



УДК 577.153.211.02:547.993:598.126:543.544

**МИКРОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИАЦИИ
ФОСФОЛИПАЗЫ A₂ ИЗ ЯДА СРЕДНЕАЗИАТСКОЙ КОБРЫ
NAJA NAJA OXIANA В ПРИСУТСТВИИ СУБСТРАТА
В МОНОМЕРНОЙ И МИЦЕЛЛЯРНОЙ ФОРМАХ****Мальцев В. Г., Зимина Т. М., Беленький В. Г.,
Куренбин О. И.***Институт высокомолекулярных соединений Академии наук СССР, Ленинград***Павлова Н. П., Дьяков В. Л., Антонов В. Г.***Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР, Москва*

Методами эксклюзионной микроколоночной хроматографии и равновесной седиментации исследовано влияние субстрата (дигексаноиллецитина) в форме истинного раствора и в мицеллярной форме на равновесие димеризации изоферментов Е-2 и Е-3 фосфолипазы A₂, а также влияние промотора (Ca²⁺) и ингибитора (Ba²⁺) на комплексообразование фермента с мицеллярным субстратом. Для изофермента Е-3 в присутствии Ba²⁺ степень димеризации уменьшается, причем субстрат в форме истинного раствора никак не влияет на степень димеризации. Изофермент Е-2 в исследованных концентрациях находится в мономерной форме; ионы Ba²⁺, а также субстрат в растворе не вызывают димеризации. Для обоих изоферментов мицеллярный субстрат полностью сдвигает равновесие в сторону димера. Показано, что катионы Ba²⁺ препятствуют, а катионы Ca²⁺ способствуют образованию комплекса димерного фермента с мицеллярным субстратом. Таким образом, ингибирование и активирование липолиза катионами Ba²⁺ и Ca²⁺ соответственно осуществляются не на стадии ассоциации, а на стадии взаимодействия активного димера с мицеллярным субстратом.

Ранее [1] мы показали, что фосфолипаза A₂ (изофермент Е-3; КФ 3.1.1.4) из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana* существует в растворе в виде равновесной смеси мономера и димера. Было найдено, что ионы Ca²⁺ не влияют на положение равновесия (константа димеризации $K = 3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$), но заметно снижают скорости ассоциации и диссоциации фермента. Эти данные, а также имеющиеся сведения [2, 3] позволяют заключить, что активной формой фосфолипазы A₂ может быть димер. Если принять эту точку зрения, то из сравнения скоростей димеризации и липолиза [1] следует, что субстрат должен заметно влиять на скорость ассоциации или положение мономер-димерного равновесия фермента.

Чтобы проверить это предположение, мы исследовали мономер-димерное равновесие изоферментов Е-2 и Е-3 фосфолипазы A₂ в присутствии ионов Ca²⁺ и Ba²⁺, а также субстрата — дигексаноиллецитина в концентрациях, соответствующих истинным растворам ($[S]_0 \ll \text{ККМ}$) и растворам мицелл ($[S]_0 \gg \text{ККМ}$). Здесь ККМ — критическая концентрация мицеллообразования, равная 10,5 мМ [4]. Исследование проводили методами равновесной седиментации и фронтальной эксклюзионной хроматографии.

Поскольку результаты, показанные на рис. 1, получены для разбавленных растворов ($c \leq 1 \text{ мг/мл}$), это позволяет пренебречь эффектом неидеальности [5] и считать, что определяемая в опыте кажущаяся молекулярная масса (M_w^*) равна истинной средневесовой молекулярной массе (M_w). По определению средневесовой величины, молекулярная масса для системы мономер — димер

$$\bar{M}_w = \sum_{i=1}^2 i_z M_i, \quad (1)$$

Используемый метод	Константа равновесия димеризации в используемых системах, К·10 ⁻⁴ , М ⁻¹		
	в отсутствие Ва ²⁺ и S	в присутствии Ва ²⁺	в присутствии Ва ²⁺ и S (1 мг/мл)
Равновесная седиментация	6,0±0,3	2,1±0,2	2,1±0,2
Гель-проникающая хро- мография	6,0±0,5	2,1±0,1	2,1±0,1

где f_1 и f_2 — весовые доли, а M_1 и M_2 — молекулярные массы мономера и димера соответственно.

