

γ -GLUTAMIL TRANSZPEPTIDÁZ BEÉPÍTÉSE LIPOSZÓMÁKBA

CSERMELY PÉTER*, MÜLLNER NÁNDOR*, BÁTHORI GYÖRGY**,
VARGA VINCE* és SOMOGYI JÁNOS*

Semmelweis Orvostudományi Egyetem I. sz. *Kémiai-Biokémiai Intézete
és **Biofizikai Intézete, Budapest

Bevezetés

A γ -glutamil transzpeptidáz (γ -GT, EC : 2.3.2.2.) egy olyan, a sejtmembránhoz kötött glikoproteid, amely a γ -glutamil vegyületek γ -glutamil csoportjának aminosavakra, peptidekre és vízre való átvitelét katalizálja.

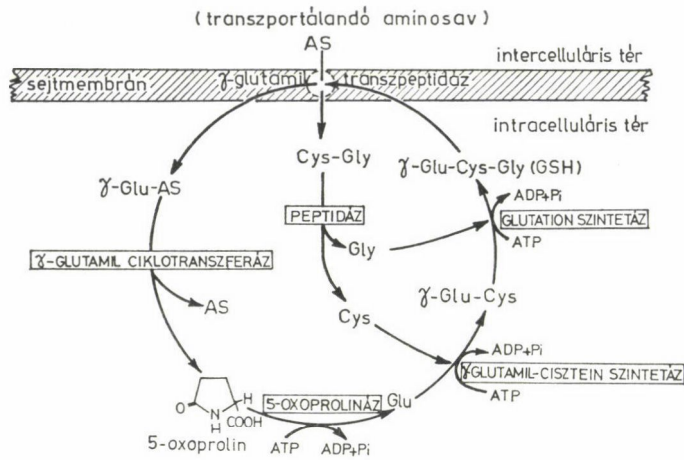
A γ -GT celluláris funkciójával kapcsolatos vélemények ellentétesek. A hetvenes évek elején MEISTER és ORLOWSKI (ORLOWSKI és MEISTER 1970, MEISTER 1973) írták le az úgynevezett γ -glutamil ciklust, amelynek kulcsenzime, a γ -GT — a szerzők véleménye szerint — az extracelluláris eredetű aminosavakat γ -glutamil aminosavként át is juttatja a sejt membránján. Azóta számos, ezen elképzelést bizonyító, illetve cáfoló adat látott napvilágot.

Az 1. ábrán látható, hogy a ciklus 6 enzime közül csupán egy, a γ -GT kötődik a plazmamembránhoz, a többi 5 a citoplazmában mutatható ki. A γ -glutamil aminosavként a membránon átjutó aminosavat a γ -glutamil ciklotranszferáz szabadítja fel a γ -glutamil kötésből. A többi 4 enzim végül is a glutation regenerálásához szükséges reakciókat katalizálja. Az is kiderül az ábrából, hogy amennyiben a keletkezett γ -glutamil aminosav nem szolgál γ -glutamil donorként egy következő aminosav számára, akkor minden molekula aminosav transzportjára — a glutation reszintézis energetikai igénye miatt — 3 molekula ATP terminális foszfát kötésének az energiája fordítódik.

A ciklus léte, működésére utal az a tény, hogy a ciklusban szereplő enzimek — főként hisztokémiai reakciókkal — olyan szöveteken, szerveken mutathatók ki jelentékeny aktivitással, ahol az aminosavak transzportja is kiemelkedően intenzív, így:

- a vese elsőrendű kanyarulat csatorna kefeszegélyének mikrovillusaiban, rendszerint a csúcsokon koncentrálnak, (MARATHE és mtsai 1979, SZEWCZUK és mtsai 1980),
- a vékonybélbolyhok kefeszegélyének mikrovillusaiban (MARATHE és mtsai 1979, SZEWCZUK és mtsai 1980),
- a choroid plexus epitél sejtjeiben (OKONKWO és mtsai 1974).

A γ -glutamil ciklus létének közvetett bizonyítékeként számos fiziológiai kísérlet, ill. klinikai megfigyelés szolgálhat (összefoglalás: MEISTER és TATE

1. ábra. A γ -glutamil-ciklus

1976). Néhány közülük: Aminosav túlterhelés esetén a vese glutation szintje csökken, turnover megnő, jelezve, hogy összefüggés van az aminosav reabszorpció és a glutation vesében játszott szerepe között (GRIFFITH és mtsai 1979). Amennyiben a transzpeptidáz aktivitását a transzpeptidációt gátló maleát adásával a glutation hidrolízise irányába toljuk el, aminosavuria lép fel (TATE és MEISTER 1974). Ez a megfigyelés már egy közvetlenebb bizonyítékot szolgáltat a γ -GT-nek az aminosavak reabszorpciójában betöltött szerepére. A vese a jelzett methionin-szulfonál (a glutation szintetizáló rendszer egyik kompetitív inhibitora) kétszer több γ -glutamil-methioninszulfont képes felvenni. Ez a „többlet”-felvétel a γ -glutamil transzpeptidáz szelektív inhibitoraival nagymértékben gátolható (GRIFFITH és mtsai 1979).

Ha a γ -glutamil-ciklus egy későbbi reakciót katalizáló tagját, az 5-oxoprolináz gátoljuk, az 5-oxoprolin mennyisége megnő, aminosav terhelés után pedig sokkal nagyobb koncentrációt ér el (ORLOWSKI és WILK 1975). Az 5-oxoprolin felhalmozódása olyan peptidek adása után is megfigyelhető, amelyek nem közvetlenül szubsztrátjai az 5-oxoprolin keletkezését katalizáló γ -glutamil-ciklotranszferáznak. E peptidek átalakulásában a γ -GT hatása az elsődleges (ORLOWSKI és WILK 1976).

