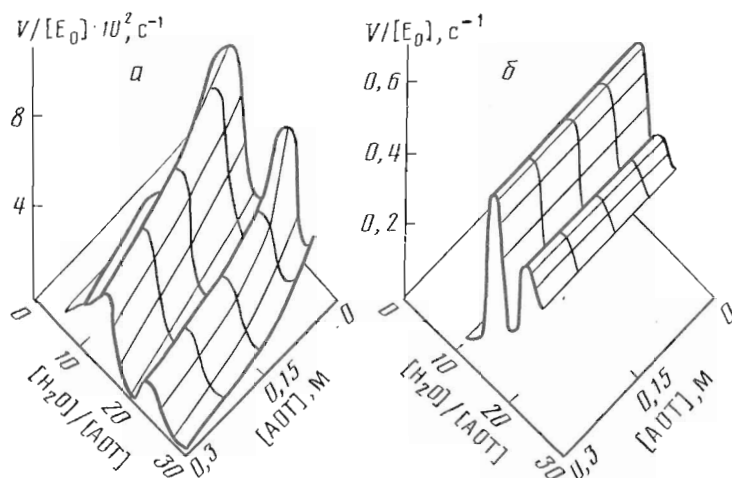


Рис. 5. Зависимости каталитической активности мембранной (а) и немембранной (б) форм щелочной фосфатазы от степени гидратации и концентрации ПАВ при pH буферного раствора 11,75 в тройной системе координат

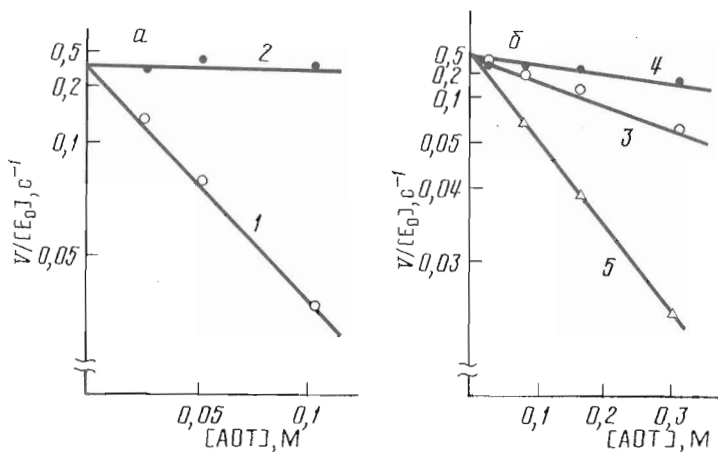


Рис. 6. Зависимости от концентрации ПАВ удельной максимальной скорости ( $V/[E_0]$ ) гидролиза *n*-нитрофенилфосфата, катализируемого в системе обращенных мицелл АОТ и октане гидрофобной фракцией IV щелочной фосфатазы (а) и ферментом, модифицированным остатками стеариновой кислоты (б). Условия определения:  $[H_2O]/[AOT]=25$  (50 мМ карбонатный буфер);  $[E_0]=0,1-1,0$  мкМ. а - pH 11,75, до (1) и после (2) обработки папаином; б - pH 10,0 (3), 10,5 (4), 12,0 (5). Зависимости приведены в полугиперболических координатах

В литературе нет однозначного мнения о природе якоря, удерживающего щелочную фосфатазу на мембранах щеточной каймы. Предполагают, однако, что он образован фосфатидилинозитом, ковалентно присоединенным к белковой глобуле через гликановый мостик [5, 18]. Известно, что обработка мембранных форм ряда ферментов папаином [2, 17] приводит к отщеплению гидрофобного якоря и переходу фермента в растворимую форму. Мы использовали этот метод [2, 17] для перевода щелочной фосфатазы в растворимую форму и убедились, что обработка папаином вызывает исчезновение наблюдаемой для гидрофобных изоформ щелочной фосфатазы зависимости каталитической активности от концентрации ПАВ (рис. 6а). В то же время эта зависимость вновь появляется после перевода обработанного папаином фермента в мембранную форму

путем химической модификации его свободных аминогрупп остатками стеариновой кислоты (рис. 6б). По данным титрования аминогрупп щелочной фосфатазы с помощью TNBS, обработка фермента папаином приводит к появлению дополнительных аминогрупп (общее число их изменяется на 12%) в молекуле белка; именно на столько же уменьшается количество титруемых аминогрупп после модификации стеароилхлоридом. Вероятно, свободные аминогруппы, образующиеся вследствие воздействия папаина, более (либо единственно) доступны при модификации.

