



УДК 577.152.321.04

© 1993 г. А. В. Пшежецкий, Е. М. Бейер*, О. А. Бунеева*,
М. В. Виноградова, А. В. Левашов**, Г. Я. Видершайн*

ГЛИКОЗИДАЗЫ ЧЕЛОВЕКА В СИСТЕМЕ ОБРАЩЕННЫХ МИЦЕЛЛ ПАВ: ОСОБЕННОСТИ СВОЙСТВ И КИНЕТИЧЕСКИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ КАТАЛИЗА

НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ;

Институт биологической и медицинской химии РАМН, Москва;

*** Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, химический факультет*

Кинетические закономерности катализа лизосомными гликозидазами реакций гидролиза их синтетических субстратов исследованы в системах обращенных мицелл анионного ПАВ — аэрозоля ОТ — в октане. Установлено, что все исследованные ферменты (G_{M1} -галактозидаза, гексозаминидазы А и Б, сиалидаза, фукозидаза, галактоцеребросидаза) проявляют в системе обращенных мицелл каталитическую активность, равную или большую их активности в водных буферных растворах. В то же время в обращенных мицеллах наблюдается эффективное ингибирование ферментов продуктами реакции — углеводами. Обнаружено, что зависимости удельной активности гликозидаз от степени гидратации мицелл представляют собой кривые с одним или несколькими максимумами, отражающими образование различных олигомерных форм ферментов. Установлено, что зависимость от степени гидратации эффективного значения K_m катализируемых реакций, определенного в расчете на объем водной микрофазы системы, как правило, повторяет ход зависимости от того же параметра максимальной скорости реакции, что, по-видимому, объясняется соответствующим изменением локальных значений концентрации субстрата в области активного центра фермента. Исследовано влияние концентрации ПАВ на каталитическую активность фермента в системе обращенных мицелл. Установлено, что каталитическая активность гликозидаз, распределенных в цитозольной фракции при дифференциальном центрифугировании клеточного материала, не зависит от концентрации мицелл. Каталитическая активность мембранной гликозидазы — галактоцеребросидазы — существенно возрастает по мере уменьшения концентрации мицелл в системе. В оптимальных условиях активность галактоцеребросидазы в обращенных мицеллах в 10 раз превышает уровень активности фермента в водных буферных растворах.

О-Гликозидазы (КФ 3.2.1) составляют большую группу гидролитических ферментов, катализирующих расщепление углеводов и углеводсодержащих биополимеров (гликоконъюгатов). Наследственная недостаточность активности той или иной лизосомной гликозидазы или белковых факторов, необходимых для нормального функционирования этих ферментов, приводит к возникновению у человека ряда тяжелых наследственных болезней — так называемых лизосомных болезней накопления [1—3]. В силу этого исследование организации, механизмов функционирования и регуляции гликозидаз является исключительно актуальной задачей.

Большинство гликозидаз в клетке функционирует в лизосомном матриксе, который по своим физико-химическим свойствам существенно отличается от водной среды [4]. Величина рН внутри лизосом колеблется обычно в пределах

Сокращения: ПАВ — поверхностно-активное вещество; аэрозоль ОТ (АОТ) — натриевая соль ди-2-этилгексилевого эфира сульфогтарной кислоты; MUF — 4-метилумбеллиферон; HNMuf — 6-гексадеканоиламино-4-метилумбеллиферон.

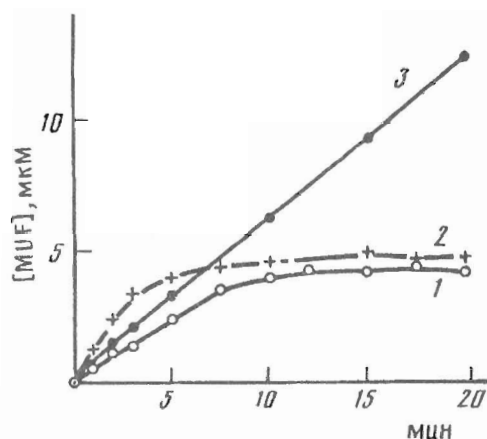


Рис. 1. Кривые накопления 4-метилумбеллиферона в реакции гидролиза GalMuf, катализируемой G_{M1} -галактозидазой в составе галактосиалидазного комплекса в системе обращенных мицелл АОТ со степенью гидратации 30 (1), 38 (2), а также в водном буферном растворе (3). Конечные концентрации реагентов в инкубационной смеси: 100 мМ ацетат-фосфат-цитратный буфер, рН 3,0—4,75, субстрат — 50 мкМ, фермент — 40 мкг/мл (в водной фазе), 0,1 М АОТ в октано. Температура 37° С

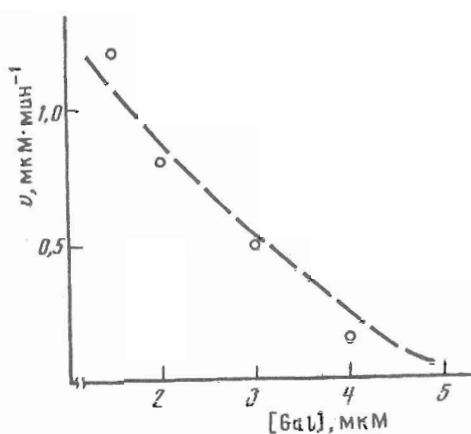


Рис. 2. Зависимость начальной скорости реакции гидролиза GalMuf, катализируемой G_{M1} -галактозидазой в составе галактосиалидазного комплекса в системе обращенных мицелл АОТ со степенью гидратации 38, от концентрации в системе D-галактозы. Светлые кружки — экспериментальные данные, штриховая линия — теоретическая зависимость, рассчитанная на основании кинетической кривой гидролиза GalMuf (рис. 1, кривая 2). Условия эксперимента см. в подписи к рис. 1

4,5—5,0, что значительно ниже рН в цитоплазме клетки [5]. Наконец, согласно последним данным [6—10], гликозидазы могут образовывать в лизосоме белок-белковые и белок-липидные ансамбли, каталитические свойства которых также во многом отличаются от свойств индивидуальных ферментов. В силу перечисленных обстоятельств изучение выделенных и очищенных гликозидаз в водных буферных растворах далеко не всегда дает адекватное представление об их функционировании *in vivo*.

