



УДК 577.153.211.02

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ КИНЕТИЧЕСКИХ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ИЗОФЕРМЕНТОВ Е2 И Е3 ФОСФОЛИПАЗЫ А₂ ИЗ ЯДА КОБРЫ *NAJA NAJA OXIANA*

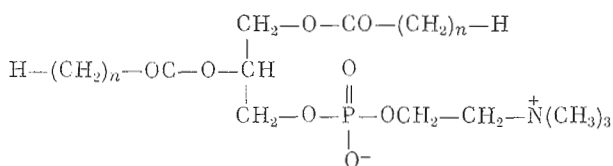
Антонов В.К., Дьяков В.Л., Зильберман М.И.,
Кондрашин С.К., Павлова Н.П.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Исследован гидролиз короткоцепочечных 1,2-диацил-*sn*-глицеро-3-фосфохолинов, катализируемый изоферментами Е2 и Е3 фосфолипазы А₂ из яда кобры *Naja naja oxiana*. Установлено, что в случае изофермента Е3 увеличение длины алкильной цепи приводит к уменьшению значений K_m гидролиза субстратов, тогда как $k_{кат}$ остается постоянной и близкой к константе скорости диссоциации димера фермента. Показано, что реакция идет по упорядоченному механизму: сначала связывается кофактор (Ca^{2+}), а затем субстрат. Активация изофермента Е2 мицеллами субстрата обусловлена, по-видимому, снижением энтальпии активации гидролиза, тогда как в случае изофермента Е3 активация носит энтропийный характер. Активация фермента на границе раздела фаз липид — вода моделирована добавлением в систему детергента — цетилтриметиламмонийбромида (СТАВ). При этом для изофермента Е2 наблюдается увеличение скорости гидролиза субстратов, тогда как в случае изофермента Е3 СТАВ практически не влияет на катализ. Активация обусловлена увеличением каталитической константы ($k_{кат}$). Мицеллы субстрата и детергента вызывают изменение флуоресценции остатков триптофана у обоих изоферментов. Различное кинетическое и сходное физико-химическое поведение изоферментов Е2 и Е3 объяснено на основе модели активного димера фосфолипазы А₂ различием в их скоростьлимитирующих стадиях.

Фосфолипаза А₂ (КФ 3.1.1.4), как и другие липолизические ферменты, характеризуется значительной активацией на поверхности раздела фаз липид — вода [1]. Изучение механизма этого явления осложняется неоднозначностью кинетических характеристик ферментативного гидролиза в гетерогенной системе, а также ограничением применимости спектральных методов для анализа изменений, происходящих в белке в этих условиях. Обойти эти трудности до известной степени можно, во-первых, применяя синтетические короткоцепочечные лецитины, образующие оптически прозрачные мицеллярные системы при концентрациях выше критической концентрации мицеллообразования (ККМ), и, во-вторых, используя бинарные системы «детергент — субстрат» при концентрациях последнего существенно ниже ККМ, при этом моделирование мицеллярной фазы осуществляется детергентом.

В настоящей работе проведено кинетическое и физико-химическое исследование гидролиза синтетических субстратов (I) — (III):



(I) $n = 2$, (II) $n = 3$, (III) $n = 5$

катализируемого двумя изоферментами фосфолипазы А₂ (Е2 и Е3) из яда среднеазнатской кобры *Naja naja oxiana*.

Изоферменты фосфолипазы А₂ [2] имеют близкий аминокислотный состав; изоэлектрические точки для Е2 и Е3 составляют соответственно 5,5 и 5,1, что говорит о большом содержании основных аминокислот у

изофермента Е2 по сравнению с Е3. Оба изофермента гидролизуют короткоцепочечные фосфатидилхолины в области истинных растворов с измеримыми скоростями, а при концентрациях субстрата, отвечающих мицеллярной области, и тот и другой изоферменты значительно активируются. Можно видеть (рис. 1), что для обоих изоферментов точки перехода на кривой зависимости скорости гидролиза субстрата (III) от его концентрации одинаковы и совпадают с ККМ субстрата, равной 9,8 мМ [3].

