



УДК 577.15.025.153.2

**РОЛЬ ГИДРОФОБНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В РЕАКЦИЯХ,
КАТАЛИЗИРУЕМЫХ ФОСФОЛИПАЗОЙ А₂ ИЗ ЯДА КОБРЫ
NAJA NAJA OXIANA****Желковский А. М., Дьяков В. Л., Антонов В. К.***Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Спектрофотометрическим методом изучено взаимодействие акридинового красителя профлавина с фосфолипазой А₂. Краситель эффективно комплексуется с ферментом. Кинетическим и спектрофотометрическим методами показано, что профлавин является конкурентным ингибитором гидролиза специфического субстрата — 1,2 дибутироил-*sn*-глицеро-3-фосфорилхолина, из чего следует, что взаимодействие красителя и субстрата осуществляется по одному и тому же гидрофобному участку фермента. Изучена кинетика ферментативного гидролиза в ряду короткоцепочечных синтетических субстратов, аналогов природного лецитина, в области концентраций, дающих истинные растворы. Из анализа констант специфичности можно сделать заключение, что в гидрофобном взаимодействии с ферментом участвуют оба углеводородных радикала.

Фосфолипаза А₂ (КФ 3.1.1.4) относится к интересной группе липолитических ферментов, специфическая активность которых сильно зависит от агрегатного состояния субстрата [1—3]. Скорость гидролиза фосфоглицеридов возрастает на несколько порядков при переходе от истинных растворов к мицеллярным растворам. Это свойство — основная характерная особенность липолитических ферментов, отличающая их от других эстераз, катализирующих гидролиз нелипидных субстратов. Механизм активации этих ферментов на границе раздела фаз до сих пор неясен.

Следует отметить, что, несмотря на специфические особенности липолитических ферментов, для их изучения могут быть с успехом использованы ранее разработанные химические и физические методы исследования белков. Целью настоящей работы является выяснение роли гидрофобных взаимодействий в гидролизе фосфатидилхолинов под действием фосфолипазы А₂ из яда среднеазиатской кобры (*Naja naja oxiana*). В настоящее время данные о роли гидрофобных взаимодействий в механизме действия фосфолипазы А₂ из ядов змей весьма противоречивы. Это относится, в частности, к вопросу о существовании на ферменте гидрофобного участка связывания с субстратом [3, 4].

В последнее время при исследовании ферментативного катализа широко используется метод, в основе которого лежит комплексование красителей с белками [5]. В частности, введение в молекулу фермента «репортерной группы», в качестве которой выступает краситель, оказалось весьма эффективным для изучения роли гидрофобных взаимодействий в механизме функционирования ряда ферментов [6—9]. Мы показали, что краситель акридинового ряда — профлавин эффективно взаимодействует с фосфолипазой А₂, причем соблюдается главное требование, предъявляемое к такому

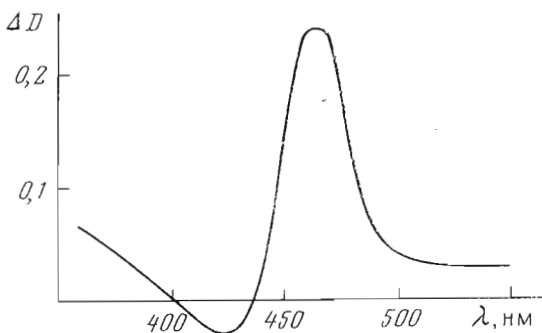


Рис. 1. Разностный спектр поглощения комплекса фосфолипазы A_2 с профлавином относительно свободного красителя. Условия: $[E]_0 = 250$ мкМ, $[П]_0 = 56$ мкМ

типу взаимодействий. Оно заключается в том, что комплексообразование фермента с красителем должно приводить к заметному изменению спектра поглощения последнего.