Для моделирования в экспериментах *in vitro* различных параметров микроокружения ферментов в клетке в последние годы разработан ряд экспериментальных подходов. В частности, в качестве одной из модельных систем в настоящее время широко используются гидратированные обращенные мицеллы поверхностно-активных веществ в неполярных органических растворителях [11—15]. Использование систем обращенных мицелл ПАВ позволяет моделировать ряд факторов, характерных для микроокружения гликозидаз в лизосомах клетки: микрокомпарментализацию системы, наличие контакта с липидной матрицей, характерные значения рН и ионной силы среды. Благодаря использованию данного подхода нам удалось выявить ряд новых свойств гликозидаз, а именно: установить существование комплекса между гексозаминидазами А и В [16—17], исследовать влияние лизосомной карбоксипептидазы (протекторного белка) на прочность ассоциации G_{M1} -галактозидазы и сиалидазы в мультиферментном галактосиалидажном комплексе [18], показать, что гликолипиды могут влиять на каталитическую активность и олигомерную структуру α -L-фукозидазы [19].

Настоящая работа посвящена исследованию кинетических закономерностей катализа лизосомными гликозидазами в системах обращенных мицелл ПАВ.

Гидролиз 4-метилумбеллиферилгликопиранозидов в системах обращенных мицелл

На рис. 1 приведены кинетические кривые реакций гидролиза GalMuf, катализируемого G_{M1} -галактозидазой (КФ 3.2.1.23) в системе обращенных мицелл АОТ в октано при различных степенях гидратации (W_0 — молярные отношения

$[H_2O]/[AOT]$) (кривые 1 и 2) и в водном буферном растворе (кривая 3). Видно, что, хотя начальная скорость образования продукта — 4-метилумбеллиферона — в системах обращенных мицелл может быть существенно выше, чем в водном буферном растворе (ср. кривые 2 и 3), в течение 10—15 мин в мицеллярных системах происходит снижение скорости образования продукта практически до нуля. Степень гидролиза субстрата в мицеллярных системах, как правило, не превышает 10%. Аналогичный вид зависимостей накопления продукта от времени характерен и для других исследованных гликозидаз: гексозаминидаз А и Б (КФ 3.2.1.30), сиалидазы (КФ 3.2.1.18), фукозидазы (КФ 3.2.1.51), галактоцереброзидазы (КФ 3.2.1.46). Подобный характер кинетики накопления продукта может быть в принципе объяснен рядом факторов, и в том числе быстрой инактивацией фермента в обращенных мицеллах или ингибированием фермента продуктами реакции.

Для проверки предположения об инактивации фермента нами были проведены эксперименты по инкубированию фермента в системе обращенных мицелл при различных значениях степени гидратации (w_0) в течение 30, 60 и 180 мин. После инкубирования реакцию инициировали внесением микролитровых количеств раствора субстрата. Во всех случаях кривые накопления продукта были идентичны полученным в том случае, когда реакцию инициировали внесением в систему фермента (рис. 1). На основании этих данных предположение об инактивации гликозидаз в системе обращенных мицелл было нами отвергнуто.

Известно, что моносахариды могут являться ингибиторами соответствующих гликозидаз. В системе обращенных мицелл в силу эффекта микроконцентрирования образующихся в результате реакции сахаров в полярной внутренней полости обращенных мицелл эффект ингибирования может быть усилен. Для проверки этого предположения были определены начальные скорости гидролиза GalMuf в системах обращенных мицелл в присутствии различных концентраций продукта реакции — *D*-галактозы (рис. 3). В присутствии микромолярных концентраций галактозы в системах обращенных мицелл наблюдается существенное ингибирование G_{M1} -галактозидазы, причем экспериментально определенные значения начальной скорости реакции хорошо описываются теоретической кривой, рассчитанной на основании кривой 2 (рис. 1). С другой стороны, после практически полной остановки процесса гидролиза субстрата (40 мин инкубации) реакция может быть снова инициирована разбавлением системы раствором субстратсодержащих обращенных мицелл с той же степенью гидратации. Полученные данные позволяют заключить, что в обращенных мицеллах происходит эффективное ингибирование гликозидаз углеводными продуктами реакции.

*Зависимость каталитической активности гликозидаз
в системах обращенных мицелл от степени гидратации*

На рис. 3 приведены зависимости удельной каталитической активности гликозидаз в системе обращенных мицелл от степени гидратации — параметра, определяющего размеры обращенных мицелл в системе. Как видно, для всех ферментов эти зависимости имеют вид кривых с одним или несколькими максимумами. Именно такой вид зависимости активности от w_0 характерен для большинства ферментов, исследованных в системах обращенных мицелл [15, 20]. При этом максимальная каталитическая активность фермента, как правило, проявляется в том случае, когда фермент включен в мицеллу, размеры внутренней водной полости которой совпадают с размерами глобулы фермента [15, 20]. Обнаруженная закономерность выполняется и в случае гликозидаз. Как видно из рис. 4, молекулярные массы гликозидаз, определенные нами на основании данных SDS-электрофореза или гель-фильтрации, хорошо коррелируют с теоретически рассчитанными [15, 20] молекулярными массами белков, радиусы которых

