



УДК 577.153.2.02+547.962.02/04

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
ФОСФОЛИПАЗЫ A_2 . ИЗУЧЕНИЕ КОНФОРМАЦИОННЫХ
ПЕРЕХОДОВ ФОСФОЛИПАЗЫ A_2 ИЗ ЯДА ПЧЕЛЫ
В ЗАВИСИМОСТИ ОТ pH И ТЕМПЕРАТУРЫ

Грицук В. И., Мещерякова Е. А., Оханов В. В.,
Ефремов Е. С., Мирошников А. И.

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

Аффинной хроматографией на конканавалин-сефарозе 4В из яда медоносной пчелы выделена в индивидуальном состоянии фосфолипаза A_2 . Методами КД, разностной УФ-спектроскопии, спектроскопией ЯМР и ЭПР исследованы конформационные состояния этого фермента. В кислой и щелочной областях pH обнаружены обратимые конформационные переходы с рК 2,8 и 11,3 соответственно. Поскольку конформационные изменения сопровождаются переходом к менее упорядоченной структуре молекулы фермента и потерей ферментативной активности, они являются денатурационными. Методом разностной УФ-спектроскопии изучена обратимая температурная денатурация, происходящая при температурах, больших 55°C . Получены значения свободной энергии ΔG , энтальпии ΔH и энтропии ΔS процесса денатурации. Обсуждается связь между конформационным состоянием фермента и его биологической активностью.

Интерес к всестороннему исследованию фосфолипаз A_2 из различных источников связан с тем, что, с одной стороны, эти ферменты являются ключевыми в процессе метаболизма фосфолипидов — неизменных компонентов биологических мембран, а с другой — фосфолипазная активность присуща наиболее мощным нейротоксинам (β -бунгаротоксину, нотексину, тайпоксину и кротоксину), специфически блокирующим выброс нейромедиаторов из пресинаптических нервных окончаний [1–8]. Широкое использование фосфолипаз в качестве инструментов при изучении молекулярной организации мембран, при выяснении тонких процессов секреции нейромедиаторов в передаче нервного возбуждения требует детального исследования структурно-функциональных особенностей этих белковых молекул.

На основании анализа известных структур фосфолипаз A_2 было предложено разделить эти ферменты на три группы, различающиеся расположением инвариантных аминокислотных остатков в полипептидной цепи, числом дисульфидных связей и биологической активностью [9]. К первой группе относятся панкреатические фосфолипазы и фосфолипазы из ядов змей семейства элапидов. Ко второй группе принадлежат ферменты, выделенные из ядов змей семейства кроталидов и виперидов; эти белки наиболее токсичны и, как правило, образуют комплексы с другими компонентами ядов. Третью группу, наименее изученную, составляют фосфолипазы

H-Ile-Ile-Tyr-Pro-Gly-Thr-Leu-Trp-Cys-Gly-His-Gly-Asn-Lys-Ser-Ser-Gly-Pro Asn Glu

α i i b B B i H i h B h b i h i i b B i H
 β H H h b i h I h b i h i b b I I i b b b

30

40

Leu Gly Arg Phe Lys His Thr Asp Ala Cys Cys Arg Thr His Asp Met Cys Pro-Asn-Val

α H B i I h h i I H h h i i h I H h B i i
 β I i I h b h h b i b b I h h b I b b b H

50

60

Met-Ser-Ala-Gly-Gln-Ser-Lys-His-Gly-Leu-Thr-Asp-Thr-Ala-Ser-Arg-Leu-Ser-Cys-Asn

α H i H B H i h h B H i I i H i i H i h i
 β I I i i i I b h i I h b h i I I I I b b

70

80

Asn-Asn-Asp-Phe-Tyr-Lys-Asn-Ser-Ala-Asp Thr Ile Ser Ser Tyr Phe Val Gly Lys Met

α i i I I b h i i H I i i i i b I i B h H
 β b b b h h b b I i b h H I I h h H i b I

90

100

Tyr Phe Asn Ile Ile Asn Thr Lys Cys Tyr Lys Leu Glu His Pro-Val-Thr-Gly-Cys-Gly

α b I i H i i i h h b h H H h B i i B h B
 β h h b I H b h b b h b I b h b H h i b i

110

120

Glu-Arg-Thr-Glu-Gly-Arg-Cys Leu His Tyr Thr Val Asp-Lys-Ser-Lys-Pro-Lys Val Tyr

α H i i H B i h H h B i i I h i h B h i B
 β b I h b i I b I h h h H b b I b b b H h

Gln Trp Phe Asp-Leu-Arg-Lys-Tyr-OH

α i i I I H i h B
 β i h h b I I b h

Рис. 1. Аминокислотная последовательность фосфолипазы A_2 из яда пчелы [11]. Предсказание α -спиральных и β -структурных областей. Обозначения: H – остатки аминокислот, сильно образующих α - или β -структуры; h – остатки, образующие α - или β -структуры; I – остатки, слабо образующие α - или β -структуры; i – остатки аминокислот, индифферентные к образованию α - или β -структур; B – остатки, сильно разрыхляющие α - или β -структуры; b – остатки, разрыхляющие α - или β -структуры. \circ – α -структура, \square – β -структура

A_2 из яда перепончатокрылых. До сих пор известна структура только фермента из яда медоносной пчелы *Apis mellifica* [10]. В отличие от фосфолипазы A_2 поджелудочной железы и яда змей, имеющих жесткие структуры, которые обеспечиваются наличием 6–7 дисульфидных связей, фосфолипаза A_2 пчелиного яда имеет только 4 дисульфидные связи на полипептидную цепь, состоящую из 128 аминокислотных остатков (рис. 1).

