

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ЛИПИДНОЙ МАТРИЦЫ НА АКТИВНОСТЬ МЕМБРАНОТРОПНЫХ ФЕРМЕНТОВ ГАЛАКТОНОЛАКТОНОКСИДАЗЫ ИЗ *Trypanosoma cruzi* И L-ГАЛАКТОНО-1,4-ЛАКТОНДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ *Arabidopsis thaliana* В СИСТЕМЕ ОБРАЩЁННЫХ МИЦЕЛЛ

© 2023 А.А. Чудин, Е.В. Кудряшова*

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет,
119991 Москва, Россия; электронная почта: helenakoudriachova@yandex.ru

Поступила в редакцию 22.05.2023

После доработки 02.09.2023

Принята к публикации 22.09.2023

Исследование многих мембранных ферментов в водной среде затруднено, что обуславливает необходимость использования мембрано-подобных систем, таких как обращённые мицеллы поверхностно-активных веществ (ПАВ). Однако мицеллы являются упрощённой моделью природных мембран, значительную часть которых составляют фосфолипиды. В работе изучено влияние фосфолипидов, фосфатидилхолина (ФХ) и фосфатидилэтаноламина (ФЭ) на активность мембранных ферментов на примере галактонолактонооксидазы из *Trypanosoma cruzi* (TcGAL) и L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназы из *Arabidopsis thaliana* (AtGALDH). Исследовано влияние структуры мицеллообразующего ПАВ на активность ферментов на примере анионного ПАВ (АОТ), нейтрального ПАВ (Бридж-96) и смеси катионного и анионного ПАВ (ЦТАБ и АОТ). Обнаружено выраженное влияние липидных добавок ФХ и ФЭ на активность AtGALDH и TcGAL, проявляющееся в увеличении каталитической активности и значительном изменении профилей зависимости активности ферментов от размера мицелл (степени гидратации). Обнаруженные эффекты обусловлены снижением плотности отрицательного заряда мицеллярной матрицы, а также влиянием липидных добавок на олигомерный состав ферментов, что связано с формированием тетрамерной формы ферментов и/или белок-липидных комплексов. При варьировании состава и структуры мицеллообразующего ПАВ (АОТ, ЦТАБ и Бридж-96) изменение каталитических свойств ферментов обусловлено влиянием ПАВ на размер мицелл, подвижность липидов, заряд и жёсткость самой матрицы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: смешанные мицеллы, катионные ПАВ, галактонолактондегидрогеназа, фосфолипиды, *Trypanosoma cruzi*, *Arabidopsis thaliana*.

DOI: 10.31857/S0320972523120096, EDN: NLBOGA

ВВЕДЕНИЕ

Мембранный фермент галактонолактон-оксидаза из организма-паразита *Trypanosoma cruzi* (TcGAL), вызывающего болезнь Шагаса, ответственен за синтез витамина С *in vivo*, и его ингибирование можно рассматривать как потенциальное лечение болезни Шагаса, поскольку *T. cruzi* не способен усваивать витамин С извне, а организм человека не содер-

жит галактонолактонооксидазы. Трипаносомы содержат значительный уровень аскорбата (витамина С), который синтезируется в гликозомах, особых одномембранных органеллах, ассоциированных с митохондриями [1]. TcGAL в рассматриваемом процессе катализирует финальную стадию синтеза витамина С из L-галактоно-1,4-лактона (ГЛ) или D-арабиноно-1,4-лактона (АЛ) [2]. Геномный анализ показал, что биосинтез аскорбата в трипано-

Принятые сокращения: АЛ – D-арабиноно-1,4-лактон; АОТ – ди-2-этилгексилэтер сульфоянтарной кислоты, анионное ПАВ; ГЛ – L-галактоно-1,4-лактон; ДЛС – метод динамического рассеивания света; ДХФИФ – 2,6-дихлорфенолиндифенол; ПАВ – поверхностно-активные вещества; ФМС – феназинметосульфат; ФХ – фосфатидилхолин; ФЭ – фосфатидилэтаноламин; ЦТАБ – цетилтриметиламмоний бромид, катионное ПАВ; ЭА – электроноакцептор; AtGALDH – L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназа из *Arabidopsis thaliana*; TcGAL – галактонолактонооксидаза из *Trypanosoma cruzi*; W₀ – степень гидратации.

* Адресат для корреспонденции.

сомах аналогичен таковому в растениях [3, 4], где финальную стадию катализирует фермент L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназа из *Arabidopsis thaliana* (AtGALDH), гомологичный TcGAL. Однако изучение TcGAL, как и многих других мембранных ферментов, осложнено, поскольку для реализации их нативной конформации и проявления каталитической активности требуется наличие мембранной матрицы. В настоящий момент единственной разработанной системой, в которой удалось успешно провести сворачивание и измерить активность TcGAL, являются обращённые мицеллы анионного ПАВ (АОТ) в октане, предложенные нами ранее [1, 5]. Мы также продемонстрировали, что AtGALDH, гомологичная TcGAL и катализирующая ту же реакцию (синтез витамина C), может использоваться в модельной системе, позволяющей изучать функции фермента как в мицеллах АОТ, так и в водной среде [5]. AtGALDH — мембранотропный фермент, предположительно, локализуется в митохондриальном межмембранном пространстве, связанном с митохондриальным комплексом I, где фермент участвует в переносе электронов в электрон-транспортную цепь через цитохром *c* [6].

Отметим, что обращённые мицеллы АОТ являются релевантными моделями митохондриальных мембран. Известно, что мембраны митохондрий содержат небислоиные липидные структуры, представляющие собой ассоциаты молекул липидов, построенные по типу обращённых мицелл, заключённых между монослоями двухслойной мембраны [7]. Главным параметром обращённых мицелл является размер их внутренней полости, который можно регулировать, варьируя степень гидратации ($W_0 = [H_2O]/[ПАВ]$) [7]. Максимальная активность ферментов в мицеллах наблюдается при степени гидратации W_0 , обеспечивающей соответствие размера внутренней полости мицеллы и геометрических параметров сольбилизируемого фермента. В случае олигомерных ферментов на зависимостях каталитической активности от W_0 наблюдаются несколько оптимумов, которые соответствуют функционированию отдельных олигомерных форм фермента, обладающих каталитической активностью [8].

Предложенный нами метод сворачивания TcGAL в мицеллах АОТ, представляющих собой модель биомембраны, является действенным подходом, позволяющим изучать каталитические свойства данного мембранного фермента [1, 5]. Мажорными фосфолипидами биомембран *T. cruzi* являются фосфатидилхолин (ФХ) и фосфатидилэтаноламин (ФЭ) [9, 10],

составляющие 44 и 28% от общего количества фосфолипидов [11]. Изменение липидного состава существенно влияет на функционирование организма *T. cruzi*: так, показано, что подавление роста *T. cruzi* аджоем, сероорганическим соединением-антиагрегантом, связано со специфическим изменением фосфолипидного состава клеток организма-паразита, что в том числе выражается в ингибировании биосинтеза ФХ и увеличении содержания ФЭ [12].

В данной работе мы исследуем влияние добавок ФХ и ФЭ на активность TcGAL в мицеллярной системе АОТ, которая является методически отработанной, позволяющей получать гомогенные оптически прозрачные микроэмульсии, и способной растворять все необходимые компоненты реакционной системы для измерения активности фермента. Отметим, что сами ФХ и ФЭ склонны формировать липосомы — оптически непрозрачную суспензию, что затрудняет проводить спектрофотометрическое определение активности TcGAL.

Помимо липидных компонентов, важную роль играет выбор мицеллообразующего ПАВ. Наиболее широко используемым ПАВ является анионный АОТ, образующий мицеллы в широком диапазоне степеней гидратации и обладающий узким распределением мицелл по размеру. Кроме анионных ПАВ, в качестве мицеллярной матрицы находят применение нейтральные (Бридж-96) и катионные (ЦТАБ) ПАВ, а также смешанные мицеллы на основе этих ПАВ [7]. Так, использование смешанных мицелл на основе катионного ПАВ (ЦТАБ) и нейтрального (Бридж-92) позволяет увеличить активность пероксидазы хрена в 2 раза по сравнению с мицеллами на основе только ЦТАБ [13].