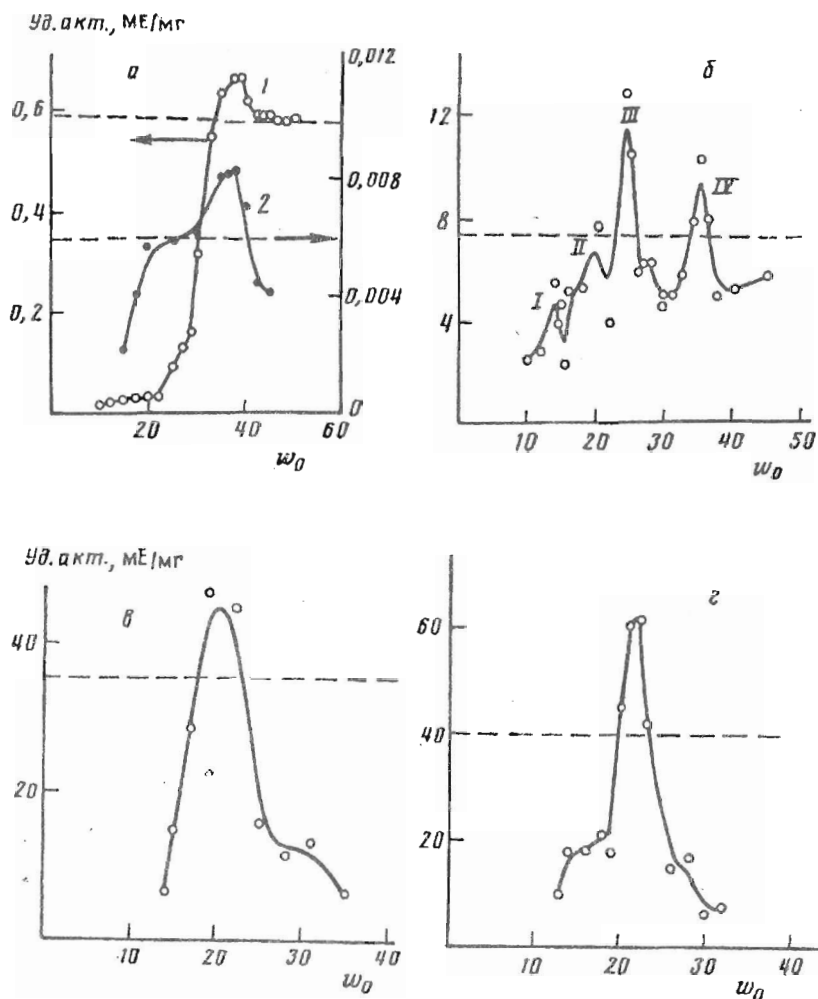


Рис. 3. Зависимость удельной активности Σ MI-галактозидазы (1) и сиалидазы (2) в составе галактосиалидазного комплекса (а), α -L-Фукозидазы (б), гексозаминидазы А (в) и гексозаминидазы Б (г) в системе обращенных мицелл АОТ в октане от степени гидратации. Штриховыми линиями показаны уровни удельной каталитической активности ферментов в водных буферных растворах. Условия экспериментов: ферменты 10—50 мкг/мл водной фазы, концентрации субстратов варьировали в диапазоне 6,25—125 мкМ, 0,1 М АОТ. Прочие условия см. в подписи к рис. 1

совпадают с радиусами внутренней полости мицеллы при «оптимальных» степенях гидратации.

Для объяснения причин активации фермента в условиях, когда он солюбилизован в комплементарной внутренней полости обращенной мицеллы, в работе [15] было выдвинуто предположение о фиксации в данных условиях его каталитически активной конформации. Такой эффект, в частности, был экспериментально обнаружен методом ЭПР для солюбилизованных в мицеллярных системах α -химотрипсина [21, 22], щелочной и кислой фосфатаз [22].

В контексте настоящей работы представляется наиболее важным то, что анализ зависимостей каталитической активности ферментов от степени гидратации системы позволяет получать информацию о размерах их каталитически активных форм. Так, максимальная каталитическая активность Σ MI-галактозидазы и сиалидазы в обращенных мицеллах наблюдается при значении $\omega_0 = 38$ (рис. 3а).

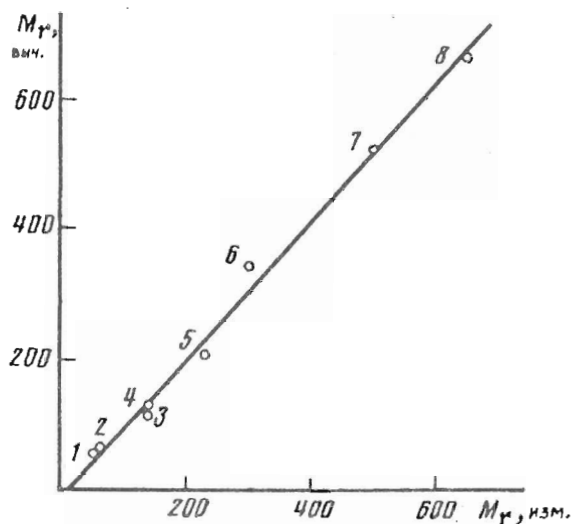


Рис. 4. Корреляция между вычисленными [15, 20] (прямая) и экспериментально определенными методами SDS-электрофореза (э) или гель-фильтрации (г-ф) (точки) значениями M гликозидаз: 1 — мономер α -L-фукозидазы (э), 2 — мономер Σ MI-галактозидазы (э и г-ф), 3 — гексозаминидаза А (э и г-ф), 4 — гексозаминидаза Б (э и г-ф), 5 — тетрамер α -L-фукозидазы (г-ф), 6 — комплекс гексозаминидаз А и Б (г-ф), 7 — октамер α -L-фукозидазы (г-ф), 8 — галактосиалидазный комплекс (г-ф). Вычисленное значение коэффициента корреляции между величинами составляет 0,98

В этих условиях радиус внутренней водной полости мицелл соответствует радиусу белка с M 650 кДа (рис. 4). Это значение полностью соответствует значению M , определенному для мультиферментного комплекса лизосомных гликозидаз, в состав которого входят Σ MI-галактозидаза, сиалидаза, а также лизосомная карбоксипептидаза (катепсин А) [6,7].

Одним из наиболее ярких эффектов, обнаруженных при исследовании олигомерных ферментов (белков) в обращенных мицеллах ПАВ в органических растворителях, является возможность получать и исследовать их различные олигомерные структуры [23]. Во внутренней полости обращенной мицеллы в зависимости от ее размеров, определяемых значением η_0 , может собираться та или иная олигомерная структура фермента [16—19, 23—26]. В этом случае на кривой зависимости каталитической активности от η_0 прослеживается несколько максимумов, соответствующих различной олигомерной организации фермента.

Описанное варьирование олигомерной структуры реализуется в обращенных мицеллах, например, для α -L-фукозидазы, зависимость каталитической активности которой от η_0 (рис. 3б) представляет собой кривую с четырьмя максимумами при $\eta_0 = 14$ —16, 19—20, 24—26 и 34—35. При этих значениях η_0 величины радиуса внутренней водной полости обращенной мицеллы равны 25—28, 32—34, 40—43 и 55—57 Å, что соответствует белкам с M 50—60, 100—120, 200—230 и 480—500 кДа. Исходя из того, что молекулярная масса одной субъединицы фукозидазы равна 53 кДа, можно заключить, что при степени гидратации 10—16 обращенные мицеллы содержат мономеры, при 19—20 — димеры, при 24—26 — тетрамеры, а при 34—35 — октамеры фермента. Из соотношения величин максимумов I и III на рис. 3б следует, что удельная активность тетрамера фермента в обращенных мицеллах в оптимальных условиях ($\eta_0 = 25$) более чем в 3 раза выше удельной активности его мономеров. Данные кинетических экспериментов полностью подтверждаются результатами ультраседиментационного анализа фукозидазы, солюбилизованной в системе обращенных мицелл.