Целью настоящей работы является исследование конформационных состояний фосфолипазы A_2 пчелиного яда в растворе с помощью широкого набора физико-химических методов, включая ядерный магнитный резонанс, электронный парамагнитный резонанс, круговой дихроизм и разностную УФ-спектроскопию.

Фосфолипаза A_2 пчелиного яда была получена в индивидуальном состоянии с использованием аффинной хроматографии на конканавалин-сефарозе 4В (см. «Экспериментальную часть»).

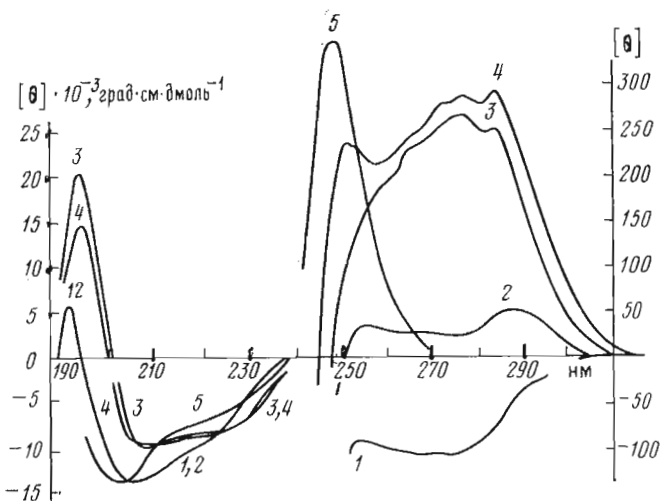


Рис. 2. Кривые КД фосфолипазы A_2 при различных рН: 1 — 2,3 (25° С) и 8,0 (70° С); 2 — 2,7 (25° С); 3 — 7,5 (25° С); 4 — 10,0 (25° С); 5 — 12,0 (25° С). $[\theta]$ — молекулярная эллиптичность усредненного аминокислотного остатка M 113

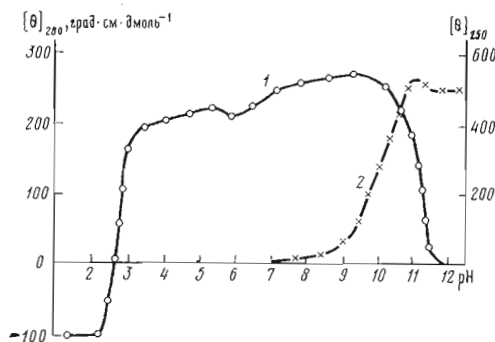


Рис. 3. Зависимость молекулярной эллиптичности от рН, отнесенная к одному аминокислотному остатку, при 280 (1) и 250 нм (2)

При изучении фосфолипазы A_2 методом кругового дихроизма было найдено (рис. 2), что в диапазоне рН 3,5–9 спектры КД менялись мало как в области оптической активности пептидных групп (190–240 нм), так и в области эффектов Коттона ароматических остатков (250–300 нм) (на рис. 2 приведена кривая 3, полученная при рН 7,5, характерная для данного интервала значений рН). Это говорит о стабильности структуры фермента в указанном интервале рН. Переход в более кислую область, равно как и в щелочную, сопровождается сильными спектральными изменениями: резко меняется интенсивность и положение полос, соответствующих $n \rightarrow \pi^*$ - и $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходам пептидных хромофоров, исчезает тонкая структура полос, соответствующих $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходам ароматических остатков, и снижается их интенсивность. Эти изменения свидетельствуют о глубоких конформационных переходах, затрагивающих как боковые аминокислотные остатки, так и основную полипептидную цепь. Необходимо отметить, что для фосфолипаз A_2 из яда змей не обнаружены подобные переходы, а в случае панкреатической фосфолипазы A_2 отмечен конформационный переход при рН 2,1, не сопровождающийся изменением оптической активности [12].

Ранее было показано [13], что при сильнокислых и щелочных значениях рН фосфолипаза полностью теряет ферментативную активность. Поскольку обнаруженные конформационные переходы молекулы фермента сопровождаются потерей активности, они могут быть названы денатурационными. Денатурация как в кислой, так и в щелочной областях рН полностью обратима. Возвращение от высоких и низких значений рН к нейтральным приводит практически к полному восстановлению кривых КД (растворы выдерживались при рН в течение 30 мин).

