



УДК 577.153.04

ФОСФОЛИПАЗА А₂ ИЗ ЯДА КОБРЫ ПОВЕРХНОСТНАЯ АКТИВНОСТЬ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ФОСФОЛИПИДНЫМИ МОНОСЛОЯМИ

Ксенжек О. С., Гевод В. С.

Днепропетровский химико-технологический институт

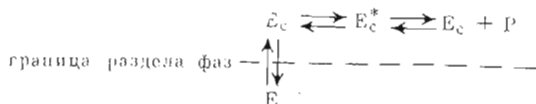
Айанян А. Е., Мирошников А. И.

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

Предложен механизм гидролиза структурированных липидов фосфолипазой А₂ из яда кобры, согласно которому в элементарном акте участвует димер фермента. Обсуждается роль «патающего» движения в функционировании димеров для обеспечения высокой скорости гидролиза. Установлено, что ионы кальция снижают энергию активации распада комплексов фермента с субстратом, однако не являются необходимыми для гидролиза фосфолипидов. В присутствии ионов стронция гидролиз происходит при более высоких значениях поверхностного давления.

Известно, что фосфолипазы А₂ (КФ 3.1.1.4) гидролизуют структурированные фосфолипиды (монослой, мицеллы, биологические мембраны) в 10³–10⁴ раз быстрее, чем фосфолипиды, в истинном водном растворе, причем скорость гидролиза существенно зависит от плотности упаковки липидных молекул [1–4]. Для фосфолипаз, выделенных из различных источников, максимальная скорость гидролиза липидов в монослой наблюдается в интервале давлений 10–20 дин/см. Радиозотопным методом было показано [5], что количество молекул фосфолипазы в монослоях уменьшается пропорционально давлению, тогда как активность фермента монотонно возрастает вплоть до давлений, при которых белок теряет способность встраиваться в монослой. Предполагается, что резкое увеличение активности фосфолипазы в водно-липидных системах обусловлено такой ориентацией фосфолипазы на границе раздела фаз, когда каталитический центр белковой молекулы оптимально расположен по отношению к полярным группам молекул субстрата.

В 1981 г. была предложена общая модель гидролиза фосфолипазами А₂ субстратов, находящихся на границе раздела фаз [6]:



Фермент из раствора (E), связанный на поверхности раздела фаз, может находиться в двух конформациях, E_c и E_c^{*}, с малой и высокой ферментативной активностями. Равновесие между этими двумя формами

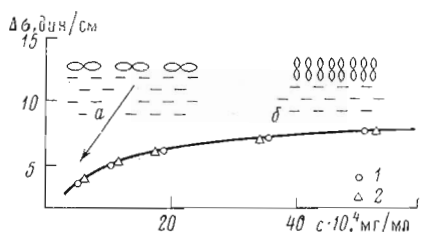


Рис. 1

Рис. 1. Изотермы адсорбции фосфолипазы A_2 на границе раздела вода — воздух (10^{-2} М трис-НСI, рН 7,35; 23°C ; $1 - 5 \cdot 10^{-3}$ М CaCl_2 ; $2 - 5 \cdot 10^{-3}$ М SrCl_2) и схематическое строение адсорбционного слоя фермента при низкой (а) и высокой (б) объемной концентрации белка

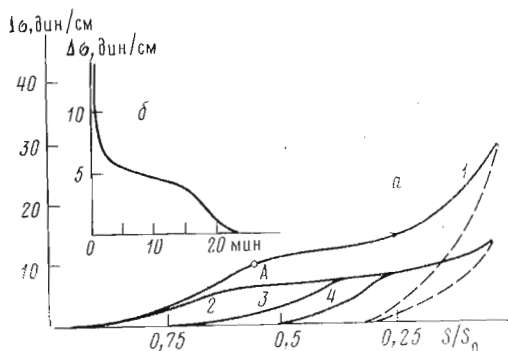
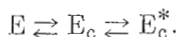