Важным представляется изучение и сравнение свойств водорастворимого и мембранных ферментов AtGALDH и TcGAL в системах обращённых мицелл — моделей биомембран — в зависимости от структуры и заряда мицеллообразующего ПАВ и наличия липидных добавок. Таким образом, целью данной работы является сравнительная характеристика каталитических свойств AtGALDH и TcGAL в зависимости от природы ПАВ и от характеристик липидных компонент в системах обращённых мицелл как моделей митохондриальных мембран.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В исследованиях использовали следующие реактивы: L-галактоно-1,4-лактон,

D-арабиноно-1,4-лактон, 2,6-дихлорфенолин-дофенол (ДХФИФ), ди-2-этилгексильной эфир сульфоянтарной кислоты, цетилтриметиламоний бромид, Бридж-96, октан, компоненты буферных растворов, 1,2-диолеоил-*sn*-глицерофосфоэтаноламин (ФЭ), феназинметосульфат (ФМС) и фосфатидилхолин из яичных желтков («Sigma-Aldrich», США).

Рекомбинантная экспрессия AtGALDH и TcGAL и рефолдинг телец включения TcGAL. Рекомбинантную экспрессию AtGALDH (EC 1.3.2.3) и TcGAL (EC 1.3.3.12) в *Escherichia coli* проводили согласно методике, описанной ранее [1, 14]. AtGALDH-His6 экспрессировался в клетках *E. coli* BL21(DE3) в виде растворимого цитоплазматического белка. Для продукции фермента TcGAL использовали клетки *E. coli* BL21(DE3), несущие плазмиду pBAD-TcGAL (любезно предоставлена проф. W.J.H. van Berkel (Вагенингенский университет, Нидерланды)). TcGAL формировал нерастворимые тельца включения. Рефолдинг TcGAL проводили согласно методике, описанной нами ранее [1]. Суспензию телец включения, собранных после лизиса клеток, промывали 6%-ным раствором Triton X-100, содержащим 60 mM ЭДТА и 1,5 M NaCl (pH 7,0) и растворяли в 6 M гуанидин хлориде. Затем гуанидин хлорид удаляли диализом против 10 mM фосфата натрия (pH 8,0). После диализа суспензию агрегированного фермента вносили в систему обращённых мицелл вода-АОТ-октан, степени гидратации ($W_0 = 30$) достигали добавлением 10 mM фосфата натрия (pH 8,0). Растворы окисленного и восстановленного глутатиона (100 mM GSSG и 300 mM GSH) в 10 mM фосфате натрия (pH 8,0) смешивали, и аликвоту (10 мкл) добавляли к 1 мл мицеллярного раствора фермента в 0,4 M АОТ. Рефолдинг фермента инициировали добавлением 10 мкл раствора FAD в воде (10-кратный молярный избыток по отношению к ферменту). Сворачивание и конечную концентрацию фермента в мицеллах контролировали методом КД-спектроскопии с использованием КД-спектрометра Jasco J-815 («JASCO», Япония).

Измерение ферментативной активности AtGALDH и TcGAL. Анализ активности AtGALDH в мицеллах при добавлении липидных добавок проводили в системе обращённых мицелл АОТ [4, 15]. Для измерения активности TcGAL в систему обращённых мицелл АОТ (содержащих субстрат, электроноакцептор (ЭА) и все требуемые компоненты системы, включая липидные добавки) добавляли аликвоту запасного раствора TcGAL в 0,4 M АОТ, в котором предварительно был проведён рефолдинг фер-

мента (1–2 мг/мл). Для спектрофотометрического определения активности ферментов использовалась комбинация 120 мкМ ФМС в качестве ЭА и 120 мкМ ДХФИФ (проявитель аскорбата). В качестве субстратов использовали ГЛ и АЛ в случае AtGALDH и TcGAL соответственно. Для исследования влияния липидных добавок на активность фермента в систему обращённых мицелл (0,1 АОТ в октане) добавляли 5% ФХ или ФЭ (% w/w по липидам, т.е. массовые проценты липида от общей массы ПАВ в системе). Для изучения влияния природы мицеллообразующего ПАВ на активность ферментов были выбраны мицеллы на основе анионного ПАВ (0,1 M АОТ в октане), нейтрального ПАВ (0,1 M Бридж-96 в циклогексане) и смешанные мицеллы, содержащие 0,1 M АОТ и 10% w/w ЦТАБ в октане.

Седиментационный анализ олигомерных форм AtGALDH. Седиментационный анализ проводили на аналитической ультрацентрифуге Beckman E («Beckman», США), снабжённой фотоэлектрическим сканирующим устройством с монохроматором и мультиплексором, при скорости 40 000 об./мин аналогично методикам, описанным ранее [15, 16]. Для установления олигомерного состава AtGALDH были изучены мицеллярные растворы белка (0,1 мг/мл) при степенях гидратации $W_0 = 21$ и $W_0 = 32$, соответствующих функционированию мономерной и димерной форм. Сканирование мицелл, содержащих белок, проводили при длине волны 450 нм. Коэффициенты седиментации пустых мицелл определяли в независимых экспериментах при 405 нм с добавлением 2,4-динитрофенола для окрашивания мицелл. Коэффициенты седиментации рассчитывали с использованием программы SediFit из полученных экспериментальных кривых. Молекулярную массу AtGALDH рассчитывали по стандартной методике, описанной ранее [8, 15, 16], используя формулу:

$$M_p = M_0 \left(\frac{s_p}{s_0} - 1 \right) (1 - \rho V_0), \quad (1)$$

где M_0 – молекулярная масса мицелл без фермента (пустых), s_p и s_0 – коэффициенты седиментации фермент-содержащих и пустых мицелл соответственно, V_0 – парциальный молярный объём пустых мицелл в растворителе с плотностью ρ [16].

Метод динамического рассеивания света (ДЛС). Измерения динамического рассеяния света проводились на оборудовании Zetasizer Nano S («Malvern Instruments Ltd.», Великобритания) с использованием гелий-неонового лазера (4 мВт) при длине волны 633 нм.

Анализ данных проведён с помощью программного обеспечения «Zetasizer Software». Вязкость диспергатора (октана) — 0,54 сП; показатель преломления диспергатора — 1,39; показатель преломления воды — 1,33. За размер частиц принимали среднее значение трёх независимых измерений.

Изучение взаимодействия фосфатидилхолина и AtGALDH методом ИК-спектроскопии. ИК-спектры регистрировали, используя ИК-Фурье-спектрометр Bruker Tensor 27 («Bruker», Германия) с термостатируемой ячейкой BioATR-II с элементом ZnSe ATR. ИК-спектры регистрировали в диапазоне 2000–1200 см^{-1} со спектральным разрешением 1 см^{-1} .

Комплексообразование фосфатидилхолина с AtGALDH. Для оценки взаимодействия AtGALDH с ФХ определяли зависимость поляризации флуоресценции AtGALDH в присутствии различных концентраций ФХ, регистрируя интенсивность на флуоресцентном спектрометре Varian Cary Eclipse («Agilent Technologies», США) при длине волны возбуждения 450 нм и длине волны испускания 530 нм, характерных для FAD-содержащих систем [17]. Концентрацию AtGALDH поддерживали постоянной (2,5 мкМ), концентрацию ФХ варьировали в диапазоне 0–6 мМ в натрий-фосфатном буфере (рН 8,0).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Профили каталитической активности AtGALDH и TcGAL в системе обращённых мицелл AOT. Основным параметром системы об-

ращённых мицелл является размер внутренней полости, который можно строго регулировать, варьируя степень гидратации ($W_0 = [\text{H}_2\text{O}]/[\text{ПАВ}]$) [18]. В общем случае оптимум активности фермента наблюдается при степени гидратации, отвечающей соответствию внутренней полости мицеллы геометрическим параметрам солюбилизируемого фермента [8]. Зависимости каталитической активности AtGALDH и TcGAL от степени гидратации в системе обращённых мицелл AOT с использованием ФМС (120 мкМ) в качестве ЭА представлены на рис. 1.