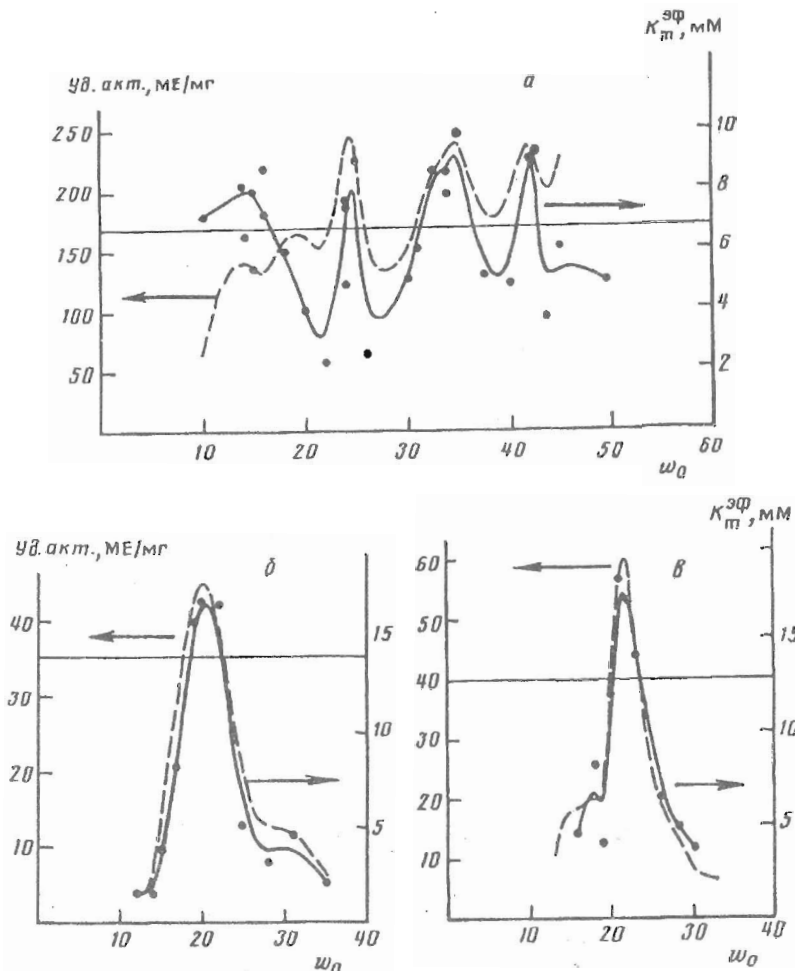


Рис. 5. Зависимость от степени гидратации значения эффективной константы Михаэлиса в расчете на объем водной фазы ($K_m^{эф}$) и удельной активности (штриховые кривые) α -L-фукозидазы в составе гликопротеиновой фракции (а), гексозаминидазы А (б), гексозаминидазы Б (в) в системе обращенных мицелл АОТ в октано. Горизонтальной линией на рисунках показаны уровни удельной каталитической активности ферментов в водных буферных растворах. Условия эксперимента см. в подписи к рис. 3

Зависимость эффективного значения константы Михаэлиса реакций, катализируемых гликозидазами в системе обращенных мицелл, от степени гидратации

Большинство проводимых ранее исследований кинетических закономерностей катализа ферментами в системах обращенных мицелл [11--15], как правило, ограничивалось исследованием эффектов, связанных с изменениями величины каталитической константы (удельной каталитической активности) ферментов. Причина этого связана, в первую очередь, со сложностью анализа значений K_m в обращенных мицеллах, так как измеряемые величины эффективны и зависят от локального распределения субстрата внутри обращенных мицелл.

Для всех исследованных гликозидаз зависимости от ω_0 эффективного значения K_m реакции в расчете на объем водной фазы в системе ($K_m^{эф}$) симпатны зависимостям от того же параметра удельной активности ферментов. Возрастание

значения $K_m^{\text{эф}}$ в условиях, когда фермент включен в комплементарную полость обращенной мицеллы (рис. 5), могло бы быть объяснено возникновением затруднений в массопереносе субстрата, в особенности проявляющихся в условиях, когда объем внутренней водной полости мицеллы заполнен белковой глобулой. Иными словами, локальные концентрации субстрата вблизи активного центра фермента могут в этом случае существенно изменяться. Следует также учитывать возможное влияние на величину константы связывания повышенной жесткости (фиксированности) в данных условиях каталитически активной конформации фермента [21, 22].

Вне зависимости от механизма, лежащего в основе изменения K_m , одновременный анализ зависимостей $K_m^{\text{эф}}$ и k_{cat} от ω_0 позволяет более эффективно определять оптимальные для фермента значения ω_0 и тем самым делать более обоснованные выводы о надмолекулярной структуре фермента.

*Зависимость каталитической активности фермента
в системах обращенных мицелл от концентрации ПАВ*

Варьирование в системе концентрации ПАВ при сохранении постоянным значения ω_0 приводит к изменению концентрации одинаковых мицелл [11, 15]. Вследствие этого такое изменение не должно сказываться на уровне активности солиобилизованного фермента. В действительности же обнаруживаются две основные группы ферментов.

Каталитическая активность ферментов первого класса не зависит от концентрации мицелл [15]. Каталитическая активность ферментов второго класса изменяется обратно пропорционально концентрации ПАВ [15].

Все мембранные ферменты, исследованные в обращенных мицеллах: кислая фосфатаза [27], γ -глутамилтрансфераза и аминопептидаза [28], простагландин-Н-синтетаза [29], — согласно описанному критерию, относятся ко 2-й группе. С другой стороны, типичные цитозольные и свободно диффузионные ферменты: трипсин, пепсин, α -химотрипсин, — относятся к первой группе [15]. Отщепление от мембранного фермента (аминопептидазы) домена, ответственного за связывание с мембранами, приводит к тому, что его каталитическая активность перестает зависеть от концентрации мицелл [28], а искусственно гидрофобизованный остатками стеариновой кислоты α -химотрипсин, способный связываться с липидной мембраной, относится ко 2-й группе ферментов [30].

Результаты дифференциального центрифугирования клеточного материала (рис. 6) свидетельствуют о том, что среди исследованных гликозидаз четыре (G_m1 -галактозидаза, гексозаминидазы А и Б, фукозидаза) на 90—97% локализованы в растворимой фракции лизосом. Сиалидаза обнаруживается как в мембранной, так и в растворимой фракциях, причем сиалидаза, связанная с G_m1 -галактозидазой в мультиферментном комплексе, на 95% оказывается локализованной в растворимой фракции. Галактоцереброзидаза практически полностью локализована во фракции лизосомных мембран и требует для своей солиобилизации присутствия в буфере детергентов (0,02% Тритон X-100 в наших экспериментах).