Расчет по методу Чена и Янга [14] дает следующие содержания α - и β -форм:

рН	α	β	R
3,5—9,5	24	30	46
2,6	34	6	60
12,0	24	16	60

Отсюда видно, что как кислый, так и щелочной переходы сопровождаются возрастанием содержания неупорядоченной структуры (R). Интересно, что содержание α -спиральных участков в фосфолипазах из других источников варьирует в широких пределах: от 9 до 70% [15, 16]. Определение содержания α -спиральных и β -структурных участков молекулы фермента по ее аминокислотной последовательности методом Чоу — Фасмана [17] с использованием конформационных параметров, рассчитанных Левиттом и опубликованных в работе [18], показало наличие двух α -спиральных участков между остатками 19—37 и 78—94 (рис. 1), что составляет 25%; β -структурные участки составляют 14% и локализованы между остатками 71—78, 108—112 и 118—123 (рис. 1). Сопоставление полученных данных с расчетом по спектрам КД указывает на расхождение в оценке содержания β -структур. Возможно, полученное расхождение объясняется, как было предложено Юргенсонсом и де Хаасом [16], вкладом в оптическую активность в области 190—240 нм других асимметрических структур, например кольцевых, содержащих дисульфидные связи. Несомненно, однако, что изменения спектра КД в области 250—300 нм, отмеченные при денатурационных переходах, свидетельствуют о нарушении структуры всей белковой молекулы.

Значение рН-переходов в кислой и щелочной областях было установлено нами по изменению эллиптичности при 280 нм (рис. 3). Известно, что дихроичное поглощение в области 250—300 нм возникает главным образом за счет переходов остатков триптофана, тирозина, фенилаланина и дисульфидных связей. В молекуле фосфолипазы A_2 из яда пчелы содержится 2 остатка триптофана, 8 остатков тирозина, 5 остатков фенилаланина и 4 дисульфидные связи. Если в кислой области рН наблюдаемый конформационный переход связан, вероятно, с ионизацией одной или нескольких карбоксильных групп ($pK_{наж}$ $2,8 \pm 0,05$), то переход в щелочной области с $pK_{наж}$ $11,2 \pm 0,1$ скорее всего вызван ионизацией остатков тирозина.

В спектрах КД при рН 9,0 появляется полоса при 250 нм (рис. 2). Природа этой полосы неясна. Пфлум и Бейчок [19] обнаружили аномальную положительную полосу 240 нм в спектрах КД панкреатических рибонуклеаз А и S и предположили, что она может быть отнесена к титруемым тирозиновым остаткам. При исследовании спектров КД лютропина [20], также имеющих положительную полосу около 250 нм, авторы высказали предположение, что оптическая активность в этой области может возникать из-за ионизированных остатков тирозина с дополнительным вкладом от дисульфидных связей. Бреслоу [21], изучая оптическую активность нейрофизинов, содержащих 6—7 дисульфидных связей, 3 остатка фенилаланина и остаток тирозина, относит положительную полосу при 250 нм

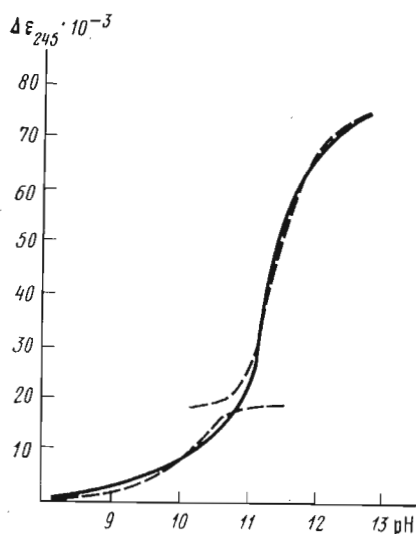


Рис. 4. Спектрофотометрическое титрование остатков тирозина при 245 нм. Пунктиром показана кривая, рассчитанная на ЭВМ

нать, что для остатка тирозина $\Delta\epsilon_{245} 10\ 000$ [23], то кривая с $pK_1 10,2$ отвечает ионизации 2 остатков тирозина, а ионизация остальных 6 остатков происходит с $pK_2 11,3$, точно соответствующим рН-переходу щелочной денатурации фермента. Неудивительно, что кривая зависимости $[\theta]_{250}$ от рН совпадает с кривой титрования доступных остатков тирозина, поскольку их ионизация происходит до денатурационного перехода молекулы и не сопровождается изменением оптической активности дисульфидных связей, т. е. происходит изменение только электрического дипольного момента (μ) фенольных колец остатков тирозина. При денатурации начинают ионизироваться остатки тирозина, замаскированные внутри глобулы белка, одновременно с разупорядочиванием структуры молекулы и вероятным изменением оптической активности дисульфидных связей. Этот процесс находит отражение на кривой зависимости $[\theta]_{250}$ от рН: замедляется рост интенсивности полосы 250 нм, а после денатурации значение $[\theta]_{250}$ даже уменьшается (см. рис. 3). Так как влияние ионизации остатков тирозина на оптическую активность дисульфидных связей возможно, по-видимому, только в случае их достаточно близкого расположения в пространстве, то можно полагать, что вид кривой «зависимость $[\theta]_{250}$ от рН в области до денатурационного перехода» отражает ионизацию двух доступных остатков, находящихся вблизи от дисульфидной связи.