Для обоих ферментов наблюдаются два оптимума активности ($W_0 = 22\text{--}24$) и ($W_0 = 26\text{--}28$), что, предположительно, соответствует функционированию мономерной и димерной форм ферментов. Для определения олигомерного состава AtGALDH в системах обращённых мицелл проведён седиментационный анализ олигомерных форм в зависимости от степени гидратации.

Олигомерный состав AtGALDH в системе обращённых мицелл AOT. На рис. 2 представлены седиментограммы образцов AtGALDH-содержащих мицелл при степенях гидратации $W_0 = 21$, где наблюдается первый оптимум активности, и при $W_0 = 32$, предположительно, в области существования димерной формы (где мономерная форма заведомо отсутствует).

На седиментограммах AtGALDH наблюдаются две выраженные ступени у каждой из кривых. Нижняя ступень (медленно осаждающиеся частицы) — ближе к мениску жидкости — соответствует «пустым» мицеллам.

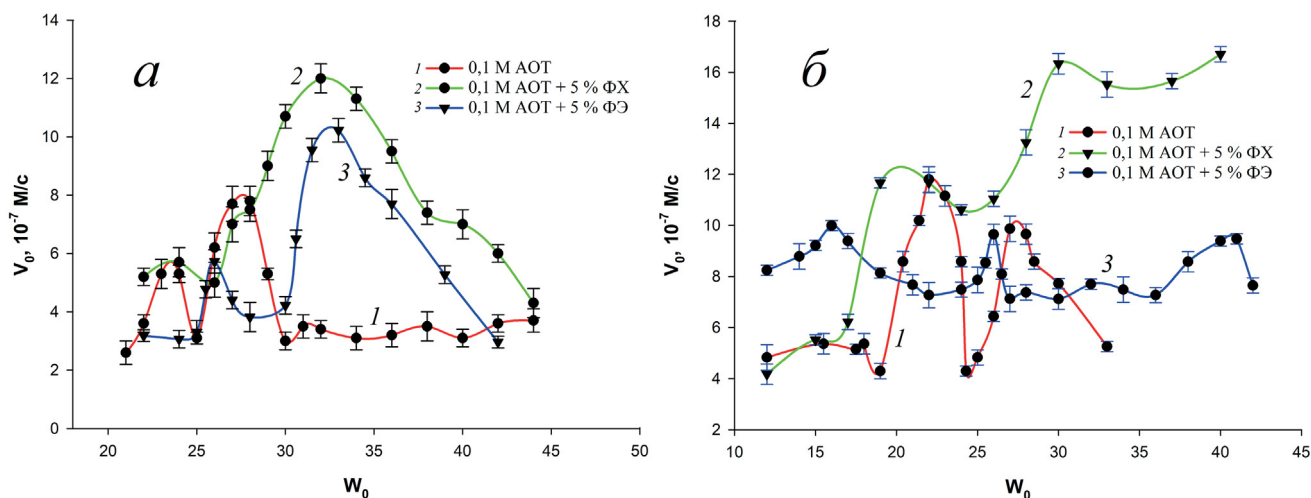


Рис. 1. Профили каталитической активности AtGALDH (а) и TcGAL (б) в системе обращённых мицелл 0,1 М AOT в н-октане при отсутствии липидов, при добавлении 5% ФХ и при добавлении 5% ФЭ. Условия: 120 мкМ ФМС, 120 мкМ ДХФИФ, рН 8,8, $\lambda = 550$ нм, 25 °С. Концентрации: 6 нМ AtGALDH и 1 мМ ГЛ (а); 34 нМ TcGAL и 1 мМ АЛ (б). АЛ — D-арабиноно-1,4-лактон; ГЛ — L-галактоно-1,4-лактон

Таблица 1. Параметры AtGALDH-содержащих и пустых мицелл, рассчитанные по данным седиментационного анализа

W_0	s_p	s_0	$1-\rho V_0$	M_0 , кДа	M_p , кДа
21	29 ± 1	17 ± 1	$0,353 \pm 0,005$	251 ± 11	66 ± 5
34	46 ± 2	32 ± 1	$0,341 \pm 0,002$	739 ± 17	$111,3 \pm 9,0$

Примечание. Обозначения как для уравнения (1).

Верхняя ступень (быстро осаждающиеся частицы) — ближе ко дну кюветы — представляет собой мицеллы, содержащие белок. Каждая кривая записывалась в определённое время ($t_n > t_{n-1} > \dots > t_3 > t_2 > t_1$, где t_n соответствует красной кривой, а t_1 — синей кривой). Общая продолжительность измерений — 60 мин. Коэффициенты седиментации s_p и s_0 при степенях гидратации $W_0 = 21$ и 34 для фермент-содержащих и пустых мицелл определены согласно уравнению (1) [16]. С применением эмпирической формулы (1), исходя из значений коэффициентов седиментации s_p , определили молекулярную массу фермента M_p для степени гидратации 21 и 34 (табл. 1).

Рассчитанная молекулярная масса фермента M_p при $W_0 = 34$ примерно в 2 раза превышает рассчитанное значение M_p при $W_0 = 21$. Это подтверждает предположение о том, что оптимумы на профиле каталитической активности соответствуют наличию в системе мономерной и димерной форм. Молекулярная масса фермента — 58,8 кДа, однако известно, что фермент имеет вытянутую вдоль одной из осей структуру [1], поэтому незначительное увеличение кажущейся массы при степени гидрата-

Таблица 2. Сравнение радиусов для AtGALDH и TcGAL

Форма белка	r_p^* , Å (AtGALDH)	r_p , (теор.) Å (TcGAL)**	r_p^* , Å (TcGAL)
Мономер	$38,5 \pm 0,3$	36,5	$37,5 \pm 0,2$
Димер	$44,5 \pm 0,2$	47	$45,0 \pm 0,3$

Примечание. * Рассчитаны с использованием уравнения (2).

** Литературные данные (радиусы TcGAL, рассчитанные согласно 3D-моделированию) [1].

ции, соответствующей мономеру, является закономерным. Таким образом, показано, что в мицеллярной системе AtGALDH может существовать в двух различных олигомерных формах (при $W_0 = 21$ функционирует мономер, при $W_0 \geq 32$ — димер). Отметим, что в водной фазе фермент AtGALDH функционирует только в мономерной форме — как показано методом гельфильтрационной хроматографии [14].

Для подтверждения полученных данных седиментационного анализа мы рассчитали экспериментальные радиусы предполагаемой мономерной и димерной форм для AtGALDH и TcGAL, исходя из их профилей каталитической активности (рис. 1, а и б) по эмпирическому уравнению [19]:

$$r_p(\text{Å}) = r_m(\text{Å}) = 1,5 \times W_0 + 4, \quad (2)$$

где r_m — внутренний радиус мицелл, r_p — максимальный радиус белка (половина длины наибольшей оси белка). Рассчитанные нами, согласно уравнению (2), радиусы предполагаемых мономерной ($r_p = 38,5 \text{ Å}$) и димерной ($r_p = 44,5 \text{ Å}$) форм для AtGALDH близки по