Зависимости каталитической активности от концентрации мицелл для этих гликозидаз представлены на рис. 7. Как видно, каталитическая активность ферментов растворимой лизосомной фракции: G_m1 -галактозидазы, гексозаминидазы А и Б, фукозидазы, а также водорастворимой формы сиалидазы, связанной с G_m1 -галактозидазой в мультиферментном комплексе, — не зависит от концентрации мицелл. Максимальные значения активности этих ферментов в мицеллах (для исследования зависимости активности от концентрации ПАВ были выбраны оптимальные значения ω_0) составляют 100—160% от уровня их активности в водном буфере. Резко отличная картина обнаруживается для мембранной гликозидазы — галактоцереброзидазы (рис. 7, кривая 5). Каталитическая активность этого фермента изменяется обратно пропорционально концентрации ПАВ в системе

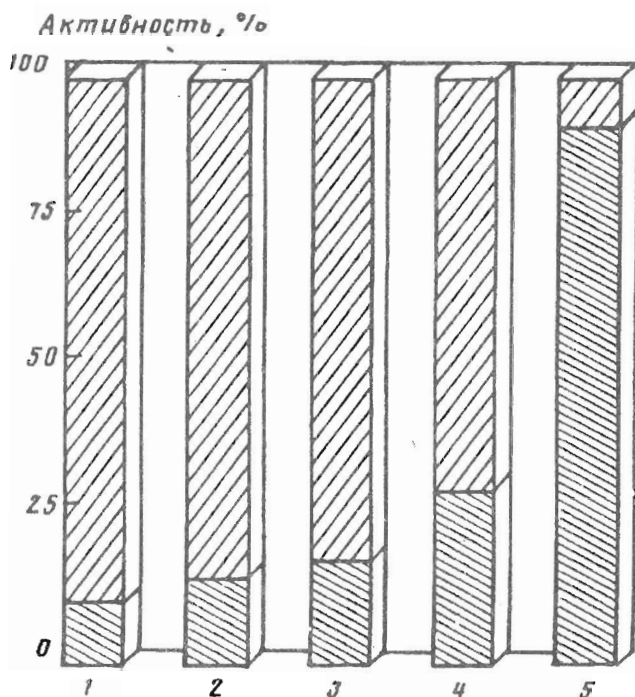


Рис. 6. Распределение активности гликозидаз в мембранной и цитозольной фракциях (частая и редкая штриховка соответственно) при ультрацентрифугировании гомогената почек человека, 1 — комплекс гексозаминидаз А и В, 2 — α -L-фукозидаза, 3 — β -маннозидаза, 4 — сиалидаза, 5 — галактоцереброзидаза. Условия эксперимента: гомогенат почек человека центрифугировали при 4° С (100 000g, 60 мин) в тройном объеме буфера А. Измерение активности гликозидаз проводили как описано в «Экспериментальной части». Долю активности в осадке определяли по разности активности в гомогенате и супернатанте

(так же, как и у других ферментов, принадлежащих ко 2-й группе). Удельная активность фермента в системах с низкой концентрацией ПАВ (12,5 мМ) на порядок превосходит уровень каталитической активности фермента в водном растворе. Не исключено, что обнаруженная активация галактоцереброзидазы в обращенных мицеллах, моделирующих мембранное микроокружение ферментов [11], заслуживает внимания в связи с возможностью осуществления аналогичного явления *in vivo* при взаимодействии этого фермента с липидами биомембран.

Экспериментальная часть

Аэрозоль ОТ (Merck, ФРГ) использовали без дополнительной очистки. Методом ИК-спектроскопии было установлено, что препарат содержал 0,5 моль H_2O на 1 моль АОТ. В качестве субстратов при определении каталитической активности ферментов использовали 4-метилумбеллиферил- β -D-галактопиранозид (GalMuf), 4-метилумбеллиферил- α -L-фукопиранозид, (4-метилумбеллиферил)-2-ацетамидо-2-дезоксид- β -D-глюкопиранозид (Serva, ФРГ) и (4-метилумбеллиферил)- α -D-N-ацетилнейраминид, Na-соль (Koch-Light, Великобритания) для определения активности β -маннозидазы, фукозидазы, гексозаминидазы и сиалидазы соответственно, а также синтезированный И. К. Козловой (лаборатория биохимических основ наследственных заболеваний Института биологической и медицинской химии РАН) 6-гексадеканоиламино-4-метилумбеллиферил- β -D-галактопиранозид (GalHNMuf) для определения активности галактоцереброзидазы [31, 32]. Для хроматографии применяли сефакрил S-300, конканавалин-А-сефарозу,

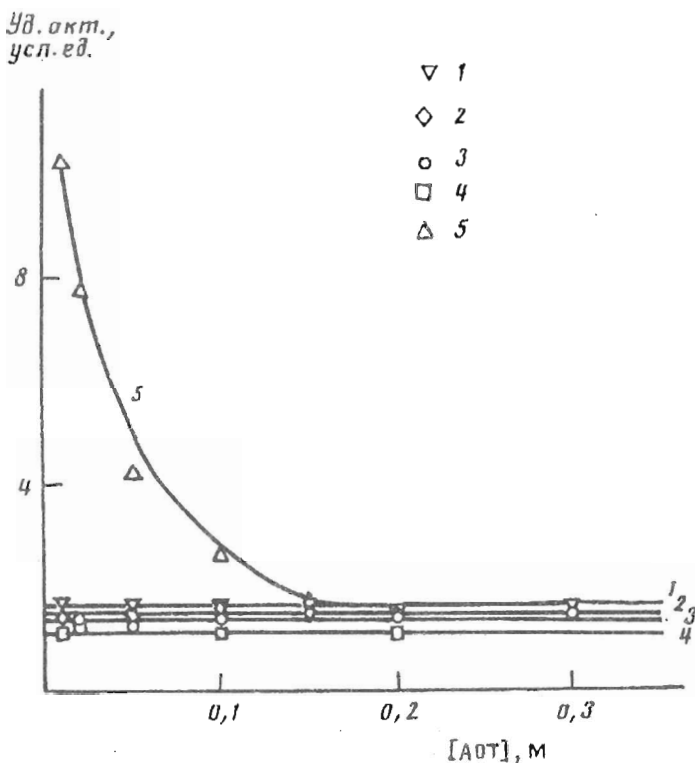


Рис. 7. Зависимость удельной активности комплекса гексозаминидаз А и Б (1), фукозидазы (2), сиалидазы (3) и G_{M1} -галактозидазы (4) в составе галактосиалидазного комплекса, а также галактоцереброзидазы (5) в системе обращенных мицелл АОТ в октане от концентрации АОТ при значениях ω_0 , равных 30 (1), 24 (2), 38 (3, 4) и 40 (5). Условия эксперимента см. в подписи к рис. 1

DEAE-сефарозу и ультрагель АсА-34 (Pharmacia-LKB, Швеция). Для гель-фильтрации использовали колонку К 16×100 (Pharmacia). Фукозиламиносефароза была приготовлена в лаборатории органического синтеза Института биологической и медицинской химии РАМН [33]. Октан (Реахим) очищали по методике, описанной в работе [34]. Прочие реагенты были отечественного производства марок х. ч. и ч. д. а.