Конформационный переход в кислой области значений рН более детально был исследован с помощью спектроскопии ЯМР и ЭПР. На рис. 5 приведены спектры ЯМР фосфолипазы при рН 1,5 и 3,5. Как можно видеть, значительные изменения происходят практически во всех областях спектра. Так, ароматическая область спектра (6,8–7,8 м.д.), содержащая сигналы боковых цепей 8 тирозинов, 5 фенилаланинов, 2 триптофанов, а также сигналы протонов C4-N от 6 остатков гистидина, увеличивается при переходе от рН 1,5 к 3,5 почти в 2 раза. Изменения происходят в области сигналов C^αH (4,0–5,5 м.д.), а также в высокопольной области спектра, где появляются сигналы метильных групп с аномально высоким экранированием (–0,5–1,0 м.д.). Сигналы протонов в области 8,7–9,2 м.д., которые можно отнести к C2-N остатков гистидина на основании

к оптической активности именно дисульфидных связей, причем в этом случае интенсивность полосы не изменялась вплоть до рН 11,3, хотя остаток тирозина при этом значении рН ионизирован на $\frac{2}{3}$. Вуди [22] предположил, что в ближней УФ-области может возникать сильная оптическая активность дисульфидных связей за счет перекрывания электрических дипольных моментов фенольных колец остатков тирозина и магнитных дипольных моментов дисульфидных связей ($\mu \cdot m$).

Последнее объяснение природы полосы 250 нм кажется наиболее вероятным. Становится понятной зависимость $[\theta]_{250}$ от рН (см. рис. 3) при сравнении ее с данными по спектрофотометрическому титрованию остатков тирозина (рис. 4). Из рис. 4 видно, что кривая титрования имеет сложную форму и может быть разложена на две составляющие с $pK_1 10,2 \pm 0,1$ и $pK_2 11,3 \pm 0,1$ *.

* Расчет кривой титрования проведен на машине мини-ЭВМ 620/L «Varian» (США) по программе, любезно предоставленной А. З. Гуревичем.

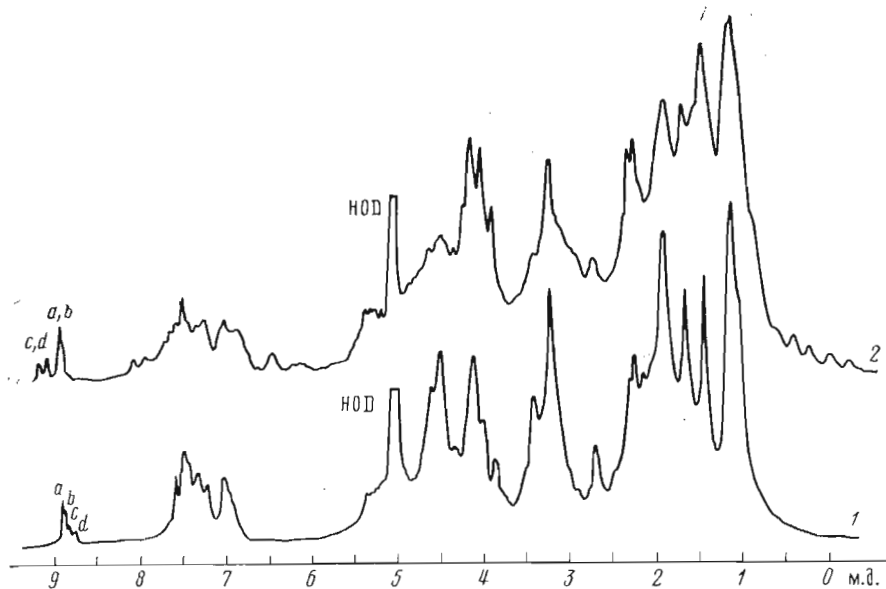


Рис. 5. Спектры ^1H -ЯМР фосфолипазы A_2 при рН 1,5 (1) и 3,5 (2)

их характерного химического сдвига, медленного дейтерообмена и зависимости химических сдвигов от рН среды, также претерпевают изменения. По мере увеличения рН в диапазоне 2,5–3,0 сигналы *c* и *d* уменьшают свою интенсивность и исчезают, появляясь при этом в более слабом поле (рис. 6). Сигнал *b* испытывает в том же диапазоне рН слабое изменение химического сдвига, сливаясь с сигналом *a*.