При взаимодействии профлавина с фосфолипазой A_2 происходит смещение максимума поглощения красителя в длинноволновую область (рис. 1). Предварительная модификация фосфолипазы A_2 по гистидиновому остатку *п*-бром-фенацилбромидом резко снижает эффективность комплексообразования красителя с ферментом. Максимум разностного спектра расположен при 465 нм, а минимум — в области 420 нм. В дальнейшем сопоставляли концентрацию комплекса фосфолипаза — профлавин с величиной разности оптических плотностей дифференциального спектра в области максимума и минимума ($\Delta\Delta D_{465-420}$). Это было связано прежде всего со значительной опалесценцией растворов белка при высоких концентрациях и стремлением свести к минимуму влияние этого эффекта на картину разностного спектра. Если величина $\Delta\Delta D_{465-420}$ пропорциональна концентрации комплекса фосфолипаза — профлавин, то, используя метод, предложенный ранее [8] для схемы



получим при условии $[E]_0 \gg [П]_0 \tau$ (τ — доля связанного с ферментом красителя) уравнение, связывающее изменение обратной величины разностной оптической плотности с обратной величиной концентрации используемого фермента:

$$\frac{1}{\Delta\Delta D_{465-420}} = \frac{1}{\Delta\Delta\epsilon_{465-420} l [П]_0} + \frac{K_{П}}{\Delta\Delta\epsilon_{465-420} l [П]_0} \cdot \frac{1}{[E]_0}, \quad (2)$$

где $K_{П}$ — константа комплексообразования, а $\Delta\Delta\epsilon_{465-420} = \Delta\epsilon_{465} - \Delta\epsilon_{420}$, где $\Delta\epsilon_{465}$ и $\Delta\epsilon_{420}$ — разности молярные коэффициенты экстинкции комплекса фермент — краситель в максимуме (λ 465 нм) и соответственно минимуме (λ 420 нм) дифференциального спектра. При обработке данных в координатах $1/\Delta\Delta D_{465-420} \div 1/[E]_0$ (рис. 2) видно, что соблюдается линейная зависимость между этими величинами, что указывает на пропорциональность величины $\Delta\Delta D_{465-420}$ концентрации комплекса. Из тангенса угла наклона полученной экспериментальной прямой и величины отрезка, отсекаемого на оси ординат продолжением экспериментальной прямой, можно вычислить $K_{П} = 1,2$ мМ и $\Delta\Delta\epsilon_{465-420} = 28\,000$ М⁻¹·см⁻¹. В связи с тем что молярность фермента, указанная в подписях к рисункам, вычислена из расчета молекулярного веса мономерной формы фермента, а в условиях эксперимента фермент ассоциирован и существует в виде димера, константу диссоциации комплекса фермент — краситель следует считать равной 0,6 мМ.

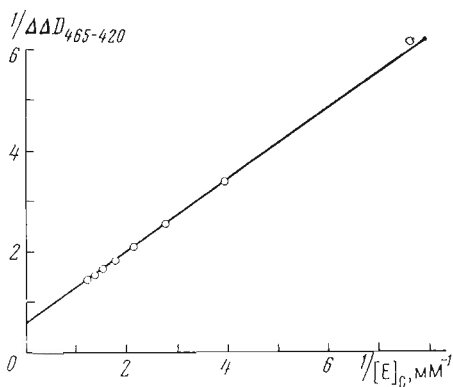


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость величины обратной разностной оптической плотности от обратной концентрации фосфолипазы A_2 . Условия: $[П]_0 = 58,6 \text{ мкМ}$

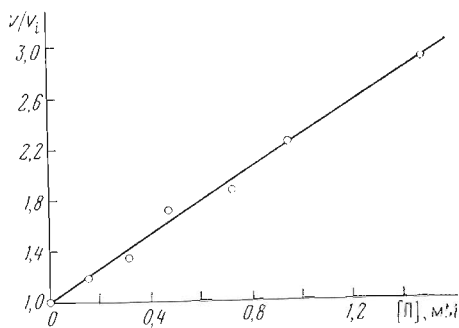


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость степени ингибирования гидролиза 1,2-дибутироил-*sn*-глицеро-3-фосфорилхолина от концентрации профлавина