A ciklust érintő enzimopátia is vezethet az 5-oxoprolin felhalmozódására. Öröklött oxoprolinuriában szenvedő betegek vizsgálata során kiderült, hogy szervezetükben a glutation szintetáz enzim szintje igen alacsony. A ciklusban a glutation keletkezését megelőző γ -glutamil-cisztein felszaporodása megnöveli az 5-oxoprolint szintetizáló γ -glutamil ciklotranszferáz aktivitását, amely a dipeptidet (mint egyik legjobb szubsztrátját) 5-oxoprolinná alakítja át (MEISTER és TATE 1976).

Mindezen megfigyelések a γ -glutamil-ciklus létét és az aminosavtranszportban játszott szerepét támasztották alá. Nem lehet célunk e dolgozat keretén belül az utóbbi években kibontakozott vita részletes ismertetése, de néhány fontos ellenvetésre mégis szeretnénk felhívni a figyelmet.

INOUE és mtsai (1977) számoltak be először arról, hogy a γ -GT membránban aszimmetrikusan, kizárólag a sejtközötti tér felé orientáltan helyezkedik el, amely megfigyelés a membránon keresztül történő transzlokációt katalizáló hatás ellen szól.

ELCE és BROXMEYER (1976) majd MCINTYRE és CURTHROYS (1979) a γ -GT transzpeptidáló és hidrolitikus aktivitásával foglalkozva megállapították, hogy a vesecsatornácskákban uralkodó koncentráció- és pH-viszonyoknak általuk választott modellje szerint az enzim katalitikus sajátságai közül a hidrolízis dominál.

Újabb kísérleti eredmények (HEINLE és WENDEL 1977, MAMELOK és mtsai 1980, SOCHOV és mtsai 1980) is ellentmondásossá tették a transzpeptidáz lokalizációjával kapcsolatban korábban kialakított egyértelmű képet, mert a ciklus enzimeit egymással nem összemérhető mennyiségben a kefeszegély membrán többi transzportáló rendszerétől elkülönítve sikerült izolálni.

SCHULMAN és mtsai (1975) egy olyan betegről számoltak be, aki szinte teljes γ -GT hiánya ellenére teljesen normális aminosav anyagcserével rendelkezett, vizeletében csak az ürített glutation mennyisége volt kórosan magas.

1977-től napjainkig számos elképzelés született ezen ellentmondások feloldására (OSUJI 1980, ANDERSON és mtsai 1980), azonban kielégítő magyarázatot mind ez idáig nem sikerült adni. E tisztázatlan helyzet tette szükségessé, hogy a γ -GT funkcióját az eddigiektől eltérő módszerekkel vizsgáljuk. Ezek egyike mesterséges membránba, liposzómába beépített γ -GT funkciójának, transzportáló képességének laboratóriumunkban jelenleg folyó vizsgálata.

A γ -glutamil transzpeptidáz membránból való elkülönítésének, szolubilizálásának alapvetően két módja ismeretes. Az egyik azt a tényt használja ki, hogy az enzimet egy viszonylag kicsi, 52 aminosavat tartalmazó hidrofób peptidrészet rögzíti a membránhoz (MATSUDA és mtsai 1980/b.), amely papainnal szelektíven emészthető. A másik módszerrel detergenssek, legtöbbször Nadezoxikolát segítségével a membránt egészében szolubilizáljuk. Mi ezen utóbbi utat követtük, hiszen az enzim mesterséges membránba való építéséhez szükségünk volt a hidrofób peptidrészetre is.

Membránenzimeknek eredeti lipidkörnyezetükbe való visszaépítésére (rekonstrukciójára), illetve mesterséges membránba való beépítésére szintén két alapvető módszert írtak le. Az egyik módszer szerint a liposzómák készítésére szolgáló klasszikus eljárást alkalmazzák: a foszfolipidekből membránfőhéjék jelenlétében ultrahanggal állítják elő a liposzómákat. A másik módszert RACKER (1966) dolgozta ki a hatvanas évek elején. Ennek lényege, hogy először a membránenzimet és a lipidmolekulákat detergenssel (legtöbbször Na-kolát-

tal) szolubilizálják, majd a detergens eltávolítására a keveréket lassú dialízisnek vetik alá. A módszer egy másik változata szerint a detergens eltávolítása Sephadex gélszűrővel történik. A különböző módszerek hátrányait mérlegeltük (a szonikálásnak az enzimet károsító hatása, a kísérleti körülmények definiálhatatlansága, fémmennyiségek mint szennyezők, N_2 atmoszféra, illetve időigényesség: újabb, nehezen eltávolítható szennyező komponens — Na-klórát — bevitele a rendszerbe stb.) és ezért más utat választottunk.

Már régebben is állítottak elő liposzómákat úgy, hogy az etanolban oldott lipidet gyorsan kevertetett vizes közegbe fecskendezték (BATZRI és KORN, 1973, KREMER és mtsai 1977). Kísérleteinkben ilyen módszerrel előállított liposzómába építettük be a γ -GT-t. Az enzimet vagy a puffert vizes közeg (0.1 M TRIS HCl — pH 8,5 —, 0,15 M NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 3 mM NaN_3) tartalmazta, vagy utólag adtuk hozzá a kész liposzómákhoz. Az adott koncentrációviszonyok mellett (11 v/v% etanol) az etanol a γ -GT-t számottevő mértékben nem denaturálta.

Liposzómáknak, mint membránmodelleknek a használata számos előnyrel rendelkezik:

- az *in vivo* körülményeket sokkal inkább megközelítő környezetben helyezzük el a vizsgált enzimet,
- jó néhány fizikai tulajdonság (fázisátalakulási pont, ultraibolya (UV) spektrum, elektron-spin rezonancia (ESR), differenciál-kalorimetrikus (DSC) vizsgálatok stb.) mérésére nyílik lehetőség,
- és végül a transzportfolyamatok vizsgálata szempontjából döntő fontosságú előny az enzim-liposzóma komplex kompartmentalizáltsága, amely a lipid kettősrétegnek a szubsztrátok számára való átjárhatatlanságából fakad. (E megállapítással a következőkben részletesebben foglalkozunk.)