Таким образом, подтверждается вывод о том, что фосфолипаза A_2 претерпевает глубокий конформационный переход, затрагивающий всю молекулу. В результате перехода от кислой к нейтральной области рН белок приобретает значительно более жесткую структуру, на что указывает увеличение диапазона химических сдвигов в ароматической области, а также появление аномальных метильных сигналов в высокопольной области. На основании разницы $\Delta\nu$ в химических сдвигах между сигналами от протонов C2-H гистидиновых остатков, соответствующих двум различным конформациям молекулы (сигналы *a*, *b*, *c*, *d* при рН 2,8, рис. 6), время жизни в каждом состоянии можно определить из соотношения $t > 1/2\pi\Delta\nu$. Оно составляет более 1 мс.

Дополнительная информация о характере конформационного перехода в кислой области рН была получена при изучении спин-меченой фосфолипазы. При обработке фосфолипазы N-оксисукцинимидным эфиром 2,2,5,5-тетраметилпирролин-1-оксим-3-карбоновой кислоты [24] было получено производное, включающее 4 спиновые метки по ϵ -амплогруппам остатков лизина. Это соединение обладало 20% ферментативной активности нативной молекулы. Из рН-зависимости отношений интенсивностей высокопольного компонента к центральной ($h-1/h_0$) [25] следует, что подвижность спиновых меток резко падает при изменении рН от 2,5 до 3,5 (рис. 7), подтверждая тем самым данные о переходе молекулы к более жесткому конформационному состоянию.

Разностные спектры поглощения дополняют картину конформационных переходов в кислой области рН (рис. 8). Денатурация при низких значениях рН сопровождается ростом интенсивности отрицательных полос при 232 и 270–310 нм. Как известно [26], в области 230 нм в разностных УФ-спектрах есть полосы ароматических остатков и гистидина с преобладающим вкладом в поглощение остатков триптофана. Полосы раз-

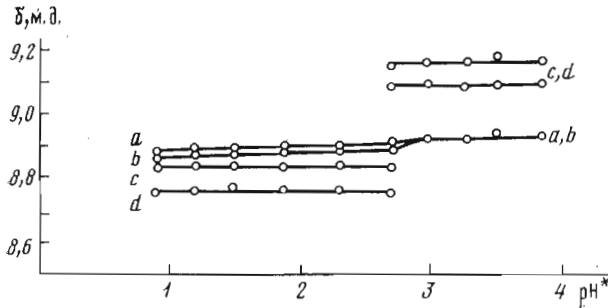


Рис. 6. Фрагмент кривых титрования С2-Н шести остатков гистидина фосфолипазы A_2

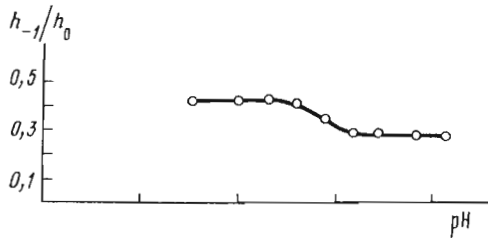


Рис. 7. Изменение подвижности иминоксильного радикала при изменении рН среды. $(h-1)/h_0$ — отношение интенсивностей высокополюсного компонента к центральному. рН* — некорректированные показатели рН-метра для растворов в 2H_2O

ного спектра в области 270—340 нм относится к пертурбации остатков триптофана и тирозина. Появление отрицательных полос вследствие голубого сдвига спектра поглощения согласуется с предположением об экспонировании ароматических остатков в растворитель в процессе денатурации.

Полоса при 232 нм была использована при изучении процесса тепловой денатурации при различных значениях рН (рис. 9, 10). Температурная денатурация фосфолипазы A_2 , как оказалось, полностью обратима. Зависимости ΔD_{232} от температуры при повышении до 90° С и последующем понижении, а также при повторной денатурации практически совпадали, не обнаруживая гистерезиса. Это позволило выполнить расчет термодинамических параметров процесса, исходя из соотношения

$$K = \frac{\Delta D}{\Delta D_D - \Delta D}$$

где K — константа равновесия процесса денатурации, ΔD — разность в поглощении при 232 нм для температуры 25° С и данной температуры, ΔD_D — разность в поглощении при 232 нм при 25° С и температуре, соответствующей денатурационному состоянию.

Значения свободной энергии ΔF , энтальпии ΔH и энтропии ΔS процесса рассчитаны по уравнениям

$$\Delta F = -RT \ln K,$$

$$\Delta H = -R \Delta \ln K / \Delta (1/T),$$

$$\Delta S = (\Delta H - \Delta F) / T = \Delta H / T = R \ln K.$$

ΔH получено из наклона зависимости $R \ln K$ от $1/T$, ΔS — из значений ΔH при температуре средней точки $T_{1/2}$ кривой денатурации. Рассчитанные значения приведены в таблице.