Для доказательства того, что центр связывания димера фосфолипазы A_2 с профлавином является одновременно центром взаимодействия фермента с липидом, необходимо было исследовать ингибирование красителем гидролиза специфического субстрата фосфолипазой A_2 . В качестве субстрата нами был выбран 1,2-дибутироил-*sn*-глицеро-3-фосфорилхолин, являющийся хорошим водорастворимым субстратом для этого фермента. В зависимости от типа ингибирования профлавином гидролиза субстрата выражение для v/v_i , где v_i — скорость гидролиза в присутствии профлавина, имеет следующий вид:

$$v/v_i = 1 + [П]/K_i \quad (3)$$

для неконкурентного ингибирования и

$$v/v_i = 1 + \frac{K_m}{K_m + [S]} \cdot \frac{[П]}{K_i} \quad (4)$$

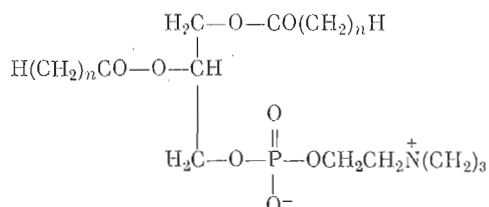
для конкурентного ингибирования.

Тогда из тангенса угла наклона полученной экспериментальной (рис. 3) прямой для неконкурентного типа ингибирования можно получить K_i 0,79 мМ, в то время как для конкурентного типа торможения константа ингибирования в условиях эксперимента ($[S]_0$ 12,5 мМ) составляет $\sim 0,7$ мМ, так как величина K_m равна $\sim 0,1$ М.

Для достоверного выяснения типа ингибирования фосфолипазы A_2 профлавином достаточно было бы исследовать влияние профлавина на ферментативный гидролиз при различных концентрациях субстрата, сопоставимых с K_m . Однако в наших условиях такой эксперимент не дал бы четкого ответа на поставленный вопрос, так как величина K_m превышает критическую концентрацию мицеллообразования. В связи с этим было исследовано влияние присутствия субстрата на комплексообразование профлавина с ферментом в отсутствие ионов кальция, которые активируют каталитическую активность фосфолипазы A_2 . Субстрат в концентрации 65 мМ (ниже критической концентрации мицеллообразования), как следует из уменьшения более чем в 1,5 раза $\Delta\Delta D_{465-420}$, вызывает снижение эффективности комплексообразования профлавина с ферментом в отсутствие ионов кальция. Это указывает на то, что, вероятно, взаимодействие фермента с профлавином и субстратом происходит по одному и тому же участку фермента и, значит, можно сделать заключение о конкурентном типе ингибирования фосфолипазы A_2 профлавином. Таким образом, полу-

ческая константа ингибирования хорошо согласуется с величиной, полученной спектрофотометрическим титрованием, и, по всей вероятности, следует учитывать роль гидрофобных взаимодействий в процессе функционирования фосфолипазы A_2 .

Алифатические цепи фосфатидилхолинов могут взаимодействовать с активным центром фермента двояким способом: 1) фермент может взаимодействовать только с одним остатком жирной кислоты, этерифицирующим гидроксил у C_2 фосфатидилхолина, 2) взаимодействие может происходить с обоими остатками жирных кислот. Чтобы выяснить этот вопрос, мы сравнили кинетические параметры гидролиза фосфолипазой A_2 гомологических короткоцепочечных фосфатидилхолинов. С этой целью нами были синтезированы фосфатидилхолины общей формулы



где $n = 1-4$.