Выделение и очистка ферментов. Схема выделения и очистки гликозидаз представлена на рис. 8. Все стадии проводили при 4° С. Ткань почки человека (200 г) из материалов аутопсии, отделенную от жира, после предварительного грубого измельчения гомогенизировали в тройном объеме 0,02 М ацетатного буфера, рН 4,75, содержащего 0,15 М NaCl и 0,02% NaN₃ (буфер А), в гомогенизаторе Уоринга в течение 10—15 мин. Гомогенат центрифугировали 60 мин при 100 000 g. Осадок вторично гомогенизировали в тройном объеме буфера А и центрифугировали в тех же условиях. Осадок использовали в дальнейшем для выделения мембранной гликозидазы — галактоцереброзидазы, а супернатанты 1 и 2 объединяли и наносили на колонку с конканавалин-А-сефарозой (20 мл), предварительно уравновешенной буфером А, содержащим дополнительно CaCl₂, MgCl₂ и MnCl₂, каждый в концентрации 1 мМ. После пропускания гомогената колонку промывали 40 объемами буфера А, содержащего 1 М NaCl. Ферменты элюировали 0,75 М метилманнозидом в буфере А со скоростью 1 мл/ч·см². Суммарную фракцию гликопротеинов, содержащую исследуемые гликозидазы, диализовали на ультрафильтрационной ячейке фирмы Amicon с мембраной РМ-30 против 20 мМ ацетатного буфера, рН 4,75, содержащего 0,75 М NaCl, и

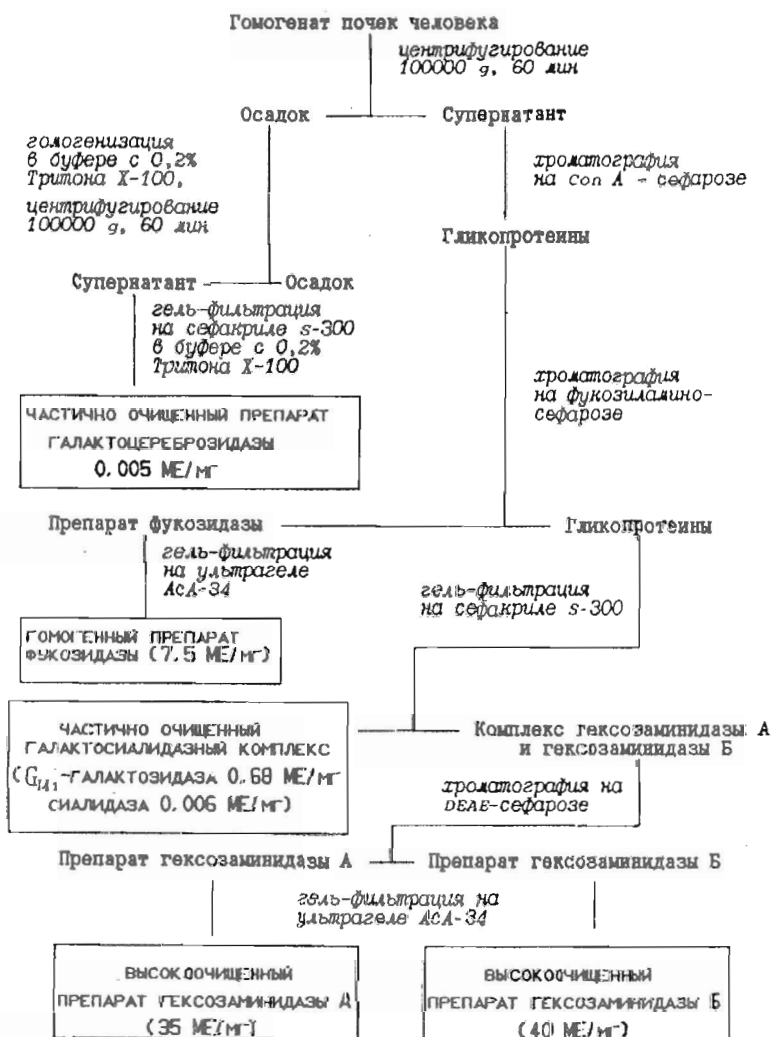


Рис. 8. Схема выделения и очистки используемых в работе препаратов гликозидаз. В скобках приведены значения удельной активности ферментов (ME/мг)

концентрировали до объема 5 мл. Препарат инкубировали 90 мин при 37° С, чтобы стабилизировать сиалидазную активность [6, 7]. Препарат полностью сохраняет гликозидазные активности при хранении при 4° С в течение месяца.

Полученный препарат наносили на колонку (50 мл) с фукозиламиносефарозой [33], уравновешенной тем же буфером, промывали 20 объемами буфера, после чего α -L-фукозидазу смывали приблизительно 40 мл буфера А, содержащего дополнительно 1% фукозы. Скорость элюции была 8 мл/ч. Очищенный препарат концентрировали до объема 2 мл и наносили на колонку с ультрагелем АСА-34, уравновешенным буфером А (скорость элюции 7 мл/ч). Фермент элюировался в виде симметричного пика в объеме, соответствующем объему элюции белка с M 210—230 кДа.

После удаления фукозидазы сумарный препарат гликопротеиновой фракции подвергали гель-фильтрации на сефакриле S-300, уравновешенном буфером А (скорость элюции 7,5 мл/ч). Эта процедура приводила к разделению галакто-сиалидазного комплекса (M 650 кДа) и комплекса нейрамидаз А и Б (M

280—300 кДа) [16, 17]. Фракции, проявляющие β -D-галактозидазную активность, объединяли и препарат использовали для кинетических экспериментов. Для проведения экспериментов по ультраседиментации полученный препарат подвергали дальнейшей очистке, для чего диализовали против 20 мМ ацетатного буфера, pH 4,75, и наносили на колонку с CM-сефарозой (30 мл), уравновешенной тем же буфером. Фермент элюировали линейным градиентом NaCl (0—0,2 М, 400 мл) со скоростью 9 мл/ч·см². Фракции, проявляющие β -D-галактозидазную активность, концентрировали до объема 1 мл на ультрафильтрационной ячейке с мембраной XM-100 и подвергали гель-фильтрации на ультрагеле АсА-34, уравновешенном буфером А. Фермент элюировался в виде симметричного пика в объеме, соответствующем объему элюции белка с M 650—660 кДа. Определение состава препарата проводили с помощью SDS-электрофореза по методу Лэммли [35] с использованием градиентного (5—15%) полиакриламидного геля. Результаты SDS-электрофореза полученного препарата позволяют утверждать, что он представляет собой частично очищенный (чистота 50—60%) комплекс, в состав которого входят субъединицы GM1-галактозидазы, сиалидазы, а также «протекторный» гликопротеин — карбоксипептидаза L.