В работе [4] были получены константы скорости второго порядка ($k_{кат}/K_m$) для гидролиза субстратов (I) и (II) изоферментом Е3. Получить

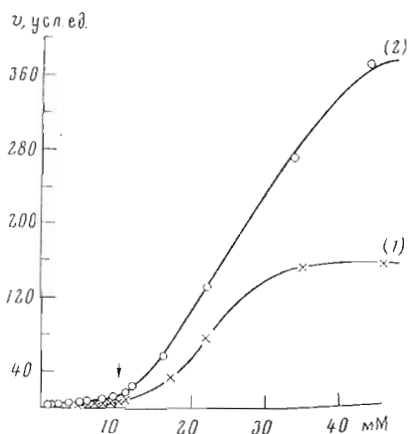


Рис. 1. Зависимость начальных скоростей гидролиза субстрата (III) изоферментами Е2 (1) и Е3 (2) от его концентрации. Условия: рН 7,5, $[Ca^{2+}]$ 22 мМ, $[E]$ 1 мкМ, 37° С

раздельно кинетические константы $k_{кат}$ и K_m оказалось довольно сложно, так как величина K_m для гидролиза этих субстратов лежит в области их концентраций, близких к ККМ. Поэтому в настоящей работе нами был исследован гидролиз в сильно разбавленных водных растворах ($[S] \leq 0,2$ ККМ) (табл. 1). Из начальных скоростей ферментативного гидролиза при фиксированных насыщающих концентрациях ионов кальция (22 мМ) определены индивидуальные кинетические константы $k_{кат}$ и K_m (см. табл. 1). Несмотря на большие ошибки в определении индивидуальных констант, обусловленные выбранным диапазоном концентраций субстратов, полученные данные представляют несомненный интерес. Как видно, при сохранении практически одинакового значения для $k_{кат}$ при переходе от субстрата (I) к субстрату (III) K_m в случае изофермента Е3 меняется более чем на два порядка. Таким образом, увеличение скорости гидролиза в ряду гомологов субстрата обусловлено изменением скорости свободной энергии образования комплекса Михаэлиса, т. е. ранее полученная зависимость $k_{кат}/K_m$ для серии гомологов субстратов [4] является отражением зависимости K_m от числа метиленовых звеньев ацильных цепей субстрата.

Необходимо отметить достаточно близкие значения величин K_m и $k_{кат}$ для гидролиза субстрата (II), катализируемого изоферментами Е2 и Е3: изофермент Е2 лишь несколько хуже связывает субстрат, чем Е3.

Интересно сравнить имеющиеся кинетические константы гидролиза водорастворимых субстратов с полученными нами ранее кинетическими константами динамического мономер-димерного равновесия изофермента Е3 [5]. Согласно данным работы [5], константа скорости диссоциации димера на отдельные субъединицы имеет величину от 0,2 до 0,7 с⁻¹ в зависимости от присутствия в системе ионов кальция. Сравнивая эти величины с константами первого порядка скоростей гидролиза короткоцепочечных субстратов, полученными в настоящей работе (табл. 1), и учитывая некоторые различия в экспериментальных условиях (буфер, присутствие или отсутствие в системе субстрата, разные образцы фосфолипазы А₂), можно констатировать их удовлетворительное совпадение.

На примере короткоцепочечного субстрата (II) нами проведен детальный кинетический анализ ферментативного гидролиза в условиях варьирования концентрации субстрата и ионов кальция, дающий возможность оценить упорядоченность присоединения реагентов ферментативной системы (рис. 2). Характер полученных зависимостей свидетельствует об упорядоченном механизме присоединения реагентов [6, 7]. На первой стадии происходит связывание фермента с Ca²⁺ с константой связывания $K_{Ca^{2+}}$ 0,5 мМ, а затем взаимодействие комплекса E—Ca²⁺ с лецитином с константой сродства $K_{s(II)}$ 53 мМ.

Интересно также было сравнить активационные параметры гидролиза

Кинетические параметры гидролиза синтетических водорастворимых лецитинов, катализируемого изоферментами E2 и E3 фосфолипазы A₂ рН 8,5, [Ca²⁺] 22 мМ, 25° С

Субстрат	ККМ *, м	Изофермент	[S], мМ	[E], мкМ	K _m , мМ	k _{кат} , с ⁻¹
1,2-Дипропионил- <i>sn</i> -глицеро-3-фосфохолин (I)	0,1	E3	4-20	3-15	420±20	~0,85
1,2-Дибутироил- <i>sn</i> -глицеро-3-фосфохолин (II)	0,075	E3 E2	1,2-12,5 1,2-12,5	1,5-15 3-15	53±1 90±2	1,2±0,6 1,1±0,6
1,2-Дигексаноил- <i>sn</i> -глицеро-3-фосфохолин (III)	0,01	E3	0,3-1,5	0,25-1	2±0,1	3±0,3

* ККМ вычислены из кинетических кривых ферментативного гидролиза.