Munkánk során, amely az itt közölt kísérleteken kívül a transzportsajátságok, a liposzómák UV spektruma és DSC görbéi vizsgálatára is kiterjed, ezeket az előnyöket kívánjuk hasznosítani.

Eredmények

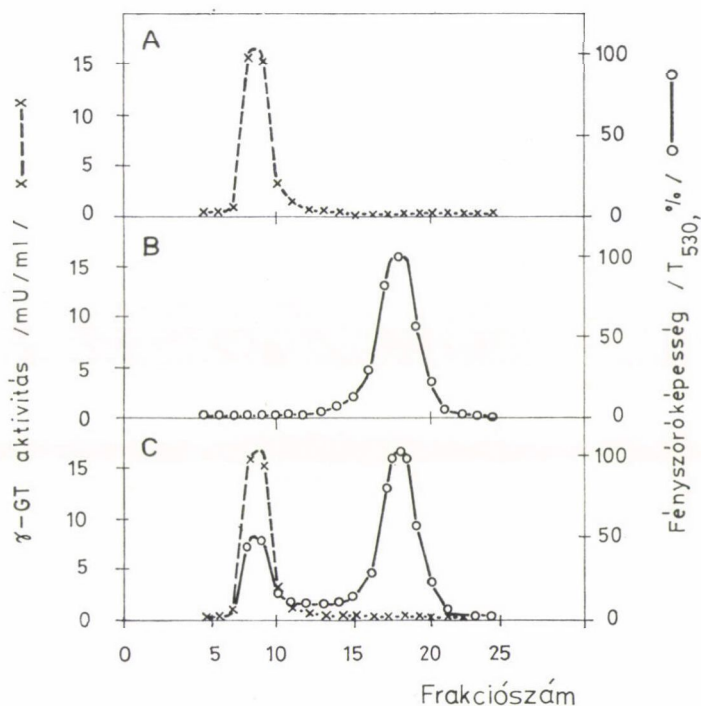
Bizonyítékok a γ -GT membránba való integrális beépülésére: A γ -GT liposzómákba való beépítésével eddig két munkacsoport foglalkozott. HUCHEY és mtsai (1979) a következő bizonyítékokat sorolta fel az integrális beépülés mellett: együttmozgás Sepharose 4B oszlopon lineáris cukorgradiensben, illetve töréspont az enzim Arrhenius diagramjában a dipalmitoil-lecitin fázisátalakulási pontjánál.

SIKKA és KALRA (1980) a liposzómákat (a kevésbé definiált körülményeket biztosító) ultrahangos kezeléssel állították elő, a beépülést az enzimaktivitás és a liposzómák együttmozgása alapján tényként fogadták el.

Mi a fenti, bizonyító erejű kísérletek közül a Sepharose 4B gélszűrést és az Arrhenius diagram felvételét végeztük el. Ezekről és az integrális beépülést bizonyító két további eredményről az alábbiakban számolunk be.

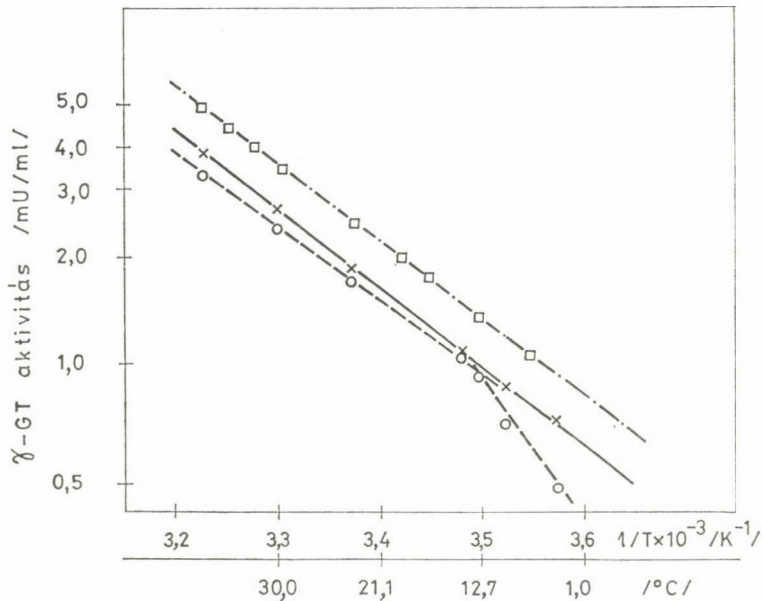
Együttmozgás Sepharose 4B oszlopon

A γ -glutamil transzpeptidázt a TATE és MEISTER (1975) által kifejlesztett módszer alapján patkányveséből izoláltuk. A beépült enzimmennyiséget a be nem épülttől egy $1,5 \times 40$ cm-es Sepharose 4B oszlopon történő gélszűréssel választottuk el (2. ábra).



2. ábra. γ -glutamil transzpeptidáz beépülése tojáslecitin liposzómába. A Sepharose 4B gélszűrés szokásos elúciós profiljai: A) enzimmentes liposzóma, B) liposzómákat nem tartalmazó γ -GT, C) az elúciós profil beépítés után. Az enzim-liposzóma komplex készítésekor használt közeg (4 ml) 0,15 M NaCl, 10 mM MgCl₂, 0,1 M TRIS·HCl (pH 8,5) és 3 mM NaN₃ tartalmú. 5–10 perces kevertetés után injektáltuk az 1 μ g-nyi 50 U/mg fajlagos aktivitású enzimet tartalmazó pufferbe a 0,5 ml etanolban oldott 50 mg tojáslecitint. Az etanol eltávolítására a keletkezeti liposzómákat 4 °C-on 5 órán át 10×50 ml ugyanilyen összetételű puffer ellenében dializáltuk. Az enzim aktivitásának meghatározására szolgáló reakcióelegy (1 ml): 0,15 M NaCl, 10 mM MgCl₂, 0,1 M TRIS·HCl (pH 8,2) 50 mM GlyGly és 4 mM γ -Glu-p-nitroanilid. Az inkubálási idő 37 °C-on 30 perc volt, a reakciót 0,5 ml 20%-os TCA-val állítottuk le. A 405 nm-en történő extinkciómérés előtt 1 ml 1 M TRIS oldattal állítottuk vissza a pH-t 8 körülire. A liposzómák közelítő mennyiségét 530 nm-en történő fényszóródásméréssel határoztuk meg