Поскольку $\sum_{i=1}^2 f_i = 1$, после элементарных преобразований получим

$$f_1 = 2 - \frac{\bar{M}_w}{M_1}, \quad (2)$$

откуда можно определить константу димеризации (K) в системе мономер — димер:

$$K = \frac{c_2}{c_1^2} = \frac{f_2}{f_1^2 c} = \frac{1 - f_1}{f_1^2 c}, \quad (3)$$

где c — общая концентрация белка. Значение молекулярной массы мономера M_1 13 447 известно из данных по первичной структуре фермента [6].

Экспериментальные точки для ассоциации фосфолипазы А₂ в отсутствие субстрата и Ва²⁺, полученные при равновесной седиментации (рис. 1), хорошо укладываются на представленную кривой I расчетную зависимость $\bar{M}_w(c)$, построенную по формулам (2) и (3) для K (6,0±0,3) · 10⁴ М⁻¹ (таблица). Эта величина совпадает с определенным из хроматографических данных значением константы димеризации (6,0±0,5) · 10⁴ М⁻¹ [1].

Измерения средневесовой молекулярной массы фосфолипазы А₂ в системах, содержащих 20 мМ Ва²⁺ или Ва²⁺ и субстрат при концентрации ниже ККМ, показывают, что равновесие ассоциации при связывании Ва²⁺ сдвигается в сторону мономера и удовлетворительно описывается одинаковой для обеих систем константой димеризации (2,1±0,2) · 10⁴ М⁻¹. Таким образом, в присутствии Ва²⁺ субстрат в форме истинного раствора не влияет на равновесие димеризации изофермента Е-3 фосфолипазы А₂, а ингибирующее действие Ва²⁺ по отношению к этой форме субстрата по крайней мере частично связано с увеличением степени диссоциации активного димера фермента.

Результаты хроматографических экспериментов с фосфолипазой А₂ (изофермент Е-3) показаны на рис. 2. Ордината на рис. 2 соответствует приведенному объему элюции центра тяжести переднего фронта хроматограммы

$$\frac{\bar{V}}{V_T} = \frac{\bar{V}}{V_{II} + V_0},$$

где V_{II} — объем пор геля, V_0 — объем межчастичного пространства геля,

$$\bar{V} = \int_0^c V dc / \int_0^c dc, \quad V_T — \text{объем элюции триптофана. Нормированный на } V_T$$

объем элюции использовали в связи с проведением экспериментов на нескольких колонках. Согласно работе [7], в случае достаточно быстрого установления равновесия ассоциации $\bar{V} = \bar{V}_w$, т. е. положение центроида

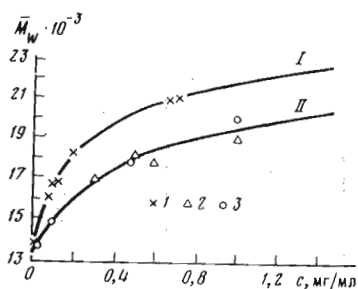


Рис. 1

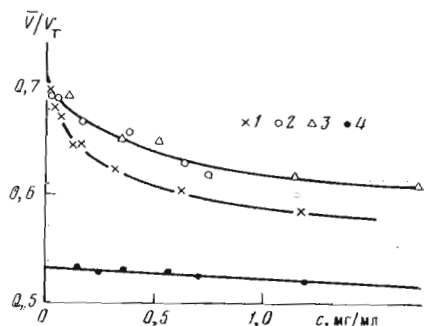


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость средневесовой молекулярной массы изофермента Е-3 фосфолипазы A_2 от концентрации фермента при равновесной седиментации в отсутствие $BaCl_2$ и субстрата (1), в присутствии $BaCl_2$ и субстрата в области истинного раствора (2) и в присутствии $BaCl_2$ (3). Кривые I и II — расчетные зависимости для K $(6 \pm 0,3) \cdot 10^4$ и $(2,1 \pm 0,2) \cdot 10^4$ M^{-1} соответственно