Фракции, содержащие гексозаминазную активность, диализовали против 20 мМ фосфатного буфера, pH 6,8, и наносили на колонку с DEAE-сефарозой (30 мл), уравновешенной тем же буфером. Фермент элюировали линейным градиентом NaCl (0—0,4 М, 400 мл) со скоростью 10—12 мл/ч·см². В этих условиях в начале градиента элюируется гексозаминидаза Б, в конце — гексозаминидаза А.

Фракции, в которых обнаруживали гексозаминазные активности, собирали, диализовали против буфера А, концентрировали до объема 1 мл на ультрафильтрационной ячейке с мембраной PM-30 и подвергали гель-фильтрации на ультрагеле АсА-34, уравновешенном буфером А. Гексозаминазы А и Б элюировались в виде симметричных пиков в объеме, соответствующем объему элюции белка с M 140 кДа. Согласно данным SDS-электрофореза полученных препаратов, чистота гексозаминаз составляет 60—70%.

Для выделения галактоцереброзидазы осадок, полученный после второго центрифугирования (см. выше), гомогенизировали 10—15 мин в тройном объеме буфера А, содержащего дополнительно 0,2% Тритон X-100, в гомогенизаторе Уоринга. Гомогенат центрифугировали 60 мин при 100 000g. Осадок отбрасывали, а супернатант фильтровали, концентрировали ультрафильтрацией (мембрана PM-30) и подвергали гель-фильтрации на сефакриле S-300, уравновешенном буфером А, содержащим 0,2% Тритона X-100. Фракции, обладающие галактоцереброзидазной активностью, объединяли и использовали в дальнейшей работе.

Ферментативную активность определяли флуориметрически с применением в качестве субстратов 4-метилумбеллиферил-производных гликопиранозидов (см. выше), используя спектрофлуориметр Shimadzu RF 5000. 5—10 мкл раствора фермента с концентрацией 200—500 мкг/мл вносили в 90—95 мкл раствора субстрата с концентрацией 0,05—2,5 мМ и инкубировали 3—5 мин при 37° С. Реакцию останавливали внесением 1,9 мл 0,4 М глицинового буфера, pH 10,5, и определяли концентрацию выделившегося продукта (λ_{ex} 365, λ_{em} 450 нм). В предварительных экспериментах убеждались, что выбранные условия соответствуют стационарной кинетике ферментативной реакции. GalHNМuf для определения активности галактоцереброзидазы предварительно солибилизовали следующим образом: в стеклянном гомогенизаторе смешивали 3 мл смеси хлороформ — метанол (2 : 1), 2,5 мг GalHNМuf, 10 мг таурохолата натрия (Fluka) и 0,06 мл 1% раствора олеиновой кислоты в гексане; смесь упаривали в токе азота при 35—40° С, остаток растворяли в 2 мл 0,1 М ацетатного буфера, pH 4,75, при перемешивании и нагревании до 50° С [31, 32].

В системе обращенных мицелл АОТ в октане активность гликозидаз определяли согласно следующей методике. В типичном эксперименте 5—10 мкл раствора фермента с концентрацией 200—500 мкг/мл и 20—200 мкл 100 мМ цитрат-аце-

тат-фосфатного буфера (рН 3,0—5,0) (буфер С) солиобилизовали в 2 мл раствора АОТ в октане. Реакцию инициировали внесением 5—100 мкл 1—2,5 мМ раствора субстрата в буфере С. В специальных экспериментах было показано, что скорость ферментативной реакции не зависела от порядка внесения реагентов. После инкубации в течение 1—20 мин при 37°С реакцию останавливали внесением в среду 10—15 мкл 1 М раствора КОН в метаноле и определяли концентрацию выделившегося продукта — 4-метилумбеллиферона.

Молярная интенсивность флуоресценции 4-метилумбеллиферона в системах обращенных мицелл специально измерялась нами для всех используемых значений μ_0 , рН буфера и концентрации АОТ. Как было установлено, молярная интенсивность флуоресценции продукта (λ_{ex} 365 нм, λ_{em} 450 нм) в среде обращенных мицелл после добавления 10—15 мкл 1 М раствора КОН в метаноле совпадает с молярной интенсивностью флуоресценции в глициновом буфере при рН 10,5.

Максимальные скорости ферментативных реакций (V) определяли с помощью статистического компьютерного анализа зависимостей начальных скоростей ферментативной реакции от концентрации субстрата по методу нелинейной регрессии. Для того чтобы избежать возможного искажения результатов из-за локального сдвига рН во внутренней полости обращенных мицелл, изучали рН-зависимости максимальной скорости для каждого значения степени гидратации системы. В работе обсуждаются только рН-независимые значения ферментативной активности. За единицу ферментативной активности (1 ME) принимали количество фермента, которое гидролизует 1 мкмоль субстрата в течение 1 мин.