Mértük az egyes (kb. 1 ml-es) frakciók γ -GT aktivitását és fényszóróképeségét. Az enzim liposzómába épülésének mértékét a liposzómákkal együttmozgó enzimaktivitásnak az összaktivításra vonatkoztatott %-os mértékét választhattuk, mivel az alkalmazott enzimmennyiség összaktivitása a beépülés során változatlan maradt. Látható, hogy a teljes enzimaktivitásnak kb. 1/4-e ($26,5 \pm 1,5\%$) volt a liposzómákkal azonos helyen detektálható.



3. ábra. A transzpeptidáz aktivitásának hőmérsékletfüggése. Az enzim 1%-os TRITON-X-100-as oldatában (○ ——— ○), az 1%-nyi TRITON-X-100-zal szolubilizált enzim-liposzóma komplexben (× — · — · — · ×), az enzim-liposzóma komplexben (○ - - - - - ○)

Arrhenius diagram felvétele

A 3. ábrán a tojáslecitinből készült liposzómába épült enzim Arrhenius diagramjában 12–13 °C körül töréspont figyelhető meg. Ilyen törés sem a beépítetlen („szabad”) 1%-os TRITON X-100-zal szolubilizált enzimmel, sem az előállítás után ugyancsak 1%-nyi TRITON X-100-zal szolubilizált enzim-liposzómával nem mutatható ki. A töréspont helye jól magyarázható a tojáslecitinnek az oldatbeli Mg^{2+} ionok (10 mM) által megemelt fázisátalakulási hőmérséklettartományával (MONTAL 1976). Az 1. táblázat adataiból látható, hogy a különböző minták vizsgálata során kapott aktiválási energia értékek igen közel esnek egymáshoz. Ez alól csak a liposzómába épített enzim által katalizált folyamatnak a fázisátmenet alatti (5–10 °C közötti) aktiválási energiája kivétel, amely a többinél szignifikánsan nagyobb. Mindezen eredmé-

I. táblázat

A γ -glutamil transzpeptidáz által katalizált reakció aktiválási energiája

Kísér- letek száma	Enzim	Hőfok- tartomány °C	Aktiválási energia		Korreláció	Fázis- átalakulás hőmérséklet
			(kJ/M)	(kcal/M)		
2	γ -GT 1% TRITON-ban	5—40	55,3 \pm 3,1	13,1	0,996	—
4	γ -GT liposzómában	5—10	70,8 \pm 6,0	16,8	0,998	12,8
4	γ -GT liposzómában	15—40	54,0 \pm 4,2	12,0	0,996	—
2	γ -GT liposzómában + 1% TRITON	5—40	47,3 \pm 4,3	11,2	0,999	—

(A közölt adatok átlagértékek 95%-os konfidenciaszintű eltérésekkel.)

nyek nagymértékben igazolják, hogy a transzpeptidáz integrálisan épült be a liposzómába.

A képződött komplex megbontása hipertóniás közeg segítségével

Elsőként monolayereken végzett kísérletek alapján ismerték fel, hogy a lipid-fehérje kölcsönhatásnak két összetevője van (összefoglalás: GENNIS és JONAS 1977):

- Elektrosztatikus jellegű erők a fehérje hidofil csoportjai és a lipid-molekulák fejszoptjai között léphetnek fel. Ez a kölcsönhatási mód reverzibilis, a pH és az ionerősség változtatásával megszüntethető.
- Hidrofób jellegű kölcsönhatás pedig a fehérjék hidrofób régiói és a lipidmolekulák szénhidrogén láncai között jöhet létre. A kölcsönhatás kialakulásának egyik alapvető feltétele a lipíd rétegbeli hibahelyek („rések”) léte, ahová a fehérje hidrofób oldalláncai beékelődhetnek. Ez a kölcsönhatás irreverzibilis, csak a lipid kettősréteg (pl. detergenssel történő) megbontása esetén szüntethető meg.

A fenti megfontolások alapján próbáltuk meghatározni, hogy a transzpeptidáz és a lipid kettősréteg kölcsönhatásakor milyen erőkkel számolhatunk, vagy másképpen, hogy a transzpeptidáz döntően elektrosztatikusan, azaz perifériálisan, vagy hidrofób kölcsönhatások segítségével, azaz integránsan kötődik a membránhoz.

E kérdést a már korábban egybeépített enzim-liposzóma komplex elektrosztatikus, ill. hidrofób (detergenssel szembeni) stabilitásának vizsgálatával indirekt módon válaszolhatjuk meg. Amennyiben a membránfehérje a megnövelt ionerősség, vagy a megváltoztatott pH hatására a membrántól elválasztható, akkor perifériális, azaz döntően elektrosztatikus jellegű kötődésről beszélhetünk. Amennyiben azonban az elválasztás csak detergenssek segítségével valósítható meg, a kötődés integráns, azaz döntően hidrofób jellegű volt.

Mivel a transzpeptidáz izoelektromos pontja kb. pH 4–5 körül van (MATSUDA 1980a) és ha a közeg pH-ját ez alá csökkentjük az enzim inaktívódik, az enzim-liposzóma komplex elektrosztatikus stabilitását nyilvánvalóan csak az ionerősség változtatásával tudtuk vizsgálni.