Отметим также, что полученная таким образом искусственная гидрофобная форма щелочной фосфатазы проявляет зависимость каталитической активности от концентрации ПАВ во всем исследованном диапазоне pH (10,0–12,0) (рис. 6б). Мы предположили, что остатки стеариновой кислоты на поверхности белковой глобулы не экранируются при изменении pH, как это происходит в случае исходной гидрофобной формы щелочной фосфатазы.

### Экспериментальная часть

Щелочную фосфатазу (КФ 3.1.3.1) из кишок телят (Sigma, США) очищали гель-фильтрацией на Toyorearl TSK-45 и гидрофобной хроматографией на октил-силохроме в 25 мМ карбонатном буфере (pH 5,5). Активность выделенного фермента (I и IV фракции) составляла около 100 ед./мг (одна единица соответствует активности такого количества фермента, которое за 1 мин гидролизует 1 мкмоль *n*-нитрофенилфосфата при pH 10,4 и 25° С).

Аэрозоль ОТ (Merck, ФРГ) использовали без дополнительной очистки. Методом ИК-спектроскопии [14] установлено, что в этом препарате содержалось 0,5 моль воды на 1 моль АОТ.

*n*-Нитрофенилфосфат натрия — препарат фирмы Sigma (США).

Остальные использованные в работе реактивы были отечественного производства.

*Измерение скорости ферментативной реакции в системе обращенных мицелл* [21]. В 2 мл 0,3 М раствора АОТ в октане солюбилизировали 5–20 мкл 5–150 мкМ раствора щелочной фосфатазы и 20–350 мкл 10–250 мМ раствора *n*-нитрофенилфосфата в карбонатном буфере (pH 9,3–12,0). Для получения мицеллярных систем с различными концентрациями АОТ исходный раствор разбавляли октаном.

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, степенях гидратации и концентрациях АОТ.) Использовали спектрофотометр Beckman 25 (США) с термостатируемым кюветным отделением. В работе анализируются значения приведенной максимальной скорости ( $V/[E_0]$ ). Скорость реакции измеряли в условиях насыщения фермента субстратом.

*Обработка щелочной фосфатазы папаином*. К 1 мл 10 мкМ раствора щелочной фосфатазы в 50 мМ трис-HCl-буфере (pH 7,5) добавляли 100 мкл 0,4 мМ раствора папаина (Sigma). После 1 ч инкубации с папаином при 20° С фермент отделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-150.

*Модификация щелочной фосфатазы стеароилхлоридом* [11]. В 10 мл 0,1 М раствора АОТ в октане солюбилизировали 450 мкл 10 мкМ раствора щелочной фосфатазы в боратном буфере (pH 9,5). Систему интенсивно встряхивали до достижения оптической прозрачности и затем добавляли 45 мкл 10 мМ раствора стеароилхлорида в октане. Модифицированный фермент выделяли из системы осаждением уксусом.

*Титрование аминогрупп с помощью TNBS* [23]. К 1 мл 10 мкМ раствора образца в 0,1 М боратном буфере (pH 9,5) добавляли 25 мкл вол-