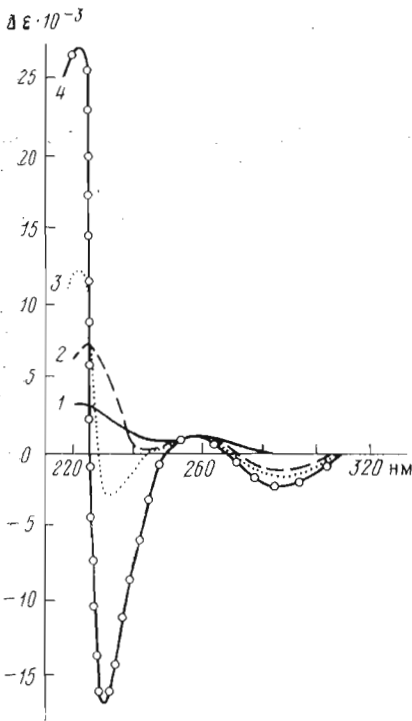


Рис. 8

Рис. 8. Разности спектры поглощения фермента. В кювете сравнения раствор фосфолипазы при рН 6,6. В кювете с образцом раствор фосфолипазы A_2 при рН 6,0 (1), 4,0 (2), 2,8 (3), 2,3 (4)

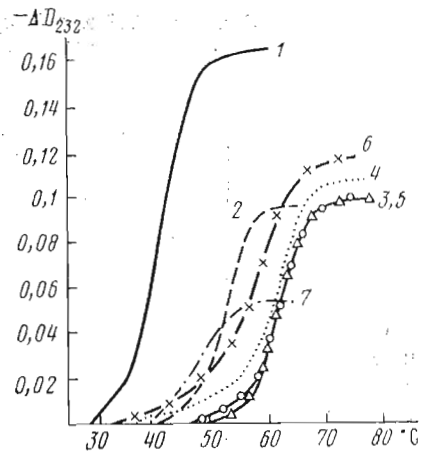


Рис. 9

Рис. 9. Тепловая денатурация фосфолипазы A_2 при рН 3,35 (1), 4,0 (2), 5,9 (3), 7,9 (4), 9,3 (5), 10,15 (6), 10,9 (7). Концентрация белка $6 \cdot 10^{-6}$ М

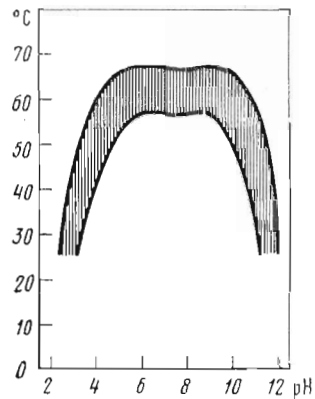


Рис. 10

Рис. 10. Денатурационные переходы белка в координатах рН и температуры. Изменения оптической плотности прослежены при 232 нм. Температура образца сравнения 25°C

Как можно видеть, в диапазоне рН 4–9 ΔH и ΔS очень близки, что свидетельствует о сходной картине температурного денатурационного процесса. Однако в областях рН, где происходит титрование карбоксильных групп и остатков тирозина, наблюдается соответственно уменьшение и увеличение энтальпийной и энтропийной составляющих свободной энергии. Эта аномалия может быть объяснена чисто спектроскопическим эффектом изменения поглощения белка, происходящего не только за счет денатурации, но и вследствие ионизации COO -групп и OH -групп остатков тирозина. Таким образом, переходы фосфолипазы, происходящие при изменении рН или повышении температуры, — единый денатурационный процесс. Очевидно, установленный диапазон значений рН и температуры, где сохраняется стабильное конформационное состояние белка, — предельная область, в которой фосфолипаза может еще проявлять свое биологическое действие.

**Значения ΔH и ΔS процесса тепловой денатурации
при различных значениях pH фосфолипазы A_2
пчелиного яда**

pH	$\Delta H_{\text{каж.}}$ ккал/моль	$\Delta S_{\text{каж.}}$ э.е.	pH	$\Delta H_{\text{каж.}}$ ккал/моль	$\Delta S_{\text{каж.}}$ э.е.
3,35	74,4	237	7,8	92,1	274
3,97	92,5	264	9,3	92,0	275
5,9	92,0	275	10,9	118,3	367

Следует отметить, что в работе [27] методом ДОВ не обнаружены какие-либо изменения конформации фосфолипазы A_2 при нагревании вплоть до 90°C . Однако спектры КД фосфолипазы A_2 из яда пчелы, полученные при температурах выше 55°C , указывают на значительные изменения конформации молекулы (рис. 2, 1). Полученные результаты настоящей работы убедительно доказывают наличие обратимых конформационных переходов фосфолипазы A_2 из яда пчелы при нагревании выше 55°C , а также в кислой и щелочной областях pH. Кроме того, полученные результаты позволяют предположить важность карбоксильных групп и остатков тирозина в стабилизации нативной конформации молекулы фермента. Специфическая химическая модификация отдельных аминокислотных остатков должна, по-видимому, прояснить их роль в стабилизации структуры молекулы и в проявлении ферментативной активности.