Таблица 2

Значения энтальпий активации гидролиза субстрата (III) фосфолипазой A₂

Изофермент	[S]	ΔH [‡] , ккал/моль	Изофермент	[S]	ΔH [‡] , ккал/моль
E2	<ККМ	7,3	E3	<ККМ	4,1
E2	>ККМ	4,5	E3	>ККМ	4,3

в водорастворимой и мицеллярных областях для обоих изоферментов (рис. 3). В связи с большими трудностями в определении индивидуальных кинетических констант мы ограничились измерением скоростей гидролиза при фиксированных концентрациях субстрата. Полученная информация носит только качественный характер, однако может оказаться полезной при сравнительном изучении обоих изоферментов. Из представленных графиков были вычислены энтальпии активации для процесса гидролиза субстрата в водорастворимой и мицеллярных областях (табл. 2). Как следует из представленных данных, при переходе из области истинных растворов в область мицеллярных концентраций энтальпия активации ферментативного гидролиза для изофермента E2 снижается на 2,8 ккал, в то время как для изофермента E3 она остается практически постоянной, и, следовательно, увеличение липолитической активности на границе раздела фаз обусловлена, по всей видимости, изменением только энтропии активации.

Таким образом, в случае изофермента E3 процесс активации в мицеллярных системах обусловлен, вероятно, «замораживанием» в агрегате наиболее благоприятных для атаки ферментом конформаций субстрата [3], в то время как в случае изофермента E2 наряду с этим фактом следует учитывать конформационную перестройку в молекуле самого фермента, приводящую к более активному в процессе катализа конформеру.

Следующим этапом работы было исследование процесса активации фосфолипазы A₂ на искусственных поверхностях раздела фаз, имитируемых с помощью детергента при использовании концентраций субстрата, не превышающих ККМ. Из испытанных нами детергентов (хлорид бензилдиметилгексадециламмония, стеарат полиэтиленгликоля, тритон X-100 и бромид дecilтриметиламмония (СТАВ)) наиболее перспективным в плане исследования кинетики процесса активации с параллельным использованием спектральных методов для характеристики конформационных изменений белка оказался СТАВ. При изучении влияния СТАВ на скорость гидролиза дигексаноиллецитина (III), катализируемого изоферментами E2 и E3 фосфолипазы A₂, оказалось, что только изофермент E2 активируется детергентом (рис. 4), причем точка перегиба на кривой активации совпадает с критической концентрацией мицеллообразования СТАВ 0,35 мМ [8].

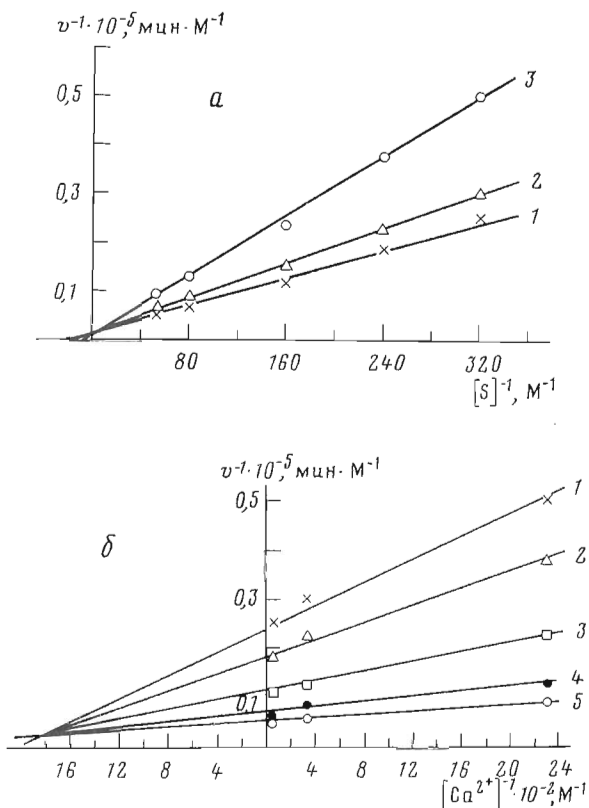


Рис. 2. Зависимость начальных скоростей гидролиза субстрата (II), катализируемого изоферментом E3: а - от концентрации субстрата при $[\text{Ca}^{2+}]$ 22 (1), 3,3 (2), 0,44 мМ (3); б - от концентрации Ca^{2+} при $[S]$ 3,1 (1), 4,2 (2), 6,2 (3), 12,5 (4), 18,8 мМ (5). Условия: pH 8,5, $[E]$ 15 мкМ, 25° С

То же самое наблюдается и при гидролизе субстратов (I) и (II). При исследовании влияния СТАВ на неспецифический катализ фосфолипазой A_2 гидролиза 2,4-динитрофенилбутирата (в основном каталитическое действие имидазольного остатка гистидина) существенного различия в поведении изоферментов E2 и E3 обнаружено не было (рис. 5), причем характер зависимости увеличения скорости гидролиза в присутствии СТАВ для обоих изоферментов одинаков.