Kísérleteinkben 0,6, illetve 1,1 mólos végkoncentrációjú NaCl oldatot használtunk elektrolitként, az ily módon megnövelt ionerősségű oldatokban az enzim-liposzóma komplexet 37 °C-on 30 percen át inkubáltuk. A liposzómákat és az esetlegesen „leoldott” enzimet 1 mólos szacharóz oldatra történő rétegzéssel és az ezt követő ultracentrifugálással (75 000 g, 30 perc, 15 °C) választottuk el. A centrifugálás során a megadott kísérleti feltételek betartására ügyelni kell, ugyanis pl. 90 000 g felett és 10 °C alatt — fázisátalakulási pont! — az elválás kifejezetten rosszabb. A centrifugálást ilyen körülmények között végezve a liposzómák az 1 mólos szacharóz oldat határfelületén vékony réteget alkotva helyezkednek el.

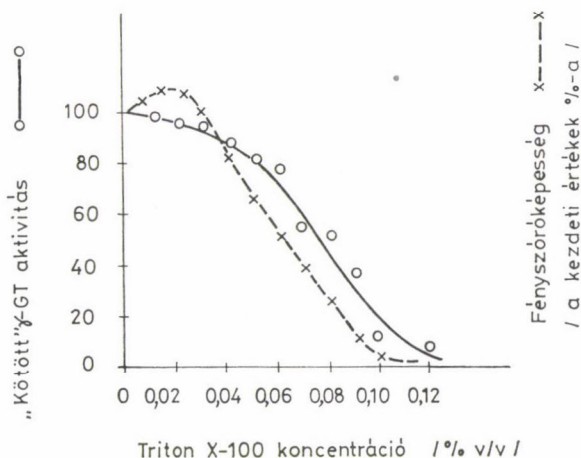
A centrifugálás után az 1 mólos szacharóz oldat és a liposzómák vékony rétege felett képződő felülúszóban mért aktivitás nem mutatott különbséget az „elektrolit nélkül” lecentrifugált mintához képest. Mindkét esetben az összaktivitásnak kb. 10%-a volt mérhető a felülúszóban, tehát a γ -glutamil transzpeptidáz megnövelt ionerősség segítségével nem távolítható el a liposzómáról, ami erősen alátámasztja beépülésének hidrofób jellegét.

A képződött komplex megbontása detergens segítségével

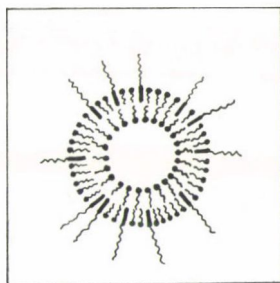
A fentiekén kívül a beépülés integráns voltának további bizonyítékeként fogadhatjuk el az enzim-liposzóma komplex TRITON X-100-zal történő fokozatos megbontásának vizsgálatokor kapott eredményeket. A liposzómák degradációját fényszóródásméréssel vizsgáltuk. Mivel az oldat lipidkoncentrációja elég kicsiny — 0,8 mg/ml — volt, a liposzómák hígításával e tartományban a fényszóróképeség közel lineárisan változik.

A különböző koncentrációjú TRITON X-100-at tartalmazó liposzóma szuszpenziót a fényszórás értékének meghatározása után lecentrifugáltuk (75000 g, 30 perc, 15 °C) majd meghatároztuk a felülúszóban megjelenő „felszabadult” enzim aktivitását. A 4. ábrán látható aktivitásértékek az összaktivitás és a felülúszóban mért aktivitás különbségének az összaktivitásra vonatkoztatott %-os értékei, amely a liposzómához kötötten maradt aktivitást jelent. Látható, hogy a liposzómához kötött enzim aktivitása és a fényszóróképeség az alkalmazott TRITON-X-100 koncentráció függvényében párhuzamosan csökken a fényszórásmérés során tapasztalt kezdeti maximumtól eltekintve. Ezt a maximumot valószínűleg a TRITON-X-100 molekuláinak a saját kritikus micellaképző koncentrációjuk (0,016%, ROBINSON és TANFORD 1975) — alatti, liposzómákba történő „befúródása” és ezáltal a liposzómák méretének megnövekedése okozza (5. ábra).

Ezt a magyarázatot támasztják alá FU és LAUGHLIN (1980) analitikai ultracentrifugás és fényszóródásmérési kísérletei is, amelyekben hosszú szénláncú detergenseknek (saját micellaképző kritikus koncentrációjuk alatti) liposzómákhoz való adszorpcióját bizonyítják.



4. ábra. A képződött enzim-liposzóma komplex fokozatos megbontása TRITON-X-100 detergenssel



5. ábra. A TRITON-X-100 detergens liposzómákkal való kölcsönhatása a detergens saját kritikus micellaképző koncentrációja (0,016%) alatt (Feltételezett modell)

Beépülés előzetesen elkészített liposzómába

Az enzim-liposzóma komplex stabilitásának vizsgálata során kapott eredmények arra utalnak, hogy a beépülés során az enzim hidrofób része kapcsolódott a lipidmembrán hidrofób régiójával. Monolayereken végzett kísérletekből viszont ismert, hogy az ilyen típusú kölcsönhatások a különféle fehérjék és a kész monolayer között spontán is létrejöhetnek. Analógiát feltételezve ezzel az enzim beépülésének mértékét olyan kísérleti körülmények között vizsgáltuk meg, amikor utólag adtuk a γ -GT-t a már előzetesen elkészített liposzómákhoz.

Eredményeink szerint 37 °C-on 30 perc alatt a tojáslecitin—liposzómákhoz adott enzimaktivitásnak kb. 1/5-e (18%); 120 perc után kb. 1/4-e (23%) épült be a liposzómákba a Sepharose 4B oszlopon történő elválasztás alapján. Ha az inkubálást dimirisztoil foszfatidil-kolin (DMPC) vezikulákkal különböző hőmérsékleten szintén 30 percig végeztük, a beépült enzimaktivitás igen nagy mértékben függött a hőmérséklettől (2. táblázat). Látható, hogy a beépülés a DMPC fázisátalakulási pontján (23 °C) a legnagyobb mértékű.