Рис. 2

Рис. 2. Циклические изотермы сжатия расширенных адсорбционных монослоев фосфолипазы ($\Delta\sigma$ — поверхностное давление в монослое, S/S_0 — степень его сжатия; 1, 2, 3, 4 — очередность циклов) (а) и кривая изменения давления сжатого монослоя фермента (σ). Точка А — давление структурной перестройки

определяется свойствами как фермента, так и монослоя фосфолипида. Различия в ферментативной активности фосфолипаз A_2 авторы объясняют сдвигом равновесий



Известно, что фосфолипазы из яда змей образуют в растворе димеры, которые стабилизируются в присутствии фосфолипидов [7]. Результаты химической модификации фермента из яда кобры также свидетельствуют о его димеризации в растворе [8]. На основании этих данных была предложена модель гидролиза фосфолипидов димерным ферментом, предполагающая гидрофобное взаимодействие белковой молекулы с углеводородными цепями остатков жирных кислот [9]. Однако данные, полученные при изучении взаимодействия фосфолипазы со спин-меченными фосфолипидами и жирными кислотами, не подтвердили это предположение [10, 11].

Целью настоящей работы было изучение гидролиза фосфолипазой A_2 из яда кобры *Naja naja oxiana* липидов в монослое, так как именно монослой фосфолипидов в данном случае являются, по-видимому, наиболее адекватной моделью биологических мембран.

Фосфолипаза A_2 обладает определенной поверхностной активностью, образует на границе раздела вода — воздух монослой белка и способна внедряться в липидные монослой, образуя липопротеиновые комплексы. Изотермы адсорбции фермента на границе раздела фаз не зависят от присутствия ионов кальция (кофактор гидролиза) и стронция (ингибитор) (рис. 1). Максимальное снижение поверхностного натяжения ($\Delta\sigma$) составляет 8 дин/см. Анализ изотерм адсорбции показывает, что в интервале объемных концентраций белка $5 \cdot 10^{-4} - 6 \cdot 10^{-3}$ мг/мл образуются плотно упакованные монослои с предельной удельной площадью. Расчет численных значений площади, приходящейся на молекулу, по уравнению Гиббса

$$S_i = \frac{10^{16} K T d \ln c}{\Delta\sigma},$$

где σ — поверхностное натяжение, а c — объемная концентрация, приводит к величине $S_i = 265 \text{ \AA}^2$. Сопоставление этих данных с рентгеноструктурными [12] показывает, что в монослое эффективная площадь на молекулу вдвое меньше, чем минимальное сечение молекул в кристалле.

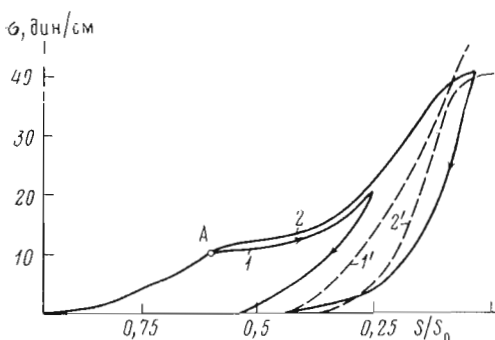


Рис. 3. Циклические изотермы сжатия монослоев липопротеиновых комплексов, полученных введением фосфолипазы A_2 под расширенные монослои лецитина (1) и лизолецитина (2). Штриховые кривые 1', 2' — изотермы сжатия монослоев лецитина и лизолецитина

Отсюда можно заключить, что в равновесных плотно упакованных монослоях, образующихся при концентрации белка в растворе больше $5 \cdot 10^{-3}$ мг/мл, молекулы фосфолипазы димеризованы и ориентированы, по-видимому, так, как изображено на рис. 1 (схема б). Димеры возникают и в разреженных монослоях при концентрации белка меньше $5 \cdot 10^{-4}$ мг/мл. При сжатии монослоя димеры превращаются в ассоциаты, содержащие до 4 молекул фосфолипазы, о чем свидетельствуют изотермы быстрого сжатия (рис. 2). Давление структурной перестройки (точка А на кривой 1) оказывается равным по величине давлению в монослое фермента при максимальной адсорбции, причем крутизна изотермы при высоких степенях сжатия ($S/S_0 < 0,25$) примерно вдвое больше ее крутизны до начала структурной перестройки.