Рис. 2. Экспериментальная концентрационная зависимость приведенного объема элюции изофермента Е-3 фосфолипазы A_2 в отсутствие $BaCl_2$ и субстрата (1), в присутствии $BaCl_2$ (2), в присутствии $BaCl_2$ и субстрата в области истинного раствора (3), в присутствии $BaCl_2$ и субстрата при мицеллярной концентрации (4)

определяет средневесовой элюционный объем. В нашем случае (для двухкомпонентной системы)

$$\bar{V}_w = f_1 V_1 + f_2 V_2 = V_2 + f_1 (V_1 - V_2), \quad (4)$$

где V_1 и V_2 — элюционные объемы мономера и димера, f_1 и f_2 — их весовые доли в равновесном растворе. После элементарных преобразований имеем

$$f_1 = \frac{\bar{V}_w - V_2}{V_1 - V_2}, \quad (5)$$

откуда, учитывая уравнение (3), легко получить

$$K = \frac{(V_1 - \bar{V}_w)(V_1 - V_2)}{(\bar{V}_w - V_2)^2 c}. \quad (6)$$

Из этой формулы, пользуясь изображенной на рис. 2 концентрационной зависимостью $\bar{V}/V_T = \bar{V}_w/V_T$, можно определить константу димеризации. Расчеты проводили следующим образом: выбрав в качестве первого приближения для V_1/V_T значение, полученное при экстраполяции на бесконечное разбавление зависимости $\bar{V}(c)/V_T$, варьировали V_2/V_T и K , добываясь наилучшего совпадения расчетных и экспериментальных данных с помощью критерия наименьших квадратов. Затем величины V_1/V_T , V_2/V_T и K уточняли при варьировании их с более коротким шагом. Учитывали также концентрационную зависимость V_1 и V_2 [8]:

$$V_i(c) = V_i^0 + gc, \quad (7)$$

причем на третьей стадии расчетов величину g , определенную в работе [4], дополнительно уточняли.

Полученные в результате значения V_1^0/V_T и V_2^0/V_T составляют $0,703 \pm 0,02$ и $0,54 \pm 0,02$ соответственно. Константы димеризации, полученные этим методом, совпадают с приведенными выше результатами седиментации (таблица).

В системе, содержащей мицеллярный субстрат, отсутствует характерная для ассоциации зависимость \bar{V}/V_T и наблюдается слабая линейная зависимость с наклоном $g = 1,1 \cdot 10^{-2}$ мл/мг (рис. 2, 4), совпадающим с уточненным значением g , найденным при расчете констант димеризации. При

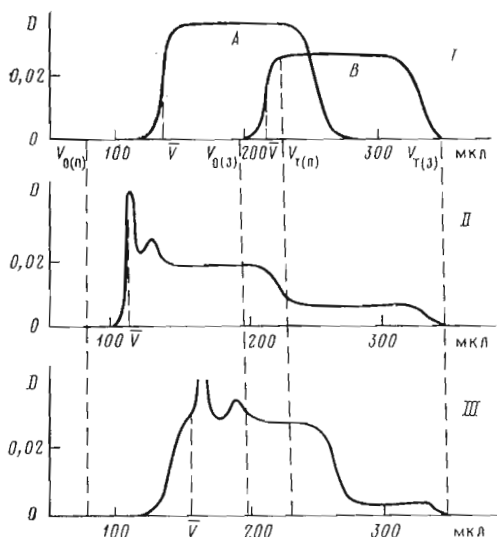


Рис. 3

Рис. 3. Фронтальные хроматограммы фосфолипазы A_2 (с 0,2 мг/мл) (IA, III); субстрата в области истинных растворов (IB) и в области мицеллярных концентраций (II). Для элюции IA и III использовали буферные растворы, содержащие мицеллярный субстрат и соответственно 20 мМ $BaCl_2$ или 20 мМ $CaCl_2$, детектирование проводили при 290 нм. Для IB и II использовали буферный раствор, содержащий 20 мМ $BaCl_2$, детектирование проводили при 230 нм. $V_{0(n)}$, $V_{0(z)}$, $V_{T(n)}$, $V_{T(z)}$ — объемы элюции переднего и заднего фронтов для невходящего (голубой декстран) и входящего в поры геля вещества (триптофан) соответственно; \bar{V} — центр тяжести переднего фронта хроматограмм