Из результатов эксперимента следует, что активация фосфолипазы A_2 (E2) СТАВ обусловлена влиянием детергента на скорость превращения фермент-субстратного комплекса в продукты реакции ($k_{\text{кат}}$), тогда как значение кажущейся константы диссоциации комплекса не меняется. Так, для субстрата (II) в присутствии 2,4 мМ СТАВ и 22 мМ Ca^{2+} значение $k_{\text{кат}}$ равно $10,7 \text{ с}^{-1}$, а K_m — 90 мМ (ср. данные табл. 1).

Из наклона прямых температурной зависимости скорости гидролиза субстрата (II) под действием изофермента E2 в отсутствие и в присутствии 2,4 мМ СТАВ (рис. 6) могут быть вычислены энтальпии активации гидролиза этого субстрата в истинном растворе и при наличии искусственной границы раздела фаз. Эти величины составляют соответственно 9,1 и 6,9 ккал/моль. Сопоставление вычисленных значений энтальпий активации с наблюдаемым из опыта ускорением гидролиза в присутствии СТАВ (рис. 4) позволяет заключить, что при переходе от истинных растворов к модельным гетерогенным системам энтрония активации как фактор упорядоченности системы уменьшается.

Полученные данные по кинетике гидролиза интересно было сопоставить с некоторыми характеристиками физико-химического состояния белковой молекулы. Использование оптически прозрачных мицеллярных растворов делает возможным, как уже отмечалось выше, применение спект-

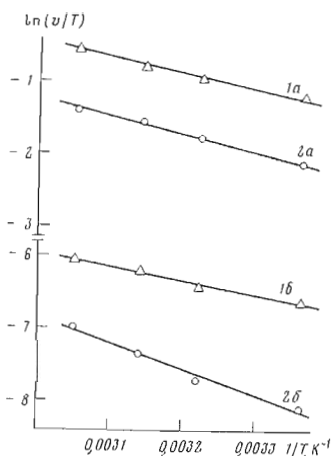


Рис. 3

Рис. 3. Температурная зависимость скорости гидролиза субстрата (III) под действием изоферментов E3 (1) и E2 (2) в мицеллярной (а, [S] 35 мМ) и водорастворимой области (б, [S] 4,5 мМ). Условия: pH 7,5, [Ca²⁺] 22 мМ, [E] 0,35 мкМ

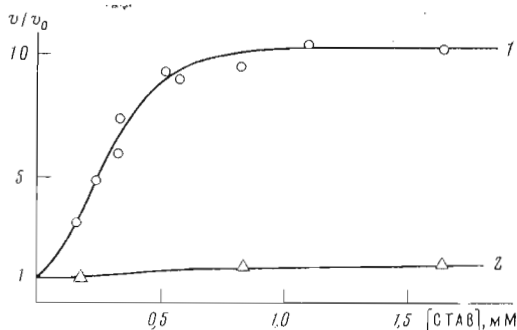


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость кинетики гидролиза субстрата (III) от концентрации СТАВ для изоферментов E2 (1) и E3 (2). v_0 – скорость в отсутствие СТАВ. Условия: pH 7,5 [Ca²⁺] 22 мМ, [E] 0,35 мкМ, [S] 2,2 мМ

ральных методов в изучении таких систем. Титрование раствора фосфолипазы A₂ лизолецитином ($KCM=2 \cdot 10^{-5} - 2 \cdot 10^{-4}$ М [9]) приводит к значительному увеличению интенсивности триптофановой флуоресценции ($\lambda_{возб}$ 295 нм) с одновременным смещением максимума интенсивности флуоресценции на 10 нм в коротковолновую область (рис. 7), что свидетельствует о более гидрофобном окружении остатков триптофана в комплексе фосфолипазы с мицеллами лизолецитина. Качественно такую же картину ранее наблюдали для панкреатической фосфолипазы A₂ в присутствии синтетических аналогов субстрата [10].