Образование димеров в монослое — процесс медленный, причем в сжатом монослое димеры неустойчивы. Если сжатие монослоя прекратить, они самопроизвольно распадаются на мономеры, растворяющиеся в субфазе. Это следует из кривой изменения давления сжатого монослоя (рис. 2 б). Плато на этой кривой в области поверхностных давлений 4–6 дин/см показывает, что наиболее стабильной формой фермента является в этих условиях мономер. Если сжатому монослою дать расшириться, то после длительной выдержки вновь происходит димеризация фосфолипазы, а если сжатие произвести непосредственно вслед за расширением, димерная структура образоваться не успевает (см. кривые 2–4 на рис. 2). Давление, отвечающее структурной перестройке, в этом случае оказывается вдвое меньшим, чем на кривой 1, что свидетельствует о двукратном уменьшении толщины монослоя, т. е. о присутствии в монослое не димеров, а мономеров фосфолипазы. Устойчивость димеров увеличивается, если фермент адсорбируется на фосфолипидном монослое.

Циклические изотермы сжатия липопротеиновых комплексов, полученных при адсорбции фермента на первоначально расширенных монослоях лецитина (в присутствии Sr^{2+} -ионов в качестве ингибитора гидролиза) и лизолецитина, приведены на рис. 3. Эти изотермы остаются неизменными при повторных циклах сжатия-расширения, а давление, отвечающее первой структурной перестройке (точка А), оказывается равным давлению перестройки при сжатии разреженного равновесного адсорбционного слоя фосфолипазы. Поскольку рассматриваемая структурная перестройка в липопротеиновом комплексе не может быть обусловлена взаимодействиями между фосфолипидными молекулами, которые занимают менее половины общей площади монослоя (изотермы сжатия исходного лецитинового и лизолецитинового монослоев на рис. 3 проведены пунктиром), величины давлений начала перестройки и совпадение изотерм на разных циклах показывают, что липопротеиновые слои в промежуточном коллапсе включают в себя димерную форму фосфолипазы, устойчивую к сжатию.

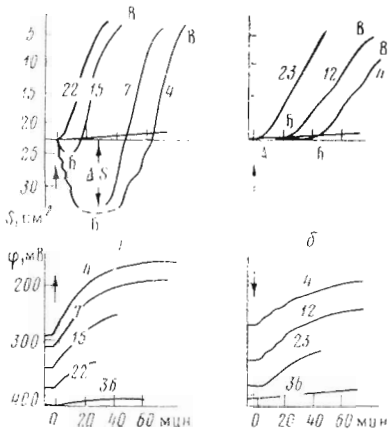


Рис. 4

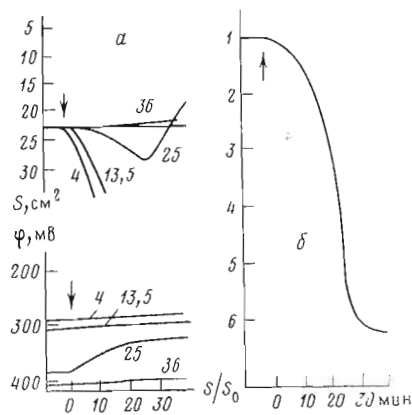


Рис. 5

Рис. 4. Изобары изменения площади (S) на 1 см ширины кюветы и граничного потенциала (φ) при взаимодействии фосфолипазы A_2 с монослоями лецитина разной плотности, сформированными на растворах, содержащих $5 \cdot 10^{-8}$ M $CaCl_2$ и фермент в концентрации $2,5 \cdot 10^{-6}$ мг/мл (а) и $1,25 \cdot 10^{-6}$ мг/мл (б). Стрелкой указан момент введения фермента. Цифры возле кривых отвечают значению давления монослой в дин/см. Объяснение обозначений А, Б, В — см. текст