2. táblázat

A γ -glutamil transzpeptidáz DMPC liposzómákba való beépülésének mértéke különböző hőmérsékleten

A beépítés hőmérséklete	A beépült enzimaktivitás %-os értéke
10 °C	6,2 ± 2,9%
23 °C	28,9 ± 3,3%
35 °C	14,0 ± 2,8%

A kísérleti körülmények hatása a beépülés mértékére

Vizsgáltuk a kísérleti körülmények változtatásának a beépülés mértékére gyakorolt hatását. A detergens jelenlétének, az emelt magnéziumion koncentrációnak és a szubsztrát jelenlétének hatását a beépült enzim mennyiségére a 3. táblázatban tüntettük fel.

3. táblázat

A γ -glutamil transzpeptidáz liposzómába épülésének mértéke különböző közegekben

A beépítéskor alkalmazott közeg	A beépült enzimaktivitás %-os mértéke
a. Kontroll	26,5 ± 1,5%
b. Kontroll + 0,001% TRITON-X-100	35,7 ± 1,3%
c. Kontroll + 10 mM Mg ⁺⁺	40,9 ± 1,2%
d. Kontroll + 40 mM glutation	25,6 ± 3,2%

(Kontroll: 0,1 M TRIS HCl — pH 8,5 —, 0,15 M NaCl, 10 mM MgCl₂, 3 mM NaN₃.)

A b. esetben alkalmazott TRITON-X-100 koncentráció messze a kritikus micellaképző koncentráció (0,016%) és még messzebb a detergens liposzómákat megbontó (0,1%) koncentrációja alatt van (ld. 4. ábra). Az oldatban lévő TRITON-X-100 molekulák az 5. ábrán bemutatotthoz hasonlóan a membrán szerkezetében hibahelyeket generálva könnyíthették meg a beépülést. A detergens esetleg az enzim aggregációjának további visszaszorításában is szerepet játszott.

A c. esetben pedig, amint erre S. RAZIN (1972) már régebben rámutatott, a Mg ionok a foszfatidilkolin részek foszfátcsoportjai és az enzim között ionos hidat alkotva segíthették elő a beépülést. A d. pontbeli eredmény arra utal, hogy a szubsztrát kötődése a beépülés mértékét nem befolyásolja.

A kialakult enzim-liposzóma komplex a kísérleti körülmények között igen stabilnak mutatkozott: a Sepharose 4B gélszűrés segítségével elválasztott enzim-liposzóma komplex több napos 4 °C-on történő tárolás és újbóli Sepharose 4B-n történő gélszűrés után ugyanakkora enzimaktivitást tartalmazott, mint az első gélszűrés után. (Azaz „levált” enzimaktivitás nem volt észlelhető.)

A γ -glutamil transzpeptidáz orientációja liposzómákban

E kérdést eddig a papainnal való szelektív emészthetőség nyomkövetésével tanulmányozták. Behizonyosodott, hogy a liposzóma membránhoz kötött teljes γ -GT aktivitás eltávolítható az enzim-liposzóma komplex papainnal történő emésztésével. (TSAO és CURTHROYS 1980). Az így szolubilizált enzim összaktivitása a kezdeti, membránhozkötött összaktivitással pontosan megegyezik. A papainnal emésztett enzim liposzómákba való beépülésre képtelen (HUGHEY és mtsai 1979). Az enzim orientációját a lipidmembránban a detergens nélkül és annak jelenlétében végzett enzimaktivitás-mérés összehasonlítása alapján tanulmányoztuk, kiindulva abból, hogy a lipid kettősréteg a vízdékony szubsztrátok számára átjárhatatlan. Saját kísérleteinkben radioaktív foszfát, triciált GDP és szukeinát felhasználásával bizonyítottuk be, hogy az általunk készített liposzómák és impermeabilisek a vízdékony vegyületekre.

Ha a γ -GT aktivitásának mérését sértetlen liposzómákkal végezzük, a szubsztrátkötő centrumokkal a liposzómák belseje felé orientált enzim molekulák inaktívak maradnak. A másik típusú mérésnél az inkubálás előtt 0,5%-os végkoncentrációjú TRITON-X-100-zal tettük szabaddá a liposzómáktól az összes enzimet. Mivel a TRITON-X-100 aktiváló hatása elhanyagolható (2%) a két típusú mérés közti különbség az aktív centrumot tekintve a szubsztrát számára elérhetetlen (tehát „befelé”, „keresztbe” álló, vagy bezárt) enzim mennyiségét adja meg. E különbség 4–5%-nak adódott, tehát az enzim zöme (95–96%-a) „kifelé” áll. Ez megegyezik a HUGHEY és mtsai (1979) által kapott szintén 95%-os eloszlással, jó összhangban áll továbbá a liposzómák által az adott kísérleti feltételek mellett bezárt térfogat (4–8%) arányával is (BÁTHORI Gy. nem közölt adat). Megjegyzendő, hogy SIKKA és KALRA (1980) hasonló módszerrel csak 75–85%-os kifelé történő orientációt kapott, ez egyértelműen az eltérő kísérleti körülményeknek tulajdonítható.