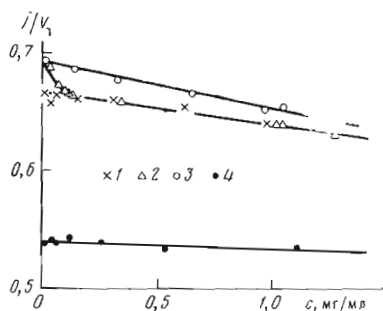


Рис. 4

Рис. 4. Экспериментальная концентрационная зависимость приведенного объема элюции изофермента E-2 фосфолипазы A_2 в системе без добавок $BaCl_2$ и субстрата (1), в присутствии $BaCl_2$ и субстрата в форме истинного раствора (2), в присутствии $BaCl_2$ (3), в присутствии $BaCl_2$ и мицеллярного субстрата (4)

этом $\lim_{c \rightarrow 0} [\bar{V}/V_T] = 0,54$, т. е. соответствует приведенному объему элюции димера. Отсюда следуют два важных вывода. Во-первых, в присутствии мицеллярного субстрата равновесие ассоциации вплоть до концентрации $c = 0,15$ мг/мл полностью сдвинуто в сторону димера. Во-вторых, в системе, содержащей $BaCl_2$ и мицеллярный субстрат, отсутствует комплекс димера с мицеллой E_2S_n , так как в интервале концентраций фермента 0,15–1,5 мг/мл белок элюируется в объеме, соответствующем димеру (E_2).

Широкая зона мицелл дигексаноиллецитина элюируется в буферном растворе с добавкой $BaCl_2$, образуя сложную полимодальную хроматограмму (рис. 3, II). Искажения переднего фронта, по-видимому, связаны с медленным распадом мицеллы различного размера, а плато на заднем фронте соответствует равновесной концентрации мономерного субстрата. Приведенный объем элюции для мицелл, определенный по центру тяжести переднего фронта, $\bar{V}_M/V_T = 0,52$, т. е. мицеллы имеют средний размер, близкий к размеру димерной фосфолипазы A_2 , имеющей радиус 21 Å [1]. Поэтому присутствие комплекса E_2S_n приводило бы к значительному уменьшению \bar{V}/V_T по сравнению с величиной $V_2^0/V_T = 0,54$. С другой стороны, фосфолипаза в элюенте, содержащем $BaCl_2$ и мицеллярный субстрат, дает унимодальную хроматограмму, что, согласно теории Гильберта [8, 9], не может иметь места, если число компонентов $n > 2$, даже в случае мгновенного установления равновесия.

При элюции фосфолипазы A_2 в системе с промотором $CaCl_2$ и мицеллярным субстратом (рис. 3, III) во время хроматографии осуществляется гидролиз субстрата и регенерируется мономерный фермент, поэтому центр оид переднего фронта смещается в сторону $V_1^0/V_T = 0,703$. Продукты ферментативной реакции не обладают поглощением при 290 нм. Существенно, что

при регистрации поглощения при 290 нм, когда поглощение субстрата пренебрежимо мало, хроматограмма фосфолипазы A_2 в присутствии Ca^{2+} (III) по форме воспроизводит кривую элюирования мицеллярного субстрата (II), между тем как в присутствии Ba^{2+} она сходна с обычной кривой (IA).