Рис. 5. Изобары взаимодействия фосфолипазы A_2 с монослоями лецитина в присутствии ионов стронция (обозначения кривых см. в подписи к рис. 4) (а) и кривая изменения площади монослоя лецитина при его взаимодействии с ферментом ($1,25 \cdot 10^{-6}$ мг/мл) при давлении 8 дин/см (б)

Из приведенных результатов следует, что фосфолипиды благоприятствуют образованию и повышают устойчивость димеров фермента, причем как лецитин, так и продукт его гидролиза — лизолецитин в этом отношении одинаково эффективны. Жирные кислоты, введенные на границу раздела фаз, образованию димеров фосфолипазы не способствуют. По-видимому, лецитин и лизолецитин, образуя комплекс с молекулой фосфолипазы, изменяют ее третичную структуру так, что это облегчает связывание со второй молекулой фермента. Можно предположить, что димерное состояние фосфолипазы играет существенную роль в элементарных актах гидролиза фосфолипидов.

Поскольку скорость гидролиза фосфолипидов существенно зависит от состояния монослоя, было изучено влияние на белок-липидное взаимодействие таких факторов, как плотность упаковки фосфолипидов, ионный состав субфазы и концентрация фермента.

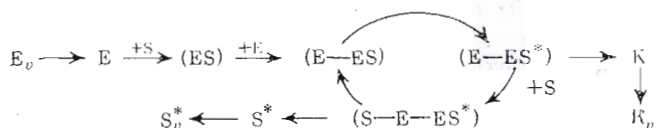
На рис. 4 приведена серия изобар, позволяющая рассмотреть взаимодействие фосфолипазы с лецитиновыми монослоями разной плотности, сформированными на растворах, содержащих ионы кальция и фосфолипазу в концентрации от $1,25 \cdot 10^{-6}$ до $2,5 \cdot 10^{-6}$ мг/мл. Видно, что взаимодействие фосфолипазы с монослоями протекает в две стадии, которым отвечают на изобарах два участка: АБ и БВ. Первый из этих участков отражает связывание белка, а второй — растворение монослоя. В зависимости от давления и концентрации фермента общий вид изобар меняется. При низких давлениях и больших концентрациях белка (кривые 4, 7 на рис. 4а) фермент не только гидролизует фосфолипиды в монослое, но одновременно и накапливается в нем, образуя липопротеиновые комплексы. О расщеплении фосфолипидов можно судить по уменьшению граничного потенциала, благодаря тому что продукты гидролиза создают меньшие граничные потенциалы, чем фермент и фосфолипиды. С другой стороны, о накоплении белка в монослое в течение индукционного периода свидетельствует существенное увеличение площади монослоя (участки АБ).

После индукционного периода начинается быстрое разрушение монослоя, сопровождающееся сокращением его площади.

Если монослой липида предварительно сжать, количество белка, накапливающееся в монослое, уменьшается, а его активность возрастает, о чем свидетельствуют уменьшение прироста площади на участке АБ и сокращение индукционного периода (см. кривые 3, 4 на рис. 4). По достижении критического давления 22 дин/см участок АБ на изобарах исчезает. Скорость разрушения монослоев при этом достигает максимума, а индукционный период становится менее продолжительным. Если давление превышает 22 дин/см, скорость разрушения монослоев снижается, так как количество фосфолипазы в них резко уменьшается. При давлениях выше 34 дин/см гидролиз прекращается, так как белок практически перестает проникать в липидный монослой. Если концентрацию белка снизить до $2,5 \cdot 10^{-6}$ мг/мл, на изобарах сохраняется индукционный период, но исчезает участок АБ, отвечающий накоплению фермента в монослое. В то же время скорость растворения монослоев после индукционного периода примерно такая же, как при концентрации фермента, большей почти на два порядка, и близка к скорости растворения монослоев, состоящих из комплексов лизолецитин—фосфолипаза, если ее измерить в аналогичных условиях.