Экспериментальная часть

Яд медоносной пчелы *Apis mellifica* был получен из научно-исследовательского института химии Горьковского государственного университета им. Лобачевского. Лиофилизированный пчелиный яд диализовали через диализатор CHDP/15 Mini Plant Dialyzer (США) в 0,05 М аммоний-ацетатном буфере (pH 4,7) при постоянном объеме растворенного яда. Раствор, содержащий высокомолекулярную фракцию, был лиофилизован. Белок (22 мг), полученный после лиофилизации, растворяли в 10 мл 0,02 М натрий-фосфатного буфера (pH 7,2), содержащего 1 М NaCl и 0,1 мМ MgCl_2 , MnCl_2 и CaCl_2 , и наносили на колонку (1×5 см) с конканавалин-А-сефарозой 4В (Pharmacia, Швеция) при 20°C . Колонка была промыта 10 объемами 0,02 М натрий-фосфатного буфера (pH 7,2), содержащего 1 М NaCl и 0,1 мМ MnCl_2 , CaCl_2 , и затем 0,1 М раствором D- α -маннопиранозида в том же самом буфере (рис. 11). После обессоливания фракцию, содержащую фосфолипазу, наносили на колонку с SE-сефадексом С-25 (1×5 см), уравновешенным трис-HCl-буфером (pH 9,1), и хроматографировали с использованьем линейного градиента NaCl от 0,01 до 0,15 М в том же самом буфере (рис. 12). Окончательной деминерализации достигали диализом против воды. Гомогенность белка была показана диск-электрофорезом в полиакриламидном геле при pH 4,5. Аминокислотный состав полностью соответствовал литературному [12].

Спектры КД снимали на дихрографе Jouan-III (Jobin-Jvon, Франция). Толщина слоя 1 см для области 320–250 нм и 0,01 см для области 250–190 нм. Концентрация белка $\sim 10^{-5}$ М. Скорость сканирования 0,2 нм/с, чувствительность $2 \cdot 10^{-6}$. Для снятия спектров КД при повышенных температурах использовали специально сконструированный держатель для кювет.

Разностные спектры поглощения получены на спектрофотометре Beckman Acta M-VI. Толщина слоя 1 см. Концентрация белка не более 10^{-5} М в 0,1 и 0,01 М трис-HCl-буфере. pH контролировали с помощью pH-метра Beckman pH ASAR-1 с комбинированным микроэлектродом Beckman 39090. Температурные разностные УФ-спектры сняты в термостатирован-

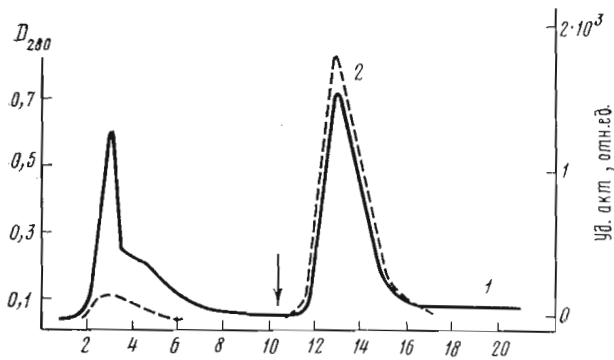


Рис. 11. Выделение фосфолипазы A_2 пчелиного яда с помощью аффинной хроматографии на колканавалин-А-сефарозе 4В (колонка 1×5 см). Стрелкой указано начало элюирования α -D-маннопиранозидом. Контроль элюата по поглощению и активности

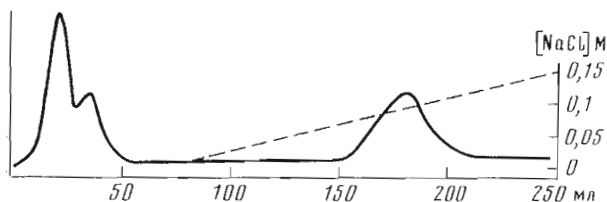


Рис. 12. Хроматографическое разделение фосфолипазы A_2 на SE-сефадексе С-25 (колонка 1×5 см)

ных кюветодержателях с использованием приставки ТМ programmer и двухкоординатного самописца Hewlett-Packard 7035 В.

Спектры ^1H -ЯМР получены на спектрометре SC-300 Varian с фурье-преобразованием на мини-ЭВМ типа 620/L (память 16 К) в $^2\text{H}_2\text{O}$ (100%, Stohler Isotope) при концентрации белка 5 мМ. Подвижные протоны NH предварительно обменивали в ^2H при 24°C в течение суток при pH 7,0. В качестве сигнала стабилизации использовали сигнал дейтерия. Температура образца в датчике спектрометра (32°C) контролировалась стандартной температурной приставкой с точностью $\pm 1^\circ\text{C}$. Химические сдвиги измерены относительно внешнего стандарта, в качестве которого использовался гексаметилдисилоксан. Измерения pH выполнены при 23°C с помощью pH-метра типа Orion-Research 601 с комбинированным электродом типа Ingold 405 МЗ непосредственно в ампуле. Калибровка выполнена по двум стандартным буферам с pH 4 и 7 (Ingold). Приведенные значения pH соответствуют показаниям pH-метра. Для растворов в $^2\text{H}_2\text{O}$ обозначение pH* отвечает некорректированным показателям pH-метра. Изменения pH проводили добавлением стандартных 1 н. растворов NaOD и DCl.