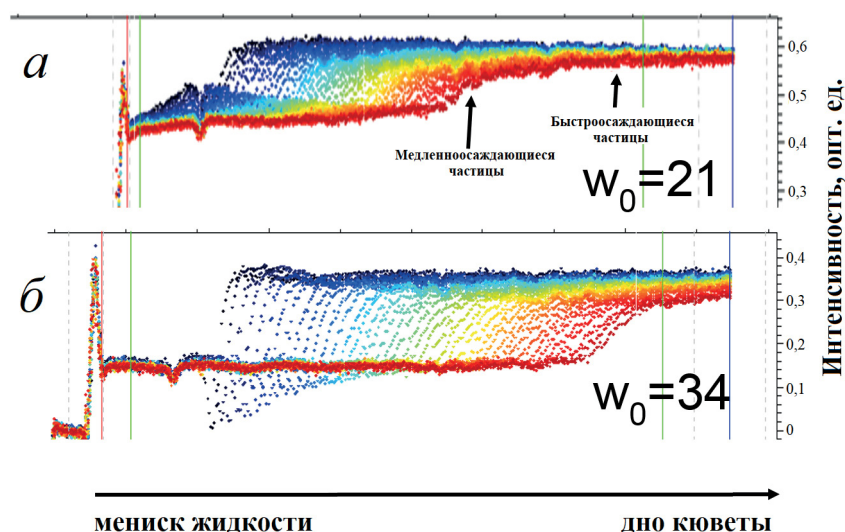


Рис 2. Экспериментальные седиментационные кривые для мицелл, содержащих AtGALDH, при степенях гидратации $W_0 = 21$ (а) и $W_0 = 34$ (б). Горизонтальная ось показывает расстояние между мениском жидкости и дном ячейки

значению к ранее найденным из 3D-моделирования для TcGAL [1] ($r_p = 36,5 \text{ \AA}$ и $r_p = 47 \text{ \AA}$ для мономера и димера соответственно) (табл. 2).

Полученные результаты подтверждают наше предположение о функционировании AtGALDH и TcGAL в мицеллах АОТ в виде двух олигомерных форм (мономерной и димерной) и согласуются с данными седиментационного анализа.

Влияние липидных добавок на активность AtGALDH и TcGAL. Основными липидными компонентами митохондриальных мембран *T. cruzi* являются фосфолипиды ФХ и ФЭ, вместе составляющие более 70% от общего количества фосфолипидов [10, 11]. ФХ характеризуется объёмной полярной «головной» группой и склонен к образованию ламеллярных структур. В то же время ФЭ склонен образовывать сферические обращённо-фазовые структуры (обращённые мицеллы) [9]. Степень кривизны в случае ФЭ меньше чем в мицеллах АОТ, поскольку у АОТ гидрофобная часть шире. Помимо геометрии молекул, ФХ и ФЭ различаются также по степени выраженности заряда аминокислотной группы: ФХ несёт положительный заряд холиновой группы (четвертичная аминокислота, в которой атомы водорода замещены на метильные группы), в то время как аминокислота ФЭ имеет $pK_a = 9,6$ и при слабощелочных pH 8,0 также положительно заряжена [20].

Включение фосфолипидов, несущих заряженные аминокислотные группы, в мицеллярную систему может играть существенную роль при взаимодействии мембранотропных ферментов с мицеллярной матрицей: например, в случае кислой фосфатазы добавление фосфолипидов, склонных снижать плотность отрицательного заряда и тем самым повышать локальный pH вблизи поверхности раздела фаз, снижает активность фермента [3]. Кроме того, заряд мицеллярной матрицы может влиять на стабилизацию той или иной формы кофактора в активном центре. Так, положительный заряд в области вблизи локуса N1-C2 изоаллоксазинового кольца флавина у AtGALDH [16] может стабилизировать анионную форму двухэлектронного восстановленного флавина.

В работе для исследования влияния ФХ и ФЭ на активность AtGALDH и TcGAL использовали системы 0,1 М АОТ, содержащие 5% ФХ или ФЭ (% w/w). Известно, что даже малые концентрации липидов (2%) могут усиливать или подавлять активность ферментов в несколько раз, как показано нами ранее на примере кислой фосфатазы в системах обращённых мицелл АОТ [9]. Обнаружено, что добавление каждого из липидов драматиче-

ски изменяет профиль зависимости каталитической активности AtGALDH от степени гидратации, по-разному влияя на активность фермента (рис. 1, а). Добавление ФХ приводит к увеличению уровня активности AtGALDH при всех степенях гидратации. Наблюдаемое возрастание активности может быть связано со снижением плотности отрицательного заряда АОТ на поверхности раздела фаз. Кроме того, включение ФХ в мицеллярную систему может способствовать лучшему взаимодействию фермента с поверхностью раздела фаз (меньше степень отталкивания фермента от отрицательной поверхности раздела фаз, образованной АОТ, и высокое сродство фермента с мембранным фосфолипидом ФХ). Помимо возрастания активности, включение в систему ФХ приводит к возникновению нового широкого оптимума при $W_0 = 30-34$, что может соответствовать функционированию AtGALDH в тетрамерной форме. На основании анализа ряда ферментов в литературе приводится корреляция между молекулярной массой фермента M_p и оптимальной степенью гидратации $W_{0, \text{опт}}$ в мицеллах АОТ, описываемая эмпирическим уравнением [19]:

$$W_{0, \text{опт}} = 0,5^3 \sqrt{M_p} - 2,7. \quad (3)$$

Исходя из этого уравнения, ожидаемая степень гидратации $W_{0, \text{опт}}$ для предполагаемого тетрамера AtGALDH с $M_p = 264 \text{ кДа}$ составляет 30 и более (30–34 – в нашем случае). С другой стороны, можно предположить, что оптимум активности AtGALDH при $W_0 = 30-34$ может быть обусловлен образованием липопротеидных комплексов различного состава, которые были обнаружены и для других мембранотропных ферментов (в т.ч. для кислой фосфатазы [9]). В пользу этого предположения говорит сильная размытость пика при $W_0 = 30-34$, в то время как для тетрамерной формы было бы характерно наличие более узкого оптимума, как, например, для тетрамеров лактатдегидрогеназы и глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы [21].

Добавление 5% ФЭ к AtGALDH оказывает похожее влияние на профиль активности, как и в случае ФХ: появляется пик при $W_0 = 30-33$, при этом пик, соответствующий мономерной форме, исчезает, что может быть связано с изменением структуры мицеллярной матрицы и изменением локального радиуса кривизны мицелл, что сказывается в основном при низких степенях гидратации.

Добавление липидных добавок оказывает существенное влияние и на мембранный

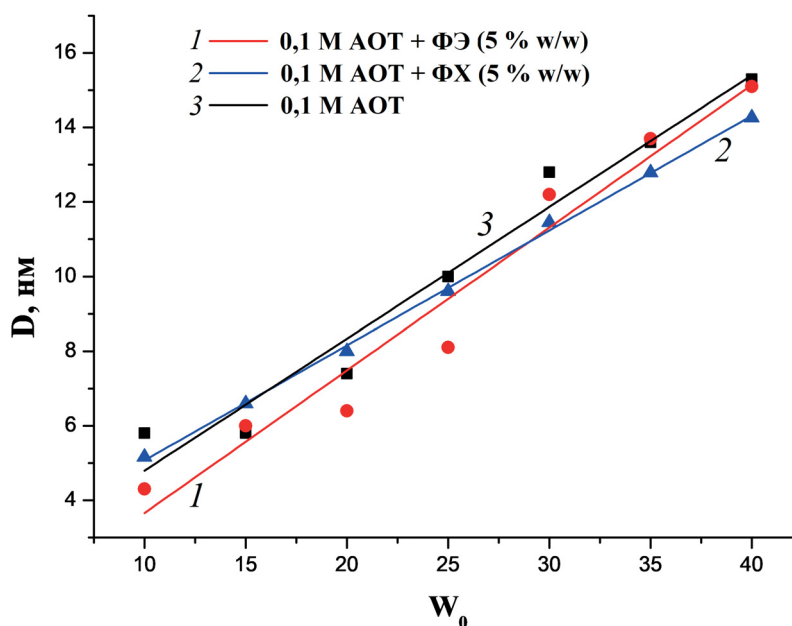


Рис. 3. Зависимости диаметра мицелл от степени гидратации по данным ДЛС. Мицеллы АОТ с добавлением ФЭ или ФХ (5% w/w) и мицеллы АОТ без липидных добавок – прямые (1), (2) и (3) соответственно

ТсGAL (рис. 1, б). Добавление 5% ФХ, как и в случае AtGALDH, приводит к увеличению уровня активности фермента в целом (по-видимому, за счёт снижения плотности отрицательного заряда мицеллярной матрицы), а также к появлению дополнительного «размытого» оптимума активности при $W_0 = 30–34$. Присутствие 5% ФЭ также значительно изменяет профиль каталитической активности ТсGAL по сравнению с исходными мицеллами АОТ: наблюдается сглаживание всего профиля зависимости активности от степени гидратации.