О наличии только одного компонента (димера фосфолипазы A_2) в системе с $BaCl_2$ и мицеллярным субстратом свидетельствует также постоянство коэффициента дисперсии заднего фронта $L_v = \sigma_v^2 / \bar{V}_v^2 = 1,56 \cdot 10^{-3} \pm 11\%$ в исследуемом интервале концентраций. В случае обратимой диссоциации димера и (или) комплексобразования с мицеллами зависимость $L_v(c)$ имела бы экстремум [4]. Таким образом, хроматографические данные (рис. 2, 3) позволяют утверждать, что мицеллярный субстрат сдвигает равновесие ассоциации фосфолипазы A_2 (изофермент Е-3) полностью в сторону димера, однако этот димер образует комплекс с мицеллами E_2S_n лишь в присутствии Ca^{2+} . Ионы Ba^{2+} препятствуют образованию комплекса. После завершения ферментативной реакции фермент возвращается в мономерное состояние.

Эти выводы справедливы и для изофермента Е-2 (рис. 4, 4). В присутствии мицелл при концентрации этого изофермента вплоть до 1 мг/мл также наблюдается постоянство безразмерного коэффициента дисперсии $\sigma_v^2 / \bar{V}_v^2 = 1,48 \cdot 10^{-3} \pm 10\%$, свидетельствующее об отсутствии в этих условиях фермент-субстратного взаимодействия.

Однако концентрационные зависимости (рис. 4) объема элюции изофермента Е-2 в растворе трис-НСl—KCl (I), трис-НСl— $BaCl_2$ (3) и трис-НСl— $BaCl_2$ —S ([S] 1 мг/мл) (2) отличаются от соответствующих кривых для изофермента Е-3. Кривые I, 3 не характерны для ассоциирующих систем. Об отсутствии обратимой ассоциации говорит также постоянство величины σ_v^2 / \bar{V}_v^2 , равной $1,3 \cdot 10^{-3} \pm 13\%$ в случаях I, 3. Форма кривой 2 может быть обусловлена ассоциацией белка, однако при $V_1^0 / V_T = 703$ и $V_2^0 / V_T = 0,54$ не удается подобрать константу димеризации, которая в исследованном диапазоне концентраций была бы постоянной. Характерно, что при $c=0$ в случае (I) значение V_1^0 / V_T составляет 0,67, т. е. приведенный объем мономера меньше найденного для изофермента Е-3 — $V_1^0 / V_T = 0,703$.

По-видимому, полученные экспериментальные данные интерпретируются следующим образом: в системах I—3 изофермент Е-2 либо не димеризуется, либо доля димеров очень мала. При этом в растворе трис-НСl—KCl молекула изофермента Е-2 несколько большего размера, чем молекула Е-3, для которой R 16,8 Å [4]. В системе трис-НСl— $BaCl_2$ Стоксовы радиусы молекул обоих изоферментов совпадают, а в присутствии истинных растворов субстрата (рис. 4, 2) в интервале концентраций изофермента Е-2 меньше 0,15 мг/мл обе его изомерные формы находятся в равновесии. Эта модель достаточно правдоподобна, хотя нельзя исключить слабую сорбцию изофермента Е-2 на декстрановом геле, емкость которого зависит от присутствия ионов Ba^{2+} и субстрата. Во всяком случае, в системах I—3 изофермент Е-2, несомненно, находится практически полностью в виде мономера.

Экспериментальная часть

Фосфолипаза A_2 (изоферменты Е-2 и Е-3) предоставлена А. И. Мирошниковым (Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва). Критерии ее чистоты описаны в работе [6].

В качестве субстрата использовали 1,2-дигексаноиллецитин, синтезированный и очищенный согласно [2].

Основной компонент буфера — трис-(оксиметил)аминометан (ч) Олайнского завода химреактивов — перекристаллизовывали из 70% этанола. Остальные компоненты буферных растворов квалификации ч.д.а. и ос.ч. применяли без дополнительной очистки.