Спектры ЭПР получены на спектрометре E-109 (Varian) с использованием специальной ампулы для водных растворов. Температура образца в резонаторе (32°C) контролировалась стандартной температурной приставкой с точностью $\pm 1^\circ\text{C}$. Концентрация меченого фермента $5 \cdot 10^{-5}$ М.

Авторы благодарны руководителю настоящей работы акад. Ю. А. Овчинникову за участие в обсуждении результатов и критические замечания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wernicke J. F., Vanker A. D., Howard B. D. (1975) *J. Neurochem.*, 25, 483–496.
2. Chang C. C., Lee J. D. (1977) *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharm.*, 296, 159–167.
3. Eaker D. (1975) in: *Peptides: Chemistry, Structure, Biology* (Walter R., Meienhofer F., eds), pp. 17–30, Ann. Arbor Sci. Publ. Inc.

4. Howard B. D., Wu W. C. S. (1976) *Brain Res.*, **103**, 190-192.
5. Strong P. N., Goerke F., Oberg S. G., Kelly R. B. (1976) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 178-182.
6. Abe T., Alema S., Miledi R. (1977) *Eur. J. Biochem.*, **80**, 1-12.
7. Habermann E., Breithaupt H. (1978) *Toxicon*, **16**, 19-30.
8. Halpert J., Eaker D., Karlsson E. (1976) *FEBS Lett.*, **61**, 72-76.
9. Heinrikson R. L., Krueger E. T., Keim P. S. (1977) *J. Biol. Chem.*, **252**, 4913-4921.
10. Shipolini R. A., Doonan S., Vernon C. (1974) *Eur. J. Biochem.*, **48**, 477-483.
11. Shipolini R. A., Callewart G. L., Cottrell R. C., Doonan S., Vernon C. A., Banks B. E. C. (1971) *Eur. J. Biochem.*, **20**, 459-468.
12. Abita J.-P., Lazdunski M., Bensen P. P. M., Pietron W. A., de Haas G. H. (1972) *Eur. J. Biochem.*, **30**, 37-47.
13. Efremov E. S., Meshcheryakova E. A., Gritsyk V. I., Galstukov V. P., Miroshnikov A. I. (1977) XIII European Congress on molecular spectroscopy. *Poland. Abstracts*, p. 517.
14. Chen J. H., Jang J. T., Martinez H. M. (1972) *Biochemistry*, **11**, 4120-4131.
15. Drenth J., Enzing C. M., Kalk K. H., Vessies J. C. A. (1976) *Nature (London)*, **264**, 373-377.
16. Jirgensons B., de Haas G. H. (1977) *Biochim. et biophys. acta*, **494**, 285-292.
17. Chou P. J., Fasman G. D. (1974) *Biochemistry*, **13**, 222-245.
18. Argos P., Hanei M., Garavito R. M. (1978) *FEBS Lett.*, **93**, 19-24.
19. Pflumm M. N., Beychok S. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 3973-3981.
20. Ascoli M., Ward D. N., Jirgensons B. (1977) *Eur. J. Biochem.*, **72**, 157-165.
21. Breslow E. (1970) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **67**, 493-500.
22. Woody R. W. (1971) 162 National Meeting of the American Chem. Soc., Washington, Abstract, PHIS 110.
23. Nozaki Y., Tanford C. (1967) *Methods Enzymol.*, **11**, 570-576.
24. Розанцев Э. Г. (1970) Свободные радикалы, с. 184, изд-во «Химия», М.
25. Лихтенштейн Г. И., Кольтовер В. К. (1973) Итоги науки и техники, Молекулярная биология, **3**, 6-84.
26. Donovan J. W. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 1961-1967.
27. Nair C., Hermans J., Munjal D., Elliott W. B. (1976) *Toxicon*, **14**, 35-42.

Поступила в редакцию
1.III.1979

**STRUCTURE-FUNCTIONAL STUDIES OF PHOSPHOLIPASE A₂. pH AND
TEMPERATURE DEPENDENT CONFORMATIONAL TRANSITIONS OF
BEE VENOM PHOSPHOLIPASE A₂**

GRITSUK V. I., MESHCHERYAKOVA E. A., OKHANOV V. V.,
EFREMOV E. S., MIROSHNIKOV A. I.

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

Phospholipase A₂ was isolated in the individual state from honey bee venom by the affinity chromatography on concanavalin Sepharose 4B. The conformational states of this enzyme were investigated by difference UV, CD, NMR and ESR spectroscopy. The reversible conformational transitions with pK 2.8 and 11.3 were found within acid and alkaline pH ranges, respectively. These conformational changes are considered to have a denaturation character, since they are accompanied both by the transition to a less ordered structure of the enzyme and the loss of enzymic activity. The reversible thermal denaturation occurring at the temperatures higher than 55°C was studied by the difference UV spectroscopy. The free energy (ΔE), enthalpy (ΔH), and entropy (ΔS) values characterizing the denaturation process were obtained. The relation between the enzyme conformational states and its biological activity is discussed.