Учитывая сходство ТсGAL и AtGALDH, а именно: высокую гомологию (консервативность) активных центров ТсGAL и AtGALDH [5], общую катализируемую реакцию и общий ЭА, близкие размеры мономерной и димерной форм ферментов и сходство каталитических профилей в мицеллах АОТ, можно предположить, что оптимум активности при $W_0 = 30–34$ в случае ТсGAL, также как и в случае AtGALDH, соответствует функционированию тетрамерной структуры фермента и/или формированию липопротеидного комплекса.

Сравнивая влияние липидных добавок (ФХ и ФЭ) на водорастворимый AtGALDH и мембранный ТсGAL, следует отметить, что добавление ФХ приводит к увеличению активности обоих ферментов во всем интервале степеней гидратации. В то же время добавление ФЭ немного по-разному влияет на AtGALDH и ТсGAL. В случае AtGALDH наблюдается увеличение разницы между минимальным и мак-

симальным значениями активности (рис. 1, а) в присутствии ФЭ по сравнению с мицеллами АОТ. При этом в случае ТсGAL добавление ФЭ, скорее, нивелирует зависимость активности фермента от степени гидратации W_0 (рис. 1, б). По-видимому, структура мицелл, формирующаяся вокруг каждой из олигомерных форм фермента, в случае мицелл АОТ, содержащих ФЭ, более подвижная, чем в случае АОТ–ФХ, поэтому сглаживается различие между наиболее и наименее активными формами фермента. Сходный эффект «выравнивания» профиля каталитической активности наблюдался и в случае кислой фосфатазы в мицеллах АОТ, содержащих ФЭ (2 и 5%) [9].

Помимо влияния заряда и образования тетрамерной формы и/или белок-липидных комплексов, следует также учитывать возможное изменение размеров мицелл АОТ в присутствии ФХ или ФЭ. Например, в литературе отмечается, что 10%-ная добавка ФХ уменьшает радиус мицелл АОТ (примерно в 1,5 раза) [4]. Однако в нашем случае диаметры мицелл АОТ в присутствии 5% ФХ или 5% ФЭ (определённые методом ДЛС) не сильно изменены по отношению к исходной системе АОТ (рис. 3). Таким образом, в условиях данной работы изменение радиусов мицелл при добавлении липидов ФХ и ФЭ можно считать несущественным в плане влияния на активность AtGALDH и ТсGAL.

Изучение связывания AtGALDH с ФХ методом ИК-спектроскопии. Образование белок-липидного комплекса AtGALDH–ФХ было

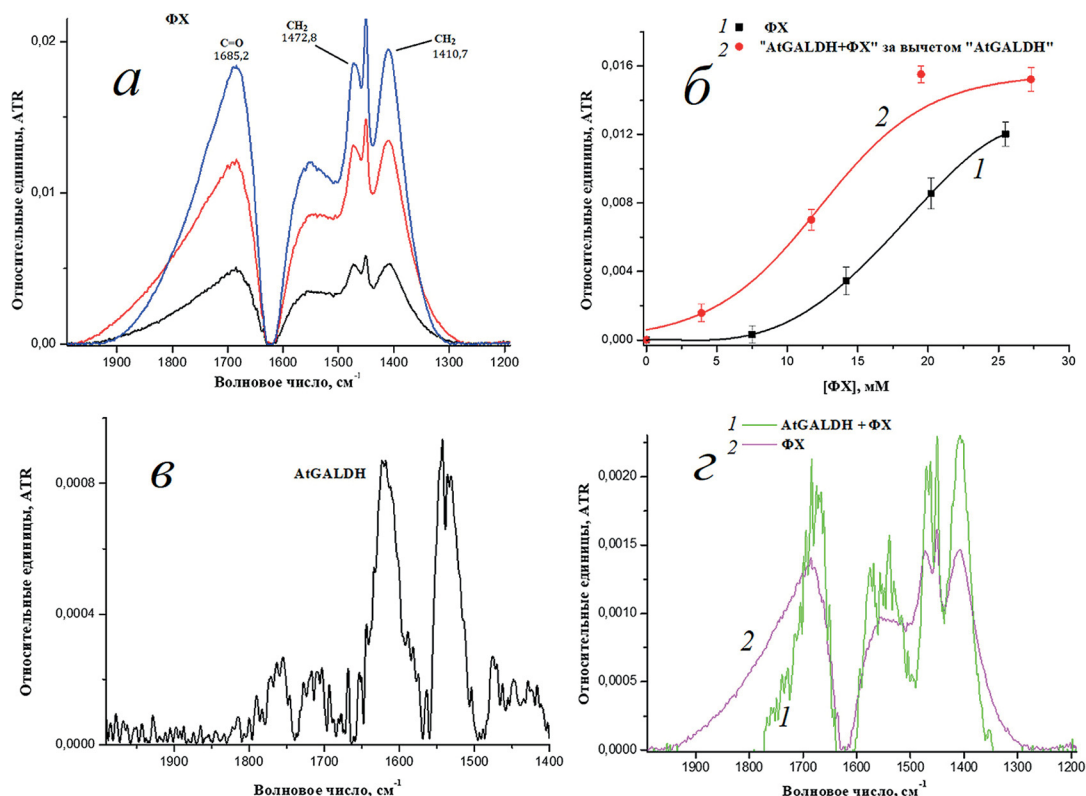


Рис. 4. ИК-спектры водных растворов 10–25 мМ ФХ (а). б – Поглощение при 1550 см⁻¹ для водных растворов 0–25 мМ ФХ (кривая 1) и смеси 70 мкМ AtGALDH и 0–27 мМ ФХ за вычетом фонового спектра AtGALDH (кривая 2). в – ИК-спектр 70 мкМ водного раствора AtGALDH. г – Сравнение спектра смеси AtGALDH (70 мкМ) и ФХ (4 мМ) за вычетом фонового спектра AtGALDH (кривая 1) со спектром водного раствора ФХ (4 мМ, кривая 2).

изучено по влиянию фермента на ИК-спектр ФХ (рис. 4). В ИК-спектре ФХ наблюдаются аналитические пики, соответствующие валентным колебаниям карбонильной группы (C=O) при 1685 см⁻¹ и деформационным колебаниям CH₂-группы при 1472 и 1411 см⁻¹. ИК-спектр фермента содержит классические полосы поглощения: амид 1 и амид 2 в интервалах 1500–1600 и 1600–1700 см⁻¹, характерные для белков [22]. В присутствии фермента форма ИК-спектра ФХ значительно отличается от спектра исходного ФХ, что указывает на связывание AtGALDH с ФХ. Наибольшие различия в спектрах ФХ и комплекса AtGALDH–ФХ наблюдаются в области карбонильной группы при 1680 см⁻¹ и при 1550 см⁻¹ (двойные связи остатков жирных кислот) (рис. 4, г). Эти различия обусловлены тем, что C=O и CH₂-группы жирнокислотных остатков в ФХ меняют своё микроокружение в присутствии фермента, что указывает на связывание фермента на поверхности раздела фаз липид (ФХ)–вода. На рис. 4, б представлена зависимость интенсивности пиков при 1550 см⁻¹ от концентрации ФХ для свободного фосфолипида и ФХ в присутствии AtGALDH (за вычетом фонового спектра AtGALDH). Разный ход кривых ука-

зывает на образование комплекса AtGALDH–ФХ: при отсутствии взаимодействия между AtGALDH и ФХ ожидалось бы совпадение кривых (рис. 4, г).