Отсюда следует, что при действии фосфолипазы на монослой фосфолипидов, содержащих высшие жирные кислоты, конечными продуктами являются не жирная кислота и лизолецитин, хорошо растворимые в субфазе (как это было показано при гидролизе монослоев из фосфолипидов, углеводородные цепи которых содержали менее 14 атомов углерода [5]), а менее растворимые комплексы фермента с лизолецитином, которые переходят в раствор лишь после полного гидролиза молекул субстрата. Достаточно наглядно этот вывод иллюстрируют изобары 4 и 12 на рис. 4б, полученные в условиях, когда фермент может легко проникать в монослой, но концентрация его в растворе столь мала, что реально в монослое он не накапливается. В этом случае участок АБ на изобарах отражает выход из монослоя жирной кислоты и лизолецитина и накопление в нем комплексов лизолецитин—фосфолипаза, устойчивых в монослое в присутствии лецитина; участки БВ отвечают растворению этих комплексов, когда гидролизу подвергся весь субстрат.

На основании полученных данных механизм действия фосфолипазы A_2 из яда кобры на границе раздела фаз может быть представлен следующей схемой:



Фермент из раствора (E_0) переходит в монослой и образует с лецитином (S) первичный комплекс (ES), который далее присоединяет еще одну молекулу белка и превращается в активный димерный комплекс (E—ES). Лецитин, входящий в этот комплекс, подвергается ферментативному расщеплению, в результате которого образуется жирная кислота (K) и комплекс лизолецитина (S^*) с димером фермента (E—ES*). Можно предположить, что в этом комплексе та молекула фосфолипазы, которая связана с лизолецитином, находится в монослое, а другая — вне его. При последующем взаимодействии незанятой субъединицы димера с лецитином в монослое образуется неустойчивый комплекс (ES—ES*), распадающийся на (E—ES) и S^* .

Если это предположение верно, то каждый ферментативный акт будет сопровождаться своего рода шагающим движением димера, поочередно взаимодействующего с монослоем то одной, то другой субъедини-

цей. Движущей силой этих «шагов» служит облегчение распада комплекса фермента с продуктом при связывании соседней молекулы фермента с субстратом. Этим механизмом можно объяснить значительно большую скорость ферментативного гидролиза структурированных липидов по сравнению с липидами в истинном растворе. В последнем случае комплекс ($ES-ES^*$), по-видимому, оказывается ненапряженным, поскольку молекулы лецитина и лизолецитина не фиксированы, и поэтому распад этого комплекса протекает медленнее.

Дополнительный благоприятный эффект «шагового» механизма может быть также обусловлен тем, что каждый последующий акт взаимодействия фермента с монослоем происходит на значительном удалении (100 \AA) от предыдущего, что уменьшает вероятность ингибирования процесса продуктами реакции.