Аналитическое ультрацентрифугирование в системах обращенных мицелл осуществляли на центрифуге Beckman E с ротором Ap-6-Ti на скорости 30 000 и 24 000 об/мин. Сканирование белоксодержащих обращенных мицелл проводили при длине волны 280 нм. Коэффициенты седиментации определяли из экспериментальных данных и анализировали как описано ранее [36].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sandhoff K., Schwarzmann G., Sarmientos F., Conzelmann E. // NATO ASI Series 1987. V. H7. P. 231—250.
2. The Metabolic Basis of Inherited Diseases. 6th ed. // Eds Scriver C. C., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D. N. Y.: McGraw-Hill, 1989. P. 1797—1806.
3. Видершайн Г. Я. // Успехи биол. химии. 1986. Т. 27. С. 117—135.
4. Holtzman E. Lysosomes. New York; London: Plenum Press, 1989. 439 p.
5. Mellman I., Fuchs R., Helenius H. // Ann. Rev. Biochem. 1986. V. 55. P. 663—700.
6. Verheijen F., Palmeri S., Hoogeven A. T., Galjaard H. // Eur. J. Biochem. 1985. V. 149. P. 315—321.
7. Verheijen F., Palmeri S., Galjaard H. // Eur. J. Biochem. 1987. V. 162. P. 63—67.
8. Morimoto S., Kishimoto Y., Tomich J., Weiler S., Ohashi T., Barranger J. A., Kretz K. A., O'Brien J. S. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 1933—1937.
9. Furst W., Machleidt W., Sandhoff K. // Biol. Chem. Hoppe-Seyler. 1988. B. 369. S. 337—342.
10. O'Brien J. S., Kretz K. A., Dewji N., Wenger D. A., Esch F., Fluharty A. L. // Science. 1988. V. 241. P. 1098—1101.
11. Martinek K., Levashov A. V., Klyachko N., Khmel'nitski Yu. L., Beresin I. V. // Eur. J. Biochem. 1986. V. 155. P. 453—468.
12. Kabanov A. V., Levashov A. V., Klyachko N. L., Namyotkin S. N., Pshezhetsky A. V. // J. Theor. Biol. 1988. V. 133. P. 327—343.
13. Luisi P. L. // Angew. Chem. In. 1985. B. 24. S. 439—450.
14. Левашов А. В., Клячко Н. Л., Хмельницкий Ю. Л. // Итоги науки и техники. 1986. Т. 5. С. 134—171.
15. Khmel'nitskii Y., Kabanov A. V., Klyachko N. L., Levashov A. V., Martinek K. // Structure and Reactivity in Reversed Micelles / Ed. Pileni M. P. Amsterdam: Elsevier, 1989. P. 230—261.
16. Pshezhetsky A. V., Buneeva O. A., Dvorkin V. M. // Eur. J. Biochem. 1991. V. 202. P. 361—365.
17. Пшежецкий А. В., Бунеева О. А., Дворкин В. М., Лурье С. Э. // Биохимия. 1991. Т. 56. № 6. С. 1104—1112.
18. Пшежецкий А. В., Левашов А. В., Видершайн Г. Я. // Биохимия. 1991. Т. 56. В. 4. С. 655—665.
19. Пшежецкий А. В., Бейер Е. М., Виноградова М. В., Видершайн Г. Я. // Биохимия. 1993. Т. 58. В. 4.
20. Клячко Н. Л., Пшежецкий А. В., Кabanov A. V., Вакула С. В., Мартинек К., Левашов А. В. // Бюлл. мембраны. 1990. Т. 7. № 5. С. 467—472.
21. Белоногова Ю. В., Лихтенштейн Г. И., Левашов А. В., Хмельницкий Ю. Л., Клячко Н. Л., Мартинек К. // Биохимия. Т. 47. В. 3. С. 379—386.

22. Пшежецкий А. В., Клячко Н. Л., Кабанов А. В., Бушueva М. В., Леденев А. Н., Рууге Е. К., Мартинек К., Левашов А. В. // Биохимия. 1989. Т. 54. С. 1790—1796.
23. Клячко Н. Л., Меркер Ш., Вакула С. В., Иванов М. В., Березин И. В., Мартинек К. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 298. С. 1479—1481.
24. Наметкин С. Н., Кабанов А. В., Евтушенко Г. Н., Чернов Н. Н., Клячко Н. Л., Левашов А. В., Мартинек К. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 1. С. 70—77.
25. 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.
26. Kabanov A. V., Klyachko N. L., Nametkin S. V., Merker S., Zarova A. V., Bunic V. I., Ivanov M. V., Levashov A. V. // Prot. Eng. 1991. V. 4. P. 1009—1017.
27. 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. 1271—1273.
28. 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—455.
29. Мевх А. Т., Судына Г. Ф., Лазутина И. О., Левашов А. В. // Биохимия. 1985. Т. 50. С. 1719—1723.
30. Кабанов А. В., Левашов А. В., Мартинек К. // Вестн. Моск. гос. ун-та. Сер. 2. Химия. 1986. Т. 27. № 6. С. 591—594.
31. Видершайн Г. Я., Козлова И. К., Ильина Г. С., Михайлова М. А. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 8. С. 1014—1026.
32. Wiederschain G. Ya., Kozlova I. K., Ilyina G. S., Mikhailova M. A., Beyer E. M. // Carbohydr. Res. 1992. V. 224. P. 225—272.
33. Бейер Е. М., Кляццкий Б. А., Видершайн Г. Я. // Биоорган. химия. 1979. Т. 5. № 2. С. 268—279.
34. Purification of Laboratory Chemicals. // Eds Perrin D. D., Armagero L. S., Perrin D. S. N. Y.: Plenum Press. 1985. P. 968.
35. Laemmli U. K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680—685.
36. Хмельницкий Ю. Л., Левашов А. В., Клячко Н. Л., Черняк В. Я., Мартинек К. // Биохимия. 1982. Т. 47. С. 86—99.

Поступила в редакцию
2.VI.1992

После доработки
16.X.1992

A. V. Pshezhetsky, E. M. Beyer*, O. A. Buneeva*,
M. V. Vinogradova, A. V. Levashov**, G. Ya. Wiederschain*

HUMAN GLYCOSIDASES REVERSED MICELLAR SYSTEM: PROPERTIES AND KINETICS

A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology,
M. V. Lomonosov Moscow State University;
* Institute of Biological and Medical Chemistry,
Russian Academy of Medical Sciences, Moscow;

** M. V. Lomonosov Moscow State University, Chemical Department

Kinetic of hydrolysis, by lysosomal glycosidases, of their synthetic substrates were studied in systems of the Aerosol OT (AOT) reversed micelles in octane. Catalytic activity of all the tested enzymes, viz., G_{M1} -galactosidase, β -hexosaminidases A and B, neuraminidase, and galactocerebrosidase, in reversed micelles proved to be the same as or higher than in the water buffer. In the reversed micelles an effective inhibition of the enzymatic reactions by the resulting carbohydrates was however observed. The dependence of the enzymes' activity on the hydration degree was represented by curves with one or several maxima, corresponding to various oligomeric forms of the enzymes. Dependencies of effective K_m on the hydration degree in reversed micelles are similar dependencies of the enzyme activities on the same parameter, which can be explained by corresponding changes of local substrate concentration near the enzyme active site. Dependencies of the enzymatic activity on the surfactant's concentration in the reversed micellar system were also studied. Catalytic activity of the soluble lysosomal glycosidases was found to be unaffected by the micelles concentration. Activity of the membrane lysosomal glycosidase, galactocerebrosidase, strongly increased when the surfactant's concentration decreased. Under optimal conditions the activity of galactocerebrosidase in reversed micelles was 10-fold as compared with its activity in the water buffer.