Изучение связывания AtGALDH с ФХ методом поляризации флуоресценции. Метод поляризации флуоресценции, применяемый для количественной оценки реакций ассоциации белков с лигандами [23], основан на увеличении поляризации флуорофора при его связывании с другими молекулами за счёт снижения скорости вращения флуорофора. В настоящей работе метод был использован для изучения связывания AtGALDH с ФХ путём слежения за флуоресценцией FAD, кофактора фермента, в качестве флуорофора. Наблюдаемое тушение флуоресценции FAD-кофактора, а также увеличение поляризации AtGALDH при возрастании концентрации ФХ (рис. 5, а и б) свидетельствуют об образовании комплекса AtGALDH–ФХ. Аналогичное возрастание поляризации флуоресценции описано в литературе для связывания аполипопротеина A1 с ФХ [24].

Полученную зависимость поляризации флуоресценции от концентрации ФХ (рис. 5, б) обрабатывали в двойных логарифмических координатах (линейная форма эмпирическо-

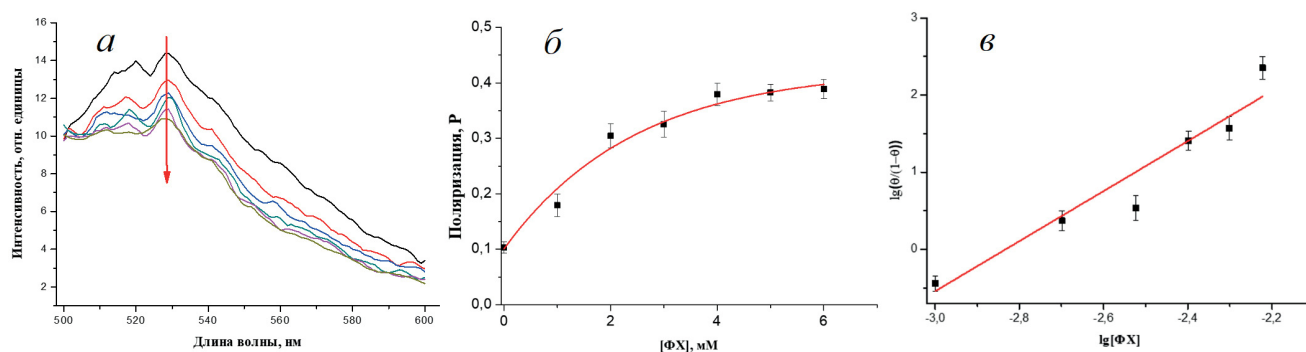


Рис. 5. Спектры флуоресценции смеси AtGALDH (2,4 мкМ) и ФХ ($\lambda(\text{возб.}) = 450 \text{ нм}$), стрелкой показано увеличение концентрации ФХ от 0 до 6 мМ (а); поляризация флуоресценции Р смеси AtGALDH (2,4 мкМ) и ФХ ($\lambda(\text{возб.}) = 450 \text{ нм}$, $\lambda(\text{эмис.}) = 530 \text{ нм}$) (б); обработка данных по поляризации флуоресценции в координатах Хилла (в). Условия: PBS (рН 8,8); 2,4 мкМ AtGALDH; 1–6 мМ ФХ; $T = 25^\circ \text{C}$

го уравнения Хилла (4)) (рис. 5, в), широко используемых для обработки экспериментальных данных по связыванию лигандов с биологическими объектами (ферментами, рецепторами и др.) [25].

$$\lg\left(\frac{\theta}{1-\theta}\right) = n \cdot \lg[\text{ФХ}] - n \cdot \lg K_{0,5}, \quad (4)$$

где $\theta = (P_{\text{образца}} - P_{\text{min}})/(P_{\text{max}} - P_{\text{min}})$.

Определённый из графиков на рис. 5 эмпирический параметр $K_{0,5}$, коррелирующий с константой диссоциации, оценивается как 2 мМ, а наименьшее число центров связывания $n = 3$. Таким образом, данные, полученные методом поляризации флуоресценции, говорят

об эффекте комплексообразования фермента с ФХ, что объясняет появление размытых оптимумов (при $W_0 > 30$) в случае добавления ФХ и ФЭ в профили каталитической активности AtGALDH и TcGAL.

Влияние мицеллообразующего ПАВ на активность TcGAL и AtGALDH. Активность мембранотропных ферментов в системах обращённых мицелл существенно зависит от природы ПАВ — нейтральной, катионной или анионной, и структурных особенностей формирующихся мицелл. Также имеет значение наличие относительно широкой области существования мицелл на фазовых диаграммах: в случае узкой области изучать фермент можно

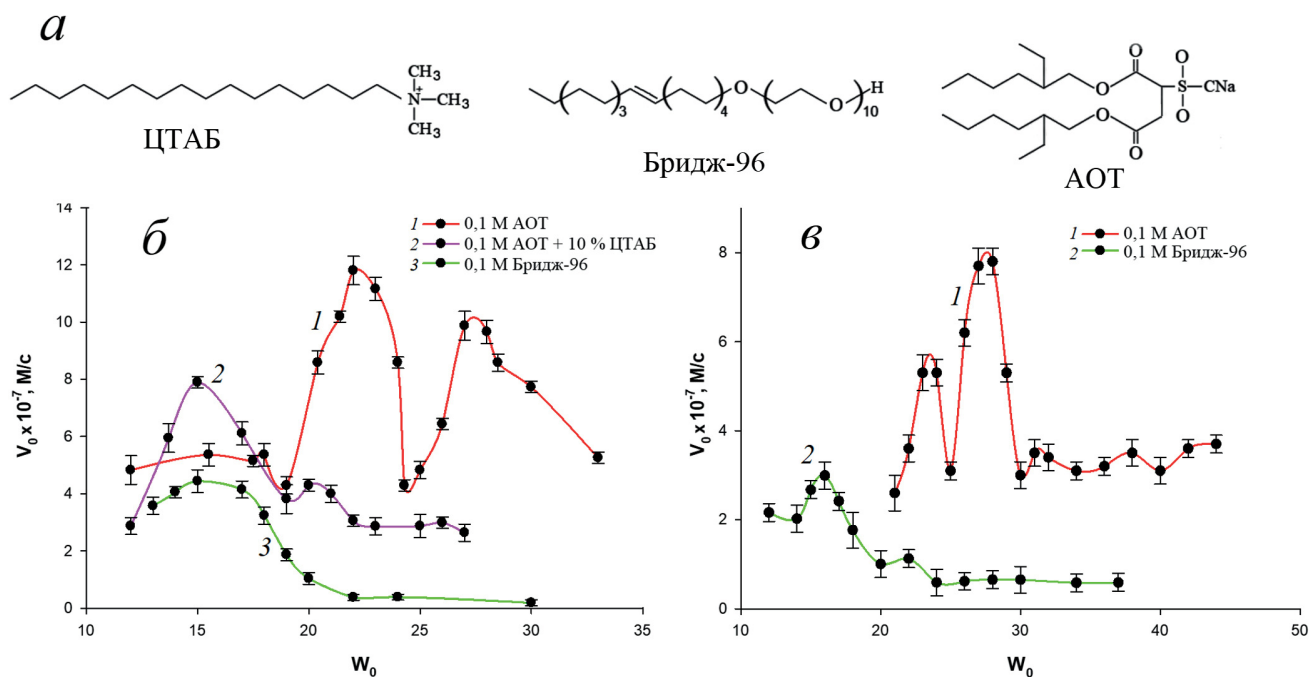


Рис. 6. Влияние природы мицеллообразующего ПАВ (а) на активность TcGAL (б) и AtGALDH (в) в системах обращённых мицелл. Условия общие для (б) и (в): 120 мкМ ФМС; 120 мкМ ДХФИФ; рН 8,8; $\lambda = 550 \text{ нм}$; 25°C . Концентрации фермента и субстрата: $6 \times 10^{-9} \text{ М}$ AtGALDH и 1 мМ ГЛ (б) и 34 нМ TcGAL и 1 мМ АЛ (в) соответственно. АЛ — D-арабиноно-1,4-лактон; ГЛ — L-галактоно-1,4-лактон

лишь в ограниченном интервале значений степени гидратации W_0 [26].