При действии фосфолипазы на лецитиновые монослои, сформированные на растворах, содержащих ионы стронция, характер взаимодействия фермента с липидом значительно меняется (рис. 5). Если фосфолипаза вводится под монослой с давлением ниже 18 дин/см , это взаимодействие ограничивается проникновением фермента в монослой и образованием липопротеинового комплекса. Площадь монослоев возрастает на порядок, но они остаются устойчивыми и в субфазе не растворяются. Кривые изменения площади при этом оказываются S-образными, что, по-видимому, указывает на кооперативный характер процесса: молекулы фосфолипазы, проникшие из объема в монослой, облегчают последующее встраивание других молекул белка. Если давление в монослое превышает 18 дин/см , взаимодействие фосфолипазы с монослоем протекает по механизму, подобному тому, который реализуется в присутствии ионов кальция. Эти данные свидетельствуют о том, что при давлениях ниже 18 дин/см в присутствии ионов стронция монослой липопротеиновых комплексов устойчивы, тогда как при большем давлении эти комплексы распадаются и продукты гидролиза растворяются в субфазе. При низких давлениях в монослоях скорость гидролиза фосфолипидов определяется скоростью распада липопротеиновых комплексов, так же как и при действии фосфолипазы на монослой, сформированные из липидов с короткими углеводородными цепями. При высоких давлениях скоростью лимитирующей стадией является проникновение фосфолипазы в монослой. Энергия активации распада комплексов фермента с фосфолипидом существенно снижается в присутствии ионов кальция и возрастает при их замене на ионы стронция. Ионы кальция не являются необходимыми для гидролиза фосфолипидов, так как в бескальциевой среде или в присутствии ионов стронция гидролиз также происходит, хотя при более высоких значениях двумерного давления.

Предполагаемый механизм взаимодействия фосфолипазы A_2 с организованной поверхностью фосфолипидов может быть частным случаем связывания мембранных белков с фосфолипидными компонентами биологических мембран.

Авторы выражают благодарность руководителю настоящей работы акад. Ю. А. Овчинникову за обсуждение результатов и критические замечания.

Экспериментальная часть

Фосфолипазу A_2 (изофермент E_3) выделяли из яда кобры *Naja naja oxiana* по методике, описанной ранее [13], яичный лецитин — по методу [14]. Лизолецитин получали гидролизом яичного лецитина фосфолипазой A_2 с последующей очисткой ТСХ на силикагеле [14]. Трис-хлорид (Koch Light, США) перед использованием перекристаллизовывали из этанола.

Белковые, фосфолипидные и липопротеиновые монослои получали на поверхности водных растворов электролитов в стеклянной кювете Ленгмюра размером 390×140×13 мм (объем раствора 700 мл).

Монослои фосфолипазы формировали двумя способами: введением раствора (1 мг/мл) фермента в объем так, что исключалось прямое попадание молекул белка на поверхность, либо нанесением павески фермента непосредственно на границу раздела фаз вода — воздух. В первом случае монослой образовывались в результате адсорбции белка из субфазы, а во втором — вследствие его растворения на поверхности.

Липидные монослои получали последовательным нанесением по 0,03 мл раствора фосфолипида или лизолецитина в *n*-гексане (0,1 мг/мл) непосредственно на границу раздела фаз вплоть до достижения заданной плотности молекул в монослое. Липопротеиновые монослои получали введением раствора белка в субфазу под монослой липида.

Детали исследования монослоев липидов, белков и липопротеиновых комплексов описаны в работах [4, 5].