Аналогичное исследование нами было проведено с использованием субстрата (III), причем во избежание его ферментативного гидролиза в процессе титрования в систему вводили ионы бария (рис. 8). Добавление субстрата (III) (при [S] > KCM) к изоферменту E3, так же как и в случае с лизолецитином, наряду со смещением максимума интенсивности флуоресценции на 10 нм в коротковолновую область вызывает значительное увеличение интенсивности флуоресценции. Совершенно идентичная картина наблюдается в случае другого изофермента – E2. Экспериментальная кривая спектрофлуориметрического титрования фермента субстратом (рис. 8б) имеет два гиперболических участка: в области низких концентраций субстрата (< KCM) и в области мицеллообразования. Следует обратить внимание на достаточно четкую корреляцию увеличения интенсивности флуоресценции триптофана на втором участке кривой с процессом активации липолитической активности при переходе к мицеллярным концентрациям субстрата (ср. с рис. 1).

Исходя из полученных данных, нельзя отрицать возможность конформационных перестроек в молекуле белка, возникающих при взаимодействии его с мицеллярной фазой и приводящих к активации процесса ферментативного гидролиза. Увеличение интенсивности флуоресценции на первой ветви кривой флуориметрического титрования обусловлено, возможно, взаимодействием фосфатной группы субстрата с анионным центром фермента, роль которого выполняет, вероятно, остаток аргинина [11, 12].

Аналогичное изменение флуоресценции изофермента E2 наблюдается также, если вместо субстрата в системе присутствует детергент (рис. 9). Такие же изменения характерны для спектра изофермента E3 в этих условиях. Спектральные изменения происходят в области мицеллярных кон-

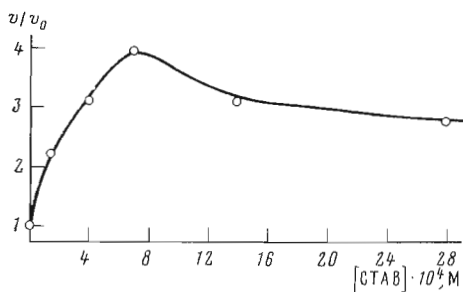


Рис. 5

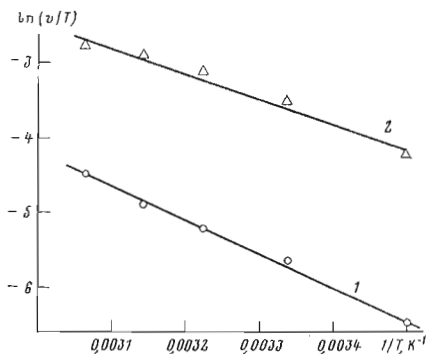


Рис. 6

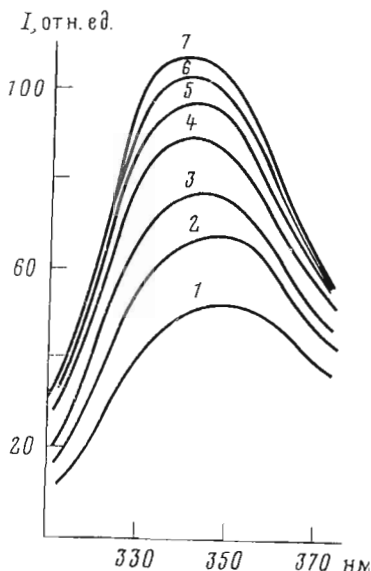


Рис. 7

Рис. 5. Изменение скорости неспецифического гидролиза 2,4-динитрофенилбутирата (0,83 мМ) от концентрации СТАВ для фосфолипазы A_2 (Е2 или Е3). v_0 — скорость в отсутствие СТАВ. Условия: 0,1 М трис-НСl-буфер, рН 7,5, [Е] 2,2 мкМ, 25° С

Рис. 6. Температурная зависимость скорости гидролиза субстрата (II) под действием изофермента Е2 в отсутствие (1) и в присутствии 2,4 мМ СТАВ (2). Условия: рН 7,5, $[Ca^{2+}]$ 22 мМ, [Е] 3,5 мкМ, [S] 25 мМ

Рис. 7. Спектр флуоресценции фосфолипазы A_2 (Е2 или Е3) при концентрации лизолецитина, мМ: 0 (1), 0,03 (2), 0,06 (3), 0,086 (4), 0,11 (5), 0,14 (6), 0,18 (7). Условия: 0,1 М трис-НСl-буфер, рН 7,5; 25° С

центраций СТАВ, причем график титрования фермента СТАВ представляет собой сигмоидную кривую с насыщением (рис. 9б, в). Характер кривых титрования для обоих изоферментов практически никак не зависит от их концентрации. Наблюдаемые спектральные изменения коррелируют с кинетикой активации гидролиза субстрата (III) от концентрации СТАВ под действием изофермента Е2 (рис. 4).