Использовался микроколоночный хроматограф ХЖ-1305, оснащенный колонкой (25×0,1 см) с сефадексом G-75 (superfine). Описание прибора в режиме хроматографии приведено в работе [1]. Концентрацию белка определили спектрофотометрически исходя из молекулярной массы фосфолипазы A₂ (13 447) и коэффициента E_{1cm}^{0.1%} 1,71 (λ280). Для элюции использовали 0,01 М трис-НСI-буферный раствор, рН 7,5. В случае изучения самопроизвольной ассоциации изоферментов фосфолипазы A₂ методами равновесной седиментации и гель-проникающей хроматографии применяли буферный раствор с постоянной величиной ионной силы (μ0,1) на основе трис-НСI-КСI. Рабочие концентрации СаСI₂ и ВаСI₂ были постоянны (0,02 М). Влияние субстрата на ассоциацию изучали при его концентрациях 1 мг/мл (2,2 мМ) и 20 мг/мл (44 мМ).

Опыты по седиментационному равновесию осуществляли в указанных выше системах на ультрацентрифуге «Beckman», модель Е (США), в течение 1 сут при варьировании скорости вращения ротора в пределах 13 000–20 000 об/мин с использованием оптической системы сканирования. Все эксперименты проводили при +22° С. Расчет кажущейся средневесовой молекулярной массы описан в работе [1].

ЛИТЕРАТУРА

1. Мальцев В. Г., Зимина Т. М., Куренбин О. И., Беленький В. Г., Александров С. Л., Павлова Н. П., Дьяков В. Л., Антонов В. К. Биоорг. химия, 1979, т. 5, № 11, с. 1710–1719.
2. Желковский А. М., Дьяков В. Л., Гинодман Л. М., Антонов В. К. Биоорг. химия, 1978, т. 4, № 12, с. 1665–1672.
3. Roberts M. F., Deems R. A., Mincey T. C., Dennis E. A. J. Biol. Chem., 1977, v. 252, № 7, p. 2405–2411.
4. Allgyer Th. T., Wells M. A. Biochemistry, 1979, v. 18, № 20, p. 4354–4361.
5. Adams E. T., Williams J. W. J. Amer. Chem. Soc., 1964, v. 86, № 17, p. 3454–3461.
6. Ансалон У. Р., Шамборант О. Г., Мирошников А. И. Биоорг. химия, 1977, т. 3, № 11, с. 1553–1559.
7. Куренбин О. И., Виленчик Л. З., Готлиб Ю. Я., Беленький В. Г. Биофизика, 1979, т. 24, вып. 2, с. 222–226.
8. Gilbert G. A. Proc. Roy. Soc., 1959, v. A250, № 1262, p. 377–388.
9. Gilbert G. A. Faraday Discuss. Chem. Soc., 1955, № 20, p. 68–75.

Поступила в редакцию
29.VI.1981

MICROCHROMATOGRAPHIC STUDIES ON ASSOCIATION OF PHOSPHOLIPASE A₂ FROM THE VENOM OF CENTRAL ASIAN COBRA (*NAJA NAJA OXIANA*) IN THE PRESENCE OF SUBSTRATES IN MONOMERIC AND MICELLAR FORMS

MAL'TSEV V. G., ZIMINA T. M., BELENKY B. G., KURENBIN O. I.,
PAVLOVA N. P., DYAKOV V. L., ANTONOV V. K.

Institute of High Molecular Weight Compounds, Academy of Sciences of the USSR, Leningrad; M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The influence of the substrate, dihexanoyllecithin, on the dimerization equilibrium of two phospholipase A₂ isoenzyme (E-2 and E-3) has been studied by the method of frontal gel-chromatography and sedimentational equilibrium. Both micellar and water-soluble forms of the substrate were investigated in the presence of the activator (Ca²⁺) or inhibitor (Ba²⁺) of enzymic catalysis. Ba²⁺ ions lower somewhat the degree dimerization of the E-3 isoenzyme, whereas the substrate at low concentration (water-soluble form) does not influence the dimerization. The same was found for E-2 isoenzyme which in these conditions exists only in monomeric state. The micellar substrates induce complete dimerization of both isoenzymes. It was shown that Ca²⁺ ions promote while Ba²⁺ ions prevent the formation of the dimeric enzyme-substrate complex. The results demonstrated that the activation or inhibition of lipolysis by Ca²⁺ and Ba²⁺ ions, respectively, are due to influence of these ions at the stage of interaction of the active dimer with the micelles of the substrate.