Для всех субстратов в водорастворимой области были получены кинетические кривые ферментативного гидролиза. Однако ни в одном конкретном случае нам не удалось разделить индивидуальные кинетические константы ферментативного гидролиза, K_m и V , так как, очевидно, во всех случаях константы Михаэлиса превышают критические концентрации мицеллообразования соответствующих субстратов. В связи с этим нами были вычислены только константы специфичности $k_{\text{кат}}/K_m = k_2/K_s$ (см. таблицу). Сопоставление значений, приведенных в таблице, свидетельствует о том, что эффективность каталитической трансформации субстратов в значительной степени зависит от величины углеводородной части субстрата. Из анализа зависимости констант специфичности от размеров углеводородных радикалов в ряду фосфатидилхолинов следует, что при переходе к каждому следующему члену ряда константа специфичности резко возрастает, причем график зависимости удовлетворительно описывается прямой линией (рис. 4). По величине наклона графика можно вычислить вклад в свободную энергию активации каждой CH_2 -группы боковых цепей. Этот вклад в среднем составляет -650 кал/моль, что характерно для гидрофобных взаимодействий [9].

Таким образом, из полученных данных следует, что в молекуле активной фосфолипазы существует гидрофобная область, размеры которой пока еще трудно оценить. Комплексование профлавина с гидрофобной областью фермента полностью ингибирует ферментативный гидролиз синтетических субстратов в области истинных растворов. При каталитической трансформации синтетических субстратов в гидрофобном взаимодействии с ферментом участвуют, по-видимому, оба углеводородных радикала, однако в

Константы специфичности гидролиза фосфолипазой A_2 синтетических субстратов

Субстрат	Критич. концентр. мицеллообразования, М	Используемые концентрации		k_2/K_s , М ⁻¹ ·с ⁻¹
		субстрат, мМ	фермент, мМ	
1,2-Диацетил- <i>sn</i> -глицеро-3-фосфохолин	>0,2	5-200	50	0,081
1,2-Дипрописнил- <i>sn</i> -глицеро-3-фосфохолин	>0,1	20-100	15	0,71
1,2-Дибутироил- <i>sn</i> -глицеро-3-фосфохолин	0,075	12,5-100	2,5	8,07
1,2-Дивалероил- <i>sn</i> -глицеро-3-фосфорилхолин	0,05	12,5-75	0,154	37

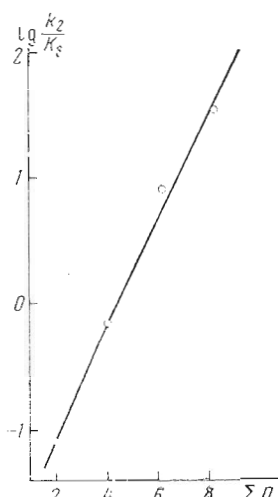


Рис. 4. Зависимость констант специфичности от общего числа (Σn) атомов углерода в остатках жирных кислот молекулы субстрата

ким путем, исходя из значения молярного коэффициента 33 400 при 444 нм [8]. Все остальные препараты и компоненты буферных растворов были марки ч. д. а.

Кинетические измерения начальных скоростей ферментативного гидролиза синтетических субстратов осуществляли методом потенциометрического титрования в режиме рН-статирования (рН-стат ТТТ-60, Radiometer, Дания), используя автоматическую бюретку АВU-13 объемом 0,25 мл. Реакцию проводили в стеклянной термостатированной кювете, снабженной магнитной мешалкой, в объеме 1 мл при 37°, рН 7,5, и с 1 мМ концентрацией Ca^{2+} . Концентрацию субстрата и фермента варьировали в зависимости от типа субстрата, как указано в таблице. Критические концентрации мицеллообразования (КМ) оценивались из кинетических кривых по активации фермента на границе раздела фаз. В кювету титратора вносили растворы Ca^{2+} и субстрата, доводили рН до нужного значения, прописывали спонтанный гидролиз субстрата (10—15 мин), который учитывали в расчетах, после чего добавляли фермент. Опыты по ингибированию ферментативного гидролиза профлавином проводили в тех же условиях, используя профлавин с заданной концентрацией при концентрациях субстрата III 12,5 мМ, фермента — 3 мкМ и Ca^{2+} — 3 мМ.