ного раствора 30 мМ раствора TNBS. После 1 ч инкубации при 25° С определяли изменение оптической плотности при 420 нм. Концентрацию белка определяли по поглощению при 280 нм.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Werner M., Garret C., Chiu A., Klemperer L.* // Clin. Chem. 1982. V. 28. P. 2351-2358.
2. *Maroux S., Louvard D.* // Gastroenterol. Clin. Biol. 1977. V. 1. P. 377-388.
3. *Tate S. S., Meister A.* // Mol. Cell. Biochem. 1981. V. 39. P. 357-368.
4. *Cross G. A. M.* // Cell. 1987. V. 48. P. 179-181.
5. *Low M. G.* // Biochem. J. 1987. V. 244. P. 1-13.
6. *Schmidt M. F. G.* // Curr. Top. Microbiol. Immunol. 1983. V. 102. P. 101-129.
7. *Колесанова Е. Ф., Ротанова Т. В., Америк А. Ю., Гинойдман Л. М., Антонов В. К.* // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 3. С. 340-356.
8. *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.
9. *Structure and Reactivity in Reverse Micelles / Ed. Pileni M. P.* Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo: Elsevier, 1989.
10. *Кабанов А. В., Клячко Н. Л., Пшежецкий А. В., Наметкин С. Н., Мартинек К., Левашов А. В.* // Молекулярн. биология. 1987. Т. 21. Вып. 1. С. 275-286.
11. *Кабанов А. В., Левашов А. В., Мартинек К.* // Вестн. МГУ. Сер. 2. Химия. 1986. Т. 27. С. 591-594.
12. *Левашов А. В., Клячко Н. Л., Пантин В. И., Хмельницкий Ю. Л., Мартинек К.* // Биоорган. химия. 1980. Т. 6. № 6. С. 929-943.
13. *Левашов А. В.* Катализ ферментами в системах обращенных мицелл. Дис. ... докт. хим. наук. М.: МГУ, 1987.
14. *Клячко Н. Л., Левашов А. В., Мартинек К.* // Молекуляр. биология. 1984. Т. 18. № 4. С. 1019-1031.
15. *Левашов А. В., Клячко Н. Л., Пшежецкий А. В., Березин И. В., Котрикадзе Н. Г., Ломсадзе Б. А., Мартинек К.* // Докл. АН СССР. 1986. Т. 289. № 5. С. 1274-1273.
16. *Пшежецкий А. В., Меркер Ш., Клячко Н. Л., Пепанян Г. С., Мартинек К., Левашов А. В.* // Биохимия. 1988. Т. 53. Вып. 6. С. 1013-1016.
17. *Wulkan R. W., Huijskes-Heins M. I. E., Leijnse B.* // Int. J. Biochem. 1986. V. 18. P. 1045-1051.
18. *Seetharam B., Tiruppathi C., Alpers D. H.* // Biochemie. 1985. V. 24. P. 6603-6608.
19. *Fernley N. K.* // The Enzymes. V. 4. 3rd edn./Ed. Boyer P. D. N. Y.: Acad. Press, 1971. P. 417-447.
20. *Herz F.* // Experientia. 1985. V. 41. № 11. P. 1358-1361.
21. *Наметкин С. Н., Кабанов А. В., Клячко Н. Л., Левашов А. В.* // Биоорган. химия. 1991. Т. 17. № 5. С. 606-609.
22. *Hirano K., Inzumi Y., Sugiura M., Mori Y., Toyoshi K., Ino S., Suzuki H., Oda T.* // Chem. Pharm. 1984. V. 32. № 1. P. 198-204.
23. *Habeeb A. F.* // Analyt. Biochem. 1966. V. 14. P. 328.

Поступила в редакцию  
15.XI.1991

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

#### MODULATION OF THE ENZYME'S MEMBRANE ACTIVITY IN THE REVERSED MICELLES SYSTEM BY pH VARIATION (EXAMPLIFIED WITH ALKALINE PHOSPHATASE)

*Division of Chemical Enzymology, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow*

Regulation of the membrane active properties of alkaline phosphatase from calf intestinal mucosa in reversed micelles of Aerosol OT (AOT) in octane was studied. The dependence of the catalytic activity on the surfactant concentration at the constant hydration degree, which characterises the membrane activity of enzymes, is modulated through pH variation. The variation may cause conformational changes of the protein molecule, resulting in exposition of anchor groups which provide the interaction of the enzyme with the micellar matrix.