Таким образом, при взаимодействии фосфолипазы A_2 (изоферменты Е2 и Е3) с мицеллярной фазой в молекуле белка происходят локальные перестройки, затрагивающие, по всей видимости, область активного центра — имидазольный остаток гистидина, а также остатки триптофана, важная роль которых в катализе неоднократно обсуждалась [10, 13, 14].

Для объяснения различного кинетического поведения двух исследованных изоферментов фосфолипазы A_2 (Е2 и Е3) на границе раздела фаз, создаваемой бичарными системами, можно воспользоваться предложенной ранее гипотетической моделью образования и распада фермент-субстратного комплекса фосфолипазы A_2 [15]. Согласно этой модели, гидролиз фосфолипидов протекает по схеме, представленной на рис. 10. В соответствии с этой схемой различное кинетическое поведение изоферментов обусловлено тем, что для них скоростьлимитирующими являются разные стадии процесса гидролиза водорастворимых субстратов. В случае изофермента Е3 скорость всего процесса определяется стадией с константой k_4 , т. е. скоростью диссоциации димерной формы фосфолипазы A_2 , тогда как для другого изофермента (Е2) скорость всего процесса, по-видимому, ли-

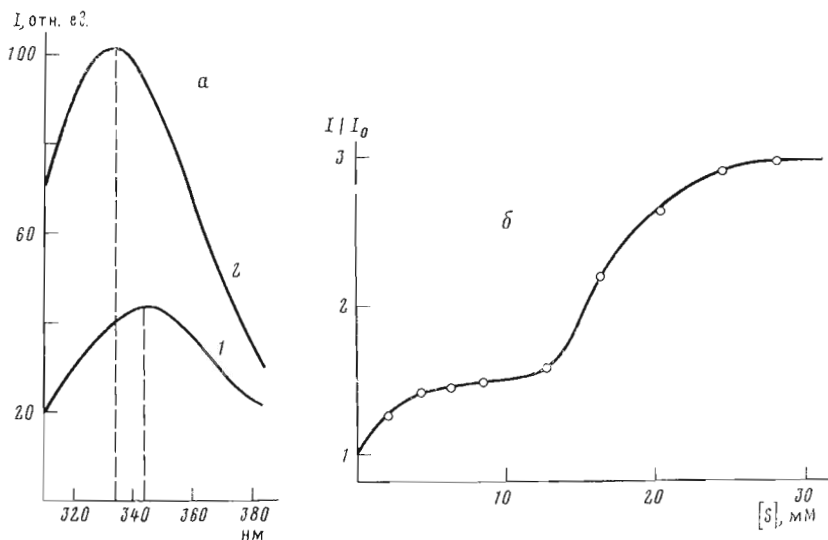


Рис. 8

Рис. 8. Влияние субстрата (III) на триптофановую флуоресценцию фосфолипазы A_2 (изофермент E3): *a* – спектр флуоресценции в отсутствие (1) и в присутствии 25 мМ субстрата (2); *b* – зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации субстрата. Условия: 0,1 М трис-HCl-буфер, pH 7,5, $[Ca^{2+}]$ 25 мМ, $[E]$ 1,85 мкМ, 25° С

Рис. 9. Влияние СТАВ на флуоресценцию остатков триптофана фосфолипазы A_2 : *a* – спектр флуоресценции изофермента E2 при концентрации СТАВ, мМ: 0 (1), 0,15 (2), 0,3 (3), 0,45 (4), 0,6 (5), 0,73 (6); *b* – зависимость относительной флуоресценции от концентрации СТАВ для изоферментов E2 (*b*) и E3 (*в*). Условия: 0,1 М трис-HCl-буфер, pH 7,5, $[E]$ 1,75 мкМ 25° С