Комплексообразование профлавином с фосфолипазой A_2 было изучено при 37° в 0,1 М Трис-НСI-буфере (рН 7,5), 0,1 М NaCl, 3,3 мМ CaCl_2 . Спектрофотометрические измерения проводили на самопишущем спектрофотометре «Gilford 2400-2» (США). Во всех экспериментах применялись свежеприготовленные растворы красителя. Исходную концентрацию фермента определяли по навеске. При спектрофотометрическом титровании красителя раствором фермента каждый раз учитывали разбавление реакционного раствора.

ЛИТЕРАТУРА

1. De Haas G. H., Bonsel P. P. M., Pieterse W. A., Van Deenen L. L. M. (1974) *Biochem. et biophys. acta*, 239, 252—266.
2. Wells M. A. (1972) *Biochemistry*, 11, 1030—1041.
3. Wells M. A. (1974) *Biochemistry*, 13, 2248—2257.

настоящий момент трудно оценить механизм такого взаимодействия в связи с отсутствием индивидуальных констант.

Экспериментальная часть

Препарат фосфолипазы A_2 из яда кобры *Naja naja oxiana* любезно предоставлен А. И. Мирошниковым (Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва). Характеристики фермента и критерии чистоты представлены в работе [10].

Однокислотные лецитины природной (L) конфигурации синтезировали из кадмиевого комплекса *sn*-глицеро-3-фосфорилхолина путем ацилирования смесью ангидрида соответствующей жирной кислоты и ее калиевой соли в среде сухого диметилформамида [11] с последующей очисткой хроматографией на колонках с силикагелем и смесью амберлитов IRC-50 и IRA-40.

Коммерческим препаратом профлавином (ч.д.а., Союзреактив) пользовались без дополнительной очистки. Концентрацию красителя в растворе рассчитывали спектрофотометрическим путем.

4. Purdon A. D., Tinker D. O., Spero L. (1977) *Can. J. Biochem.*, 55, 205—214.
5. Klotz I. M., Burkhard R. K., Urganhart J. M. (1952) *J. Amer. Chem. Soc.*, 74, 202—208.
6. Turner D. C., Brand L. (1968) *Biochemistry*, 7, 3381—3390.
7. Kotaki A., Naoi M., Yagi K. (1971) *Biochim. et biophys. acta*, 229, 547—556.
7. Bernhard S. A., Lee B. F., Tashjian Z. H. (1966) *J. Mol. Biol.*, 18, 405—420.
9. Мартинек К., Левашов А. В., Березин И. В. (1970) *Молекулярн. биология*, 4, 339—347, 517—529.
10. Апсалон У. Р., Шамборант О. Г., Мирошников А. И. (1977) *Биоорган. химия*, 3, 1553—1559.
11. Gordon D. T., Jensen R. G. (1972) *Lipids*, 7, 261—262.

Поступила в редакцию
25.VII.1977

ROLE OF HYDROPHOBIC INTERACTION IN THE REACTIONS CATALYZED BY PHOSPHOLIPASE A₂

[ZHELKOVSKY A. M., DYAKOV V. L., ANTONOV Y. K.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow.*

Interaction of the acridine dye, proflavine, with the phospholipase A₂ from *Naja naja oxiana* venom has been studied spectrophotometrically. It was shown that the dye forms the complex with the enzyme. On the basis of the competitive inhibition by proflavine of the hydrolysis of specific substrate (1,2-dibutyril-*sn*-glycero-3-phosphocholine) it was concluded that the dye and the substrate are bound at the same hydrophobic loci of the enzyme active site. The kinetics of the hydrolysis of short-chain synthetic substrates of phospholipase A₂ has been studied in the concentration range of molecular solutions. It follows from the analysis of the specificity constants (k_{kat}/K_m) that both aliphatic chains may be implicated in the interaction with the enzyme.
