Биолог. ж. Армении, № 6 (42) 1989 УДК 577.153.2.02

ПОЛУЧЕНИЕ ДИМЕРНЫХ ФОРМ ФОСФОЛИПАЗ И КОНЪЮГАТОВ ФОСФОЛИПАЗЫ A_2 С ПЕРОКСИДАЗОЙ ИЗ ХРЕНА

А. Е. АПАНЯН

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Описано применение водорастворимых имидоэфиров ДМА и ДМС для ковалентного сшивания молекул фосфолипазы A_2. Эти же реагенты использованы для конъюгирования фосфолипазы A_2 с пероксидазой из хрена. Исследовано влияние присутствующих в реакционной среде молекул фосфолипидов, ионов Ca^{2+}, различных избытков реагентов, а также разных pH на процесс димеризации молекул фермента.

Նկարագրված է ջրում լուծելի իմիդոեթերների՝ ԴՄԱ և ԴՄՍ կիրառումը A_2 ֆոսֆոլիպազի մոլեկուլների կովալենտ կապակցման համար։ Նույն ռեագենտները օգտագործված են A_2 ֆոսֆոլիպազի կոնյուգացման համար ծովաբողկի գերօքսիդազի հետ։ Հետազոտված է ռեակցիայի միջավայրում ֆոսֆոլիպիդների մոլեկուլների առկայության, Ca^{2+}-իոնների, ռեագենտի տարբեր քանակի ավելցուկների, ինչպես նաև միջավայրի գանազան pH-ների ազդեցությունը ֆերմենտի մոլեկուլների դիմերացման վրա։

Use of water—soluble imidoethers DMA and DMC for covalent combination of molecules of phospholipase A_2 is described. These reagents have been used to conjugate phospholipase A_2 with horse—radish peroxidase. The influence of presence in reaction media of phospholipid molecules, Ca^{2+} ions, different redundants of reagents and different *pH* on process of dimerization of the enzyme molecules is investigated.

Фосфолипаза A_2—фосфоглицериды—яд змеи—пероксидаза из хрена—конъюгат.

Фосфолипаза A_2—гидролитический фермент, катализирующий расщепление сложноэфирной связи высших жирных кислот во 2-м положении 1,2-диацил-sn-фосфоглицеридов.

Ранее нами было показано, что блокирование только ε-аминогрупп остатков лизина молекулы фосфолипазы A_2 из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana* ангидридом уксусной кислоты практически не влияет на способность фермента к гидролизу фосфолипидов [1]. Это обстоятельство дало нам возможность более широко изучить некоторые свойства фосфолипазы A_2 методом химической модификации, а именно химического сшивания белковых молекул.

В качестве ковалентно сшивающих агентов нами были применены бифункциональные реагенты различной длины алкильной цепи молекулы—водорастворимые имидоэфиры ДМА и ДМС, имеющие структуру

$$H_3C-O-C-(CH_2)_n-C-O-CH_3$$

n=4—диметиладипимидат

n=6—диметилсуберимидат

Сокращения: ДМА—диметиладипимидат, ДМС—диметилсуберимидат, ТНБС—тринитробензолсульфокислота, МПКП—миниатюрный потенциал конечной пластинки.

Выбор бифункциональных имидоэфиров в качестве модифицирующих агентов оправдан тем, что они хорошо растворяются в воде, высокоспецифично и избирательно взаимодействуют только с аминогруппами белковых молекул, образуя с ними ковалентные связи в сравнительно мягких условиях, и, что очень важно, в результате такой модификации не меняется общий заряд белковой глобулы [12].

Материал и методика. Фосфолипаза A_2 (изофермент ЕЗ) из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana* была выделена и очищена по методу [2]. Использовали сефадексы G-75sf (Pharmacia, Швеция), ДМА, ДМС (Serva, ФРГ), 2, 4, 6-ТНБС (Sigma, США). Яичный лецитин получали из яичных желтков по известной методике [15].

Ферментативную активность фосфолипазы A_2 определяли ранее предложенным ацидометрическим методом [13]. Измерения проводили на автотитраторе TTT2 (Radiometer, Дания) при 37° в 10^{-1} М Трис-HCl буфере (pH 8), содержащем 0,5% детергента Triton X-100, 0,03 М NaCl, 0,02 М $CaCl_2$ и 0,7 мМ ЭДТА.

К 2 мл среды добавляли 2 мг дипальмитоиллецитина в 50 мкл этанола, затем вносили 1 мкг фермента в 10 мкл воде. За единицу активности было принято количество фермента, которое вызывает в системе падение pH на 0,1 единицу за 3 мин.

Фосфолипазную активность на липидных монослоях измеряли с помощью известной монослойной техники [2, 5].

Ферментативную активность пероксидазы из хрена