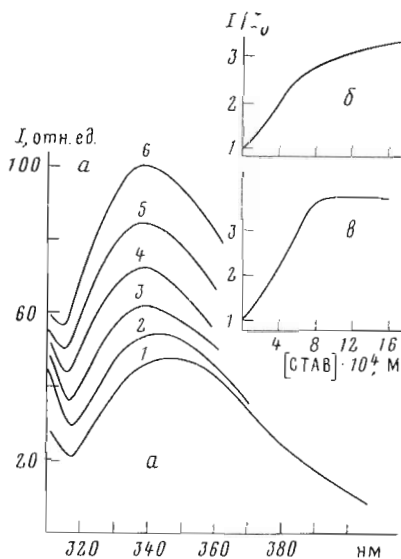


Рис. 9

митируется стадией химического разрыва связи во втором положении субстрата (например, стадией с константой k_3). При взаимодействии обоих изоферментов с мицеллами детергента (СТАВ) происходят локальные конформационные перестройки, способствующие ускорению химического процесса, однако, если для изофермента E2 это сказывается на скорости всего процесса, то в случае изофермента E3 этого не наблюдается, так как скоростьлимитирующей стадией всего процесса является не химическая стадия. Этому предположению не противоречат данные, полученные с помощью эксклюзионной хроматографии [16], а именно: средневесовой объем элюции изофермента E2 во всей исследованной области концентраций фермента соответствует мономеру, тогда как для изофермента E3 прослеживается четкая концентрационная зависимость средневесового объема элюции, на основании которой была вычислена константа ассоциации $K_{асс}^{E3}$ равная $6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$. Из этих данных можно сделать вывод, что $K_{асс}^{E2} \ll K_{асс}^{E3}$.

Для схемы $E + E \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} E_2$ константа ассоциации $K_{асс} = k_1/k_{-1}$, откуда воз-

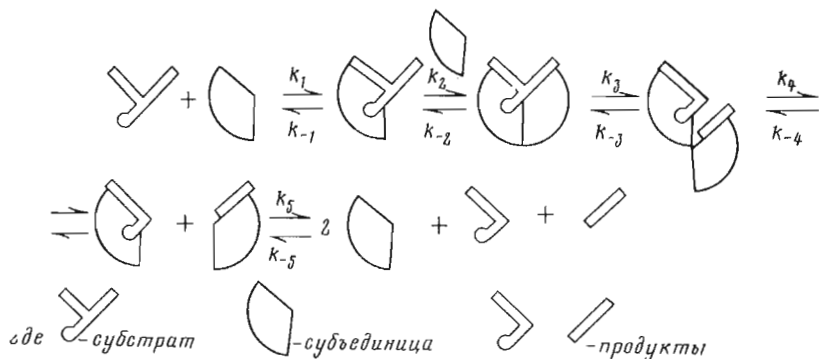


Рис. 10. Гипотетическая схема гидролиза фосфолипидов фосфолипазой A_2

может такой случай, когда $k_{-1}^{E2} \gg k_{-1}^{E3}$. Таким образом, стадия с k_1 , на представленной схеме соответствующая k_{-1} , для изофермента $E2$ может оказаться значительно более быстрой, чем аналогичная стадия у $E3$, и не будет лимитировать скорость всего гидролиза.

Экспериментальная часть

Изоферменты $E2$ и $E3$ фосфолипазы A_2 предоставлены А. И. Мирошниковым (Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва). Методика их выделения, а также некоторые физико-химические параметры приведены в работе [2].

В качестве субстратов была использована синтетическая гомологическая серия одноокислотных лецитинов (1,2-диацил-*sn*-глицеро-3-фосфолипидов) природной *L*-конфигурации, полученных и очищенных в соответствии с работами [17, 18].

Исходную концентрацию белков определяли на основе их молекулярного коэффициента поглощения ϵ_{280} $23\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ на спектрофотометре «Gilford 2400-2» (США). CaCl_2 и BaCl_2 применяли квалификации ос.ч. Все остальные компоненты буферных растворов были марки ч.д.а. Трис-(оксиметил)аминометан (трис) — Олайнского завода химреактивов — перекристаллизовывали из 70% этанола.

Кинетические измерения начальных скоростей ферментативного гидролиза модельных водорастворимых субстратов (I)–(III) осуществляли методом потенциометрического титрования в режиме рН-статирования (рН-стат ТТТ-60, Radiometer, Дания), используя автоматическую бюретку АБУ-13 объемом 0,25 мл. Ферментативную реакцию проводили в стеклянных термостатированных кюветах объемом 1–20 мл, снабженных магнитной мешалкой, при рН 7,5 и насыщающей концентрации Ca^{2+} 22 мМ при 25°С. Исходную концентрацию субстрата определяли по навеске. В термостатированную кювету вносили сначала растворы Ca^{2+} и субстрата, доводили рН до нужного значения, фиксировали спонтанный гидролиз субстрата (10 мн), затем добавляли раствор фермента.

Флуориметрическое титрование изоферментов $E2$ и $E3$ синтетическим субстратом (III) проводили в 0,1 М трис-НСl-буфере, рН 7,5, при 25°С в присутствии Ba^{2+} (25 мМ). Верхний предел концентрации субстрата (III) составил 0,03 М. В случае титрования изоферментов детергентом (СТАВ) использовали тот же буфер и титрование проводили до насыщающей концентрации 1,5–2,4 мМ.