В представленной работе изучено функционирование TcGAL и AtGALDH в мицеллах на основе нейтрального и катионного ПАВ на примере Бридж-96 и ЦТАБ. В случае как TcGAL, так и AtGALDH (рис. 6) при использовании нейтрального ПАВ Бридж-96 или смешанных мицелл, содержащих ЦТАБ, в профилях активности обоих ферментов наблюдается один основной пик при низких степенях гидратации ($W_0 < 20$), то есть регистрируется функционирование только мономерной формы. Отметим, что стабильные фермент-содержащие мицеллы на основе Бридж-96 формируются при низких степенях гидратации ($W_0 < 20$), при более высоких W_0 наблюдается фазовое расслоение системы [27].

Усиление ферментативной активности в ЦТАБ-содержащих мицеллах наблюдалось ранее и для других ферментов — тирозиназы и холестеролоксидазы, в случае которых в диапазоне $W_0 = 10–20$ использование мицелл на основе ЦТАБ обеспечивало большую активность фермента по сравнению с мицеллами АОТ [28, 29]. Активация мономерной формы TcGAL при $W_0 = 15$ (в случае ЦТАБ-содержащих мицелл), вероятно, как и в случае ФХ и ФЭ, обусловлена положительным зарядом ЦТАБ («разбавляющим» отрицательный заряд поверхности раздела фаз у АОТ). Следует отметить, что разница во влиянии ЦТАБ и липидов ФХ и ФЭ обусловлена склонностью к образованию различных надмолекулярных структур этих ПАВ: в силу геометрических характеристик ЦТАБ (объёмная полярная голова и узкий гидрофобный «хвост»; рис. 6, а) склонен к образованию прямых мицелл, в то время как ФХ и ФЭ имеют тенденцию к образованию ламеллярной структуры и обращённых мицелл соответственно. Таким образом, изменение активности фермента в присутствии ЦТАБ объясняется влиянием ЦТАБ на структуру обращённых мицелл АОТ: локальным изменением радиуса кривизны и формированием дефектов в мицеллярной матрице (существенно в большей степени, чем в случае ФХ и ФЭ).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные данные говорят о существенном влиянии липидной матрицы на функционирование мембранотропных ферментов TcGAL и AtGALDH. Установлено, что в присутствии фосфолипидных добавок (ФХ и ФЭ)

в мицеллярных системах происходит усиление каталитической активности обоих ферментов за счёт изменения плотности заряда мицеллярной матрицы и изменения олигомерной структуры и радиуса кривизны мицелл. Наблюдается формирование новых олигомерных форм ферментов (тетрамеров), формирование липопротеидных комплексов, реализация более оптимальной конформации ферментов и т.д. Обнаружено, что активность TcGAL и AtGALDH сильно зависит от природы мицеллообразующего ПАВ: смешанные мицеллы на основе анионного и катионного ПАВ (АОТ + ЦТАБ) повышают активность фермента при $W_0 = 15$, однако при более высоких значениях W_0 наблюдается снижение каталитической активности. Различие во влиянии ЦТАБ и липидов обусловлено склонностью ЦТАБ в силу геометрии молекулы к образованию прямых мицелл (у ФХ и ФЭ — ламеллярная структура и обращённые мицеллы), что нарушает структуру обращённых мицелл АОТ и локально изменяет радиус кривизны мицелл. Полученные результаты открывают пути к регуляции каталитических свойств мембранных ферментов посредством варьирования состава липидной матрицы. Продемонстрирована возможность использования обращённых мицелл комбинированного состава для измерения активности TcGAL и AtGALDH в условиях, близких к функционированию ферментов при их взаимодействии с биомембранами. Включение липидных добавок позволит более достоверно оценивать действие возможных ингибиторов на TcGAL, являющегося потенциальной лекарственной мишенью в случае болезни Шагаса [30].

Вклад авторов. Е.В. Кудряшова — концепция и руководство работой; А.А. Чудин — проведение экспериментов; Е.В. Кудряшова, А.А. Чудин — обсуждение результатов исследования; А.А. Чудин — написание текста; Е.В. Кудряшова, А.А. Чудин — редактирование текста статьи.

Благодарности. Работа выполнена с использованием оборудования (ИК-спектрометр Фурье Bruker Tensor 27 (Германия) и КД-спектрометр Jasco J-815 («JASCO», Япония)) по программе развития МГУ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kudryashova, E. V., Leferink, N. G. H., Slot, I. G. M., and Van Berkel, W. J. H. (2011) Galactonolactone oxidoreductase from *Trypanosoma cruzi* employs a FAD cofactor for the synthesis of vitamin C, *Biochim. Biophys. Acta*, **1814**, 545-552, doi: 10.1016/j.bbapap.2011.03.001.
2. Quiñones, W., Acosta, H., Gonçalves, C. S., Motta, M. C. M., Gualdrón-López, M., and Michels, P. A. M. (2020) Structure, properties, and function of glycosomes in *Trypanosoma cruzi*, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **10**, 25, doi: 10.3389/fcimb.2020.00025.
3. Wilkinson, S. R., Prathalingam, S. R., Taylor, M. C., Horn, D., and Kelly, J. M. (2005) Vitamin C biosynthesis in trypanosomes: a role for the glycosome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 11645-11650, doi: 10.1073/pnas.0504251102.
4. Logan, F. J., Taylor, M. C., Wilkinson, S. R., Kaur, H., and Kelly, J. M. (2007) The terminal step in vitamin C biosynthesis in *Trypanosoma cruzi* is mediated by a FMN-dependent galactonolactone oxidase, *Biochem. J.*, **407**, 419-426, doi: 10.1042/BJ20070766.
5. Chudin, A. A., and Kudryashova, E. V. (2022) Improved enzymatic assay and inhibition analysis of redox membranotropic enzymes, AtGALDH and TcGAL, using a reversed micellar system, *Analytica*, **3**, 36-53, doi: 10.3390/analytica3010004.
6. Leferink, N. G. H., Heuts, D. P. H. M., Fraaije, M. W., and van Berkel, W. J. H. (2008) The growing VAO flavoprotein family, *Arch. Biochem. Biophys.*, **474**, 292-301, doi: 10.1016/j.abb.2008.01.027.
7. Хмельницкий Ю. Л., Левашов А. В., Клячко И. Л., Мартинек К. (1984) Микрогетерогенная среда для химических (ферментативных) реакций на основе коллоидного раствора воды в органическом растворителе, *Успехи химии*, **53**, 545-565.
8. Klyachko, N. L., Shchedrina, V. A., Efimov, A. V., Kazakov, S. V., Gazaryan, I. G., Kristal, B. S., and Brown, A. M. (2005) pH-dependent substrate preference of pig heart lipoamide dehydrogenase varies with oligomeric state: response to mitochondrial matrix acidification, *J. Biol. Chem.*, **280**, 16106-16114, doi: 10.1074/jbc.M414285200.
9. Kudryashova, E. V., Bronza, V. L., Vinogradov, A. A., Kamyshny, A., Magdassi, S., and Levashov, A. V. (2011) Regulation of acid phosphatase in reverse micellar system by lipids additives: structural aspects, *J. Colloid Interface Sci.*, **353**, 490-497, doi: 10.1016/j.jcis.2010.09.072.
10. De Azevedo-Martins, A. C., Ocaña, K., de Souza, W., de Vasconcelos, A. T. R., Teixeira, M. M. G., Camargo, E. P., Alves, J. M. P., and Motta, M. C. M. (2022) The importance of glycerophospholipid production to the mutualist symbiosis of trypanosomatids, *Pathogens*, **11**, 41, doi: 10.3390/pathogens11010041.
11. Oliveira, M. M., Timm, S. L., and Costa, S. C. G. (1977) Lipid composition of *Trypanosoma cruzi*, *Comp. Biochem. Physiol. B Comp. Biochem.*, **58**, 195-199, doi: 10.1016/0305-0491(77)90109-2.
12. Urbina, J. A., Marchan, E., Lazard, K., Visbal, G., Apitz-Castro, R., Gil, F., Aguirre, T., Piras, M. M., and Piras, R. (1993) Inhibition of phosphatidylcholine biosynthesis and cell proliferation in *Trypanosoma cruzi* by ajoene, an antiplatelet compound isolated from garlic, *Biochem. Pharmacol.*, **45**, 2381-2387, doi: 10.1016/0006-2952(93)90217-k.
13. Shome, A., Roy, S., and Kumar, P. (2007) Nonionic surfactants: a key to enhance the enzyme activity at cationic reverse micellar interface, *Langmuir*, **23**, 4130-4136, doi: 10.1021/la062804j.
14. Leferink, N. G. H., van den Berg, W. A. M., and van Berkel, W. J. H. (2008) L-Galactono-γ-lactone dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*, a flavoprotein involved in vitamin C biosynthesis, *FEBS J.*, **275**, 713-726, doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.06233.x.
15. Хмельницкий Ю. Л., Левашов А. В., Клячко И. Л., Черняк В. Я., Мартинек К. (1982) Ферменты, включенные в обращенные мицеллы поверхностно-активных веществ в органических растворителях. Исследование системы белок-аэрозоль ОТ-Н₂O-октан методом седиментационного анализа, *Биохимия*, **47**, 86-99.
16. Levashov, A. V., Khmelnsky, Y. L., Klyachko, N. L., Chernyak, V. Y., and Martinek, K. (1981) Ultracentrifugation of reversed micelles in organic solvent: new approach to determination of molecular weight and effective size of proteins, *Anal. Biochem.*, **118**, 42-46, doi: 10.1016/0003-2697(81)90153-6.
17. Краснопевцева М. К., Белик В. П., Богданов А. А., Семенова И. В., Смолин А. Г., Васютинский О. С. (2020) Определение времен затухания и анизотропии поляризованной флуоресценции флавиноаденидинуклеотида с субнаносекундным разрешением, *Письма ЖТФ*, **46**, 43-46, doi: 10.21883/PJTF.2020.12.49528.18234.
18. Kudryashova, E. V., Visser, A. J. W. G., and van Berkel, W. J. H. (2008) Monomer formation and function of p-Hydroxybenzoate hydroxylase in reverse micelles and dimethylsulfoxide/water mixtures, *ChemBioChem*, **9**, 413-419, doi: 10.1002/cbic.200700267.
19. Levashov, A. V. and Klyachko, N. L. (2001) Reverse micellar systems, *Methods Biotechnol.*, **15**, 575-586, doi: 10.1385/1-59259-112-4:575.
20. Tsui, F. C., Ojcius, D. M., and Hubbell, W. L. (1986) The intrinsic pKa values for phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in phosphatidylcholine host bilayers, *Biophys. J.*, **49**, 459-468, doi: 10.1016/S0006-3495(86)83655-4.
21. Levashov, A. V., Ugolnikova, A. V., Ivanov, M. V., and Klyachko, N. L. (1997) Formation of homo-