A beépülés arányára vonatkozó eredményeinket más irodalmi adatokkal (HUGHEY és mtsai 1979) összevetve feltűnő, hogy az általunk választott módszerrel a detergens-eltávolításos módszerrel kapottnál, jóval kisebb enzim-mennyiség épül be a liposzómába. (HUGHEY és mtsai 1979 azonos lipid, sőt

10-szeres enzim mennyiséget alkalmazva 100%-os beépülést értek el.) Detergens eltávolításos módszerrel nemcsak a γ -GT, hanem a citokróm oxidáz, és a $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPáz esetében is közel 100%-os beépülés volt elérhető. Az általunk kapott csökkent beépülési képességét az enzimnek a detergens távollétében észlelt aggregációja magyarázhatja. Az aggregátumokat a detergens a formálódó vagy kész lipid kettősrétegnél jóval hatékonyabban képes megbontani, s így a beépülés teljesebbé válhat. A jobb hatásfokot biztosító módszerekkel szemben az injektálásos módszerrel készült liposzómákba való beépítés nagy előnye, hogy ez az eljárás az enzimet igen kevésbé károsítja. Ez a spontán beépülésre (tehát az enzimnek a már kész liposzómához való adása során) különösen jellemző. A spontán beépülés vizsgálata alapján egyrészt lehetőség nyílt a beépítés egy teljesen új, az enzimet legkevésbé károsító módjának kifejlesztésére, másrészt azonban lehetséges, hogy át kell értékelnünk az enzim beépülésének mechanizmusáról alkotott eddigi ismereteinket.

Könnyen elképzelhető ugyanis, hogy a liposzómák keletkezése során az enzimnek csak egy tört része épül be a lipid-vezikulába és a maradék a hosszas dialízis során spontán ékelődik be a lipid molekulák közé. Elképzelhető az is, hogy a beépülés zömében a fázisátalakulási ponton zajlik le. Itt a hibahelyek száma igen magas, ami elősegíti a folyamatot. A 37 °C-on történő spontán beépülés vizsgálata során felhasznált tojáslecitin liposzómák gél-szűrése 4 °C-on történt. Így lehűlés közben a liposzómák 10–12 °C-on lezajló fázisátalakulása következtethetett. Nem kizárt tehát a beépülés ily módon való teljessé tétele sem. Ezt a feltételezést támasztják alá a dimirisztoil-foszfatidil-kolin (DMPC) liposzómákkal végzett kísérletek is, ahol a beépülés szintén a fázisátalakulási ponton volt a legnagyobb.

A γ -GT ezen tulajdonságával eléggé egyedülálló a membránenzimek körében. E spontán beépülésre való hajlam talán összefüggésbe hozható azon ugyancsak a szokásostól eltérő sajátosságával, hogy az enzimnek a membránhoz való rögzítését biztosító hidrofób része a nagyobbik alegység N-terminális részletével azonos (MATSUDA és mtsai 1980a). A BLOBEL és mtsai (1971) által felállított szignál hipotézis szerint ugyanis a kiválasztásra kerülő fehérjék és a membránfehérjék jelentős részének bioszintézise során először egy „pre-N-terminális” részlet keletkezik a ^mRNS -en lévő, ún. „szignál” alapján. A kötőhelyet felismerve és kialakítva tulajdonképpen ez a peptid felelős a kezdetben szabad riboszómáknak az endoplazmatikus retikulumhoz való kötődéséért. A szintézis további szakaszaiban az endoplazmatikus retikulumon kialakult póruson keresztül a szintetizálódó fehérje mind nagyobb szakaszai kerülnek át a retikulum túlsó, ciszternális részére. Membránfehérjék esetében végül sor kerülhet annak a C-terminális, vagy ahhoz közeli hidrofób peptid darabnak a szintézisére, amely a fehérjének a membránhoz való kötődését a továbbiakban biztosítja (BLOBEL és SABATINI 1971, BLOBEL és DOBBERSTEIN 1979, ROTHMAN és LENARD 1977).

Látható, hogy a membránfehérjék keletkezésének ezen elmélete a γ -glutamil transzpeptidázra az N-terminális hidrofób rész miatt nem alkalmazható. Elképzelhető, hogy az enzimnek a membránba való beépülése a spontán beépüléssel összhangban valamilyen szintézis utáni asszociációs folyamat eredménye.

Az általunk alkalmazott módszerrel előállított enzim-liposzóma komplexszel az irodalomban eddig közöltnél definiáltabb körülmények között vizsgálhatjuk a γ -glutamil transzpeptidáz transzportáló sajátságait, választ keresve az enzim funkciója körül kibontakozott vita kérdéseire.

* * *

Ezúton szeretnénk kifejezni köszönetünket Somogyi Györgyinek (Biofizikai Intézet) a liposzómák előállításában nyújtott segítségével.

IRODALOM

1. ANDERSON, M. E., BRIDGES, R. J., MEISTER, A.: Direct evidence for inter-organ transport of glutathione and that the non filtration renal mechanism of glutathione utilization involves γ -glutamyl transpeptidase. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* **96**, 848–853 (1980).
2. BATZRI, S., KORN, E. D.: Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochim. Biophys. Acta* **298**, 1015–1019 (1973).
3. BLOBEL, G., SABATINI, D. D.: Ribosome-membrane interaction in eukariotic cells. In *Biomembranes*, L. A. Manson Ed. Plenum Publishing Corporation N. Y. **2**, 193–195 (1971).
4. BLOBEL, G., DOBBERSTEIN, B.: Transfer of proteins across membranes I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J. Cell. Biol.* **67**, 835–851 (1975).
5. ELCE, J. S., BROXMEYER, B.: γ -glutamyl transpeptidase of rat kidney. *Biochem. J.* **153**, 223–232 (1976).
6. FU, Y. C., LAUGHLIN, R. G.: Distearoil phosphatidyl-choline/ammoniohexanoate surfactant interactions. *Chem. Phys. Lipids* **26**, 121–139 (1980).
7. GENNIS, R. B., JONAS, A.: Protein-lipid interactions. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **6**, 195–249 (1977).
8. GRIFFITH, O. W., BRIDGES, R. J., MEISTER, A.: Transport of γ -glutamyl amino acids: role of glutathione and γ -glutamyl transpeptidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 6319–6322 (1979).
9. HEINLE, H., WENDEL, A.: The activities of the key enzymes of the γ -glutamyl cycle in microdissected segments of the rat nephron. *FEBS Letters* **73**, 220–224 (1977).
10. HUGHEY, R. P., COYLE, P. J., CURTHROYS, N. P.: Comparison of the association and orientation of γ -glutamyl transpeptidase in lecithin vesicles and in native membranes. *J. Biol. Chem.* **254**, 1124–1128 (1979).
11. INOUE, M., HORIUCHI, S., MORINO, Y.: γ -glutamyl transpeptidase in rat ascites tumor cell LY-5. Lack of functional correlation of its catalytic activity with the amino acid transport. *Eur. J. Biochem.* **73**, 609–615 (1977).
12. KREMER, J. M. H., ESKER, M. W. J. v. d., PATHMAMANOHRAN, C., WIERSEMA, P. H.: Vesicles of variable diameter prepared by a modified injection method. *Biochemistry* **16**, 3932–3935 (1977).
13. MAMELOK, R. D., GROTH, D. F., PRUSINEER, S. B.: Separation of membrane bound γ -glutamyl transpeptidase from brush border transport and enzyme activities. *Biochemistry* **19**, 2367–2373 (1980).
14. MARATHE, G. V., NASH, B., HASHEMEYER, R. H., TATE, S. S.: Ultrastructural localisation of γ -glutamyl transpeptidase in rat kidney and jejunum. *FEBS Letters* **107**, 436–440 (1979).