Спектры флуоресценции были получены на флуориметрах «Aminko SPF-1000CS» (США) и «Hitachi MPF-3» (Япония) в области длин волн, характерных для поглощения триптофановых остатков белка (310–450 нм) при $\lambda_{возб}$ 295 нм. Ширина щелей возбуждения и эмиссии 6 нм. Контрольная кювета содержала все те же компоненты, что и рабочая, за исключением фермента.

1. Брокерхоф Х., Дженсен Р. Липолизические ферменты. М.: Мир, 1978, с. 66-69.
2. Ансалои У. Р., Шамборант О. Г., Мирошников А. И. Биоорган. химия, 1977, т. 3, № 11, с. 1553-1559.
3. Wells M. A. Biochemistry, 1974, v. 13, № 11, p. 2248-2257.
4. Желковский А. М., Дьяков В. Л., Антонов В. К. Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 3, с. 404-409.
5. Мальцев В. Г., Зимица Т. М., Куренбин О. И., Беленький Б. Г., Александров С. Л., Павлова Н. П., Дьяков В. Л., Антонов В. К. Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 11, с. 1710-1719.
6. Wells M. A. Biochemistry, 1972, v. 11, № 6, p. 1030-1036.
7. Kleland W. W. In: The Enzymes. N. Y.: Acad. Press, 1970, v. 2, p. 1-10.
8. Яцимирский А. К., Маргулик К., Березин Н. В. Докл. АН СССР, 1970, т. 194, № 4, с. 840-842.
9. Saunders L. Biochim. et biophys. acta, 1966, v. 125, № 1, p. 70-74.
10. Van Dam-Mieras M. C. E., Slotboom A. J., Pieterse W. A., de Haas G. H. Biochemistry, 1975, v. 14, № 25, p. 5387-5394.
11. Ансалои У. Р., Мирошников А. И. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 5, с. 773-779.
12. Vensel L. A., Kantrowitz E. R. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, № 15, p. 7306-7310.
13. Wells M. A. Biochemistry, 1973, v. 12, № 6, p. 1086-1093.
14. Roberts M. F., Deems R. A., Mincey T. C., Dennis E. A. J. Biol. Chem., 1977, v. 252, № 7, p. 2405-2411.
15. Желковский А. М., Дьяков В. Л., Гинодман Л. М., Антонов В. К. Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 12, с. 1665-1672.
16. Мальцев В. Г., Зимица Т. М., Беленький Б. Г., Куренбин О. И., Павлова Н. П., Дьяков В. Л., Антонов В. К. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 1, с. 96-101.
17. Robles E. C., van Den Berg D. Biochim. et biophys. acta, 1969, v. 187, № 7, p. 520-526.
18. Gordon D. T., Jensen R. G. Lipids, 1972, v. 7, № 4, p. 261-262.

Поступила в редакцию
19.X.1981

**A COMPARATIVE STUDY OF KINETIC AND PHYSICO-CHEMICAL
PROPERTIES OF THE PHOSPHOLIPASE A₂ ISOENZYMES E2 AND E3
FROM THE COBRA (*NAJA NAJA OXIANA*) VENOM**

ANTONOV V. K., DYAKOV V. L., ZILBERMAN M. I., KONDRASHIN S. K., PAVLOVA N. P.

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

The hydrolysis of the short-chain 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-phosphocholines by phospholipase A₂ isoenzymes from the venom of cobra *Naja naja oxiana* has been studied. In the case of E3 isoenzyme the elongation of the substrate acyl chain causes a drop in K_m , whereas k_{cat} remains constant and equal to the dissociation rate constant of the enzyme dimer. The reaction follows an ordered pathway: cofactor (Ca²⁺) is attached first, followed by substrate binding. Activation of E3 isoenzyme by the substrate micelles seems to be entropy driven, and E2 isoenzyme activation is apparently due to lower enthalpy of the hydrolysis. Activation of the enzyme at the lipid-water interface was studied in model experiments by adding a detergent, cetyltrimethylammonium bromide. The detergent increases the rate of isoenzyme E2 catalyzed hydrolysis of substrates, raising k_{cat} , but do not influence the rate of catalysis by E3 isoenzyme. The substrate and detergent micelles change the tryptophan fluorescence parameters of both isoenzymes. A different kinetic and similar physico-chemical behaviour of E2 and E3 isoenzymes is rationalized in terms of the model of active phospholipase dimer and differences in their rate-limiting steps.