- and heterooligomeric supramolecular structures by D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase in reversed micelles of aerosol OT in octane, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **42**, 527-534, doi: 10.1080/15216549700202931.
22. Chatterley, A. S., Laity, P., Holland, C., Weidner, T., Woutersen, S., and Giubertoni, G. (2022) Broadband multidimensional spectroscopy identifies the amide II vibrations in silkworm films, *Molecules*, **27**, doi: 10.3390/molecules27196275.
 23. Кудряшова Е. В., Гладиллин А. К., Левашов А. В. (2002) Белки в надмолекулярных ансамблях: исследование структуры методом разрешенно-временной флуоресцентной анизотропии, *Усп. биол. химии*, **42**, 257-294.
 24. Jonas, A., and Drengler, S. M. (1977) Fluorescence polarization studies of human and rhesus a-i apolipoproteins and their complexes with phosphatidylcholine, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **78**, 1424-1430, doi: 10.1016/0006-291x(77)91451-6.
 25. Lolkema, J. S., and Slotboom, D. J. (2015) The Hill analysis and co-ion-driven transporter kinetics, *J. Gen. Physiol.*, **145**, 565-574, doi: 10.1085/jgp.201411332.
 26. Azimi, M., Nafissi-Varcheh, N., Faramarzi, M. A., and Aboofazeli, R. (2016) Laccase activity in CTAB-based water-in-oil microemulsions, *Iran J. Pharm. Res.*, **15**, 441-452.
 27. Kabanov, A. V., Nametkin, S. N., and Levashov, A. V. (1990) The principal difference in regulation of the catalytic activity of water-soluble and membrane forms of enzymes in reversed micelles. γ -Glutamyltransferase and aminopeptidase, *FEBS Lett.*, **267**, 236-238, doi: 10.1016/0014-5793(90)80933-a.
 28. Yang, Z., and Robb, D. A. (2005) Tyrosinase activity in reversed micelles, *Biocatal. Biotransform.*, **23**, 423-430, doi: 10.1080/10242420500387433.
 29. Gupte, A., Nagarajan, R., and Kilara, A. (1995) Enzymatic oxidation of cholesterol in reverse micelles, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **34**, 2910-2922, doi: 10.1021/ie00047a045.
 30. Чудин А. А., Злотников И. Д., Крылов С. С., Семенов В. В., Кудряшова Е. В. (2023) Ингибиторы галактонолактонооксидазы из *Trypanosoma cruzi* на основе аллилполиалкокксибензолов, *Биохимия*, **88**, 97-109, doi: 10.31857/S0320972523010074.

IMPACT OF LIPID MATRIX COMPOSITION ON THE ACTIVITY OF MEMBRANOTROPIC ENZYMES GALACTONOLACTONE OXIDASE FROM *Trypanosoma cruzi* AND L-GALACTONO-1,4-LACTONE DEHYDROGENASE FROM *Arabidopsis thaliana* IN THE SYSTEM OF REVERSE MICELLES

A. A. Chudin and E. V. Kudryashova*

*Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University,
119991 Moscow, Russia; e-mail: helenakoudriachova@yandex.ru*

The study of many membrane enzymes in an aqueous medium is difficult due to the loss of their catalytic activity, which makes it necessary to use membrane-like systems, such as reverse micelles of surfactants in nonpolar organic solvents. However, it should be taken into account that micelles are a simplified model of natural membranes, since membranes contain many different components, a significant part of which are phospholipids. In this work, we studied the impact of the main phospholipids, phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PE), on the activity of membrane enzymes using galactonolactone oxidase from *Trypanosoma cruzi* (TcGAL) and L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana* (AtGALDH) as an examples. Effect of the structure (and charge) of the micelle-forming surfactant itself on the activity of both enzymes has been studied using an anionic surfactant (AOT), a neutral surfactant (Bridge-96), and a mixture of cationic and anionic surfactants (CTAB and AOT) as an examples. The pronounced effect of addition of PC and PE lipids on the activity of AtGALDH and TcGAL has been detected, which manifests as increase in catalytic activity and significant change in the activity profile. This can be explained by formation of the tetrameric form of enzymes and/or protein-lipid complexes. By varying composition and structure of the micelle-forming surfactants (AOT, CTAB, and Bridge-96 and their combinations) it has been possible to change catalytic properties of the enzyme due to effect of the surfactant on the micelle size, lipid mobility, charge, and rigidity of the matrix itself.

Keywords: mixed micelles, cationic surfactants, galactonolactone dehydrogenase, phospholipids, *Trypanosoma cruzi*, *Arabidopsis thaliana*