15. MATSUDA, Y., TSUJI, A., KATUNUMA, W.: Studies on the structure of γ -glutamyl transpeptidase I. Correlation between sialylation and isoenzyme forms. *J. Biochem.* **87**, 1243–1248 (1980a).
16. MATSUDA, Y., TSUJI, A., KATUNUMA, W.: Studies on the structure of γ -glutamyl transpeptidase II. Localisation of the segment anchoring γ -glutamyl transpeptidase to the membrane. *J. Biochem.* **87**, 1567–1571 (1980b).
17. MCINTYRE, TH., CURTHROYS, N. P.: Comparison of the hydrolytic and transfer activities of rat renal γ -glutamyl transpeptidase. *J. Biol. Chem.* **254**, 6499–6504 (1979).
18. MEISTER, A.: On the enzymology of amino acid transport. *Science* **180**, 33–39 (1973).
19. MEISTER, A., TATE, S. S.: Glutathione and related γ -glutamyl compounds, biosynthesis and utilization. *Ann. Rev. Biochem.* **45**, 560–604 (1976).
20. MONTAL, M.: Experimental membranes and mechanism of bioenergy transductions. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **5**, 119–175 (1976).
21. OKONKWO, O., ORLOWSKI, M., GREEN, J. P.: Enzymes of the γ -glutamyl cycle in the choroid plexus and brain. *J. Neurochemistry* **22**, 1053–1058. (1974).
22. ORLOWSKI, M., MEISTER, A.: The γ -glutamyl cycle: a possible transport system for amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **67**, 1248–1255 (1970).
23. ORLOWSKI, M., WILK, S.: Intermediates of γ -glutamyl cycle in mouse tissues. *Eur. J. Biochem.* **53**, 581–590 (1975).
24. ORLOWSKI, M., WILK, S.: Metabolism of γ -glutamyl amino acids and peptides in mouse liver and kidney „IN VIVO”. *Eur. J. Biochem.* **71**, 549–555 (1976).
25. OSUJI, G. O.: Glutathione turnover and amino acid uptake in yeast. *FEBS Letters* **105**, 283–285 (1979).
26. OSUJI, G. O.: The kinetics of the γ -glutamyl cycle mediated amino acids. *FEBS Letters* **110**, 192–194 (1980).
27. RACKER, E., KAGAWA, Y.: Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **241**, 2475–82 (1966).
28. RAZIN, S.: Reconstitution of biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **265**, 241–296 (1972).
29. ROBINSON, N. C., TANFORD, C.: The binding of deoxycholate, TRITON-X-100, sodium dodecyl sulphate and phosphatidylcholine vesicles to cytochrome b_5 . *Biochemistry* **14**, 369–378 (1975).
30. ROTHMAN, J. E., LENARD, J.: Membrane asymmetry. *Science* **195**, 743–753 (1977).
31. SCHULMAN, J. D., GOODMAN, S. J., MACE, J. W., PATRICK, A. D., TIETZE, F., BUTLER, E. J.: Glutathionuria: inborn error of metabolism due to tissue deficiency of γ -glutamyl transpeptidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **65**, 68–74 (1975).
32. SIKKA, S. C., KALRA, V. K.: γ -glutamyl transpeptidase mediated transport of amino acids in lecithin vesicles. *J. Biol. Chem.* **255**, 4399–4402 (1980).
33. SOCHOV, M., EL SHEIK, O. K., MCLEAN, P.: γ -glutamyl transpeptidase in glomeruli and tubules of rat kidney cortex: effect of experimental diabetes. *Enzyme* **25**, 205–209 (1980).
34. SZEWCZUK, A., MILNEROVITZ, H., POLOSATOV, M. V., SOBIECH, K. A.: Immunofluorescent localization of γ -glutamyl transpeptidase in rat and bovine tissues. *Acta Histochem.* **66**, 152–159 (1980).
35. TATE, S. S., MEISTER, A.: Stimulation of the hydrolytic activity and decrease of the transpeptidase activity of γ -glutamyl transpeptidase by maleate; identity of rat kidney maleate-stimulated glutaminase and γ -glutamyl transpeptidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 3329–3333 (1974).
36. TATE, S. S., MEISTER, A.: Identity of maleate-stimulated glutaminase and γ -glutamyl transpeptidase in rat kidney. *J. Biol. Chem.* **250**, 4619–27 (1975).
37. TSAO, B., CURTHROYS, N. P.: The absolute asymmetry of orientation of γ -glutamyl transpeptidase and aminopeptidase on the external surface of the rat renal brush border membrane. *J. Biol. Chem.* **255**, 7708–7712 (1980).