ЛИТЕРАТУРА

1. de Araujo S. P., Rosseneu M. Y., Kremer G. M. M., van Zoelen E. I. I., de Haas G. H. Structure and thermodynamic properties of complexes between phospholipase A₂ and lipid micelles.— *Biochemistry*, 1979, v. 18, № 4, p. 580–586.
2. Verger R., Mieras M. C. E., de Haas G. H. Action of phospholipase A at interface.— *J. Biol. Chem.*, 1973, v. 218, № 11, p. 4023–4034.
3. Verger R., Rietsch I., Van-Dam-Mieras M. C. E., de Haas G. H. Comparative studies of lipase and phospholipase A₂ acting on substrate monolayers.— *J. Biol. Chem.*, 1966, v. 251, № 10, p. 1328–1333.
4. Colacicco G., Rapport M. M. Lipid monolayers: action of phospholipase A of *Crotalus atrox* and *Naja naja* venoms on phosphatidyl choline and phosphatidyl choline.— *J. Lipid Res.*, 1966, v. 7, № 2, p. 258–263.
5. Shah D. O., Shulman J. H. Enzymic hydrolysis of various lecithin monolayers employing surface pressure and potential technique.— *J. Coll. Interf. Sci.*, 1967, v. 25, № 1, p. 107–119.
6. Yerheij H. M., Egmond M. R., de Haas G. H. Chemical modification of the amino group in snake venom phospholipases A₂. A comparison of the interaction of pancreatic and venom phospholipases with lipid-water interfaces.— *Biochemistry*, 1981, v. 20, № 1, p. 94–99.
7. Мальцев В. Г., Зимина Т. М., Куренбин О. И., Бельский Б. Г., Александров С. Л., Павлова Н. П., Дьяков В. Л., Антонов В. К. Микрохроматографическое исследование кинетики равновесия и ассоциации фосфолипазы A₂ из яда среднеазиатской кобры.— *Биоорг. химия*, 1979, т. 5, № 11, с. 1710–1719.
8. Желковский А. М., Ансалон У. Р., Дьяков В. Л., Гиноман Л. М., Мирошников А. И., Антонов В. К. Карбоксильная группа в активном центре фосфолипазы A₂ из яда кобры *Naja naja oxiana*.— *Биоорг. химия*, 1977, т. 3, № 10, с. 1430–1431.
9. Желковский А. М., Дьяков В. Л., Гиноман Л. М., Антонов В. К. Активный центр фосфолипазы A₂ из яда среднеазиатской кобры. Каталитически активная карбоксильная группа.— *Биоорг. химия*, 1978, т. 4, № 12, с. 1665–1672.
10. Суханов В. А., Оханов В. В., Швец В. И., Мирошников А. И. Взаимодействие фосфолипазы из яда кобры со сплин-мечеными фосфолипидами.— *Молекулярн. биология*, 1980, т. 14, № 3, с. 606–614.
11. Суханов В. А., Сидоров О. Ю., Оханов В. В., Башарули В. А., Швец В. В., Мирошников А. И. Изучение взаимодействия фосфолипазы A₂ из яда кобры с организованными поверхностями фосфолипидов методом спиновых зондов.— *Молекулярн. биология*, 1981, т. 15, № 1, с. 139–144.
12. Dijkstra B. W., Drenth I., Kalk K. H., Vandermaeten I. Three-dimensional structure and disulfide bonds connections in bovine pancreatic phospholipase A₂.— *J. Mol. Biol.*, 1978, v. 124, № 1, p. 53–60.
13. Ансалон У. Р., Шамборант О. Г., Мирошников А. И. Выделение и некоторые свойства фосфолипазы A₂ из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana*.— *Биоорг. химия*, 1977, т. 3, № 10, с. 1353–1359.
14. Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов. М.: Мир, 1975, с. 257–286.

Поступила в редакцию
19.V.1981

PHOSPHOLIPASE A₂ FROM THE COBRA VENOM. SUFACTANT ACTIVITY
AND INTERACTION WITH PHOSPHOLIPID MONOLAYERS

KSENZHEK O. S., GEVOD V. S., AIANYAN A. E., MIROSHNIKOV A. I.

*Chemistry and Technology Institute, Dnepropetrovsk; M. M. Shemyakin
Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

A mechanism was suggested for the hydrolysis of structured lipids catalyzed by the cobra venom phospholipase A₂. Its essential feature is implication of a dimeric enzyme form in the elementary act. The role of a «stepping motion» in the dimer functioning is discussed with respect to enabling a high rate of hydrolysis. The Ca²⁺ ions were found to decrease the activation energy for the enzyme-substrate complex dissociation, while being nonessential for the hydrolysis of phospholipids. The hydrolysis took place at higher values of surface tension in the presence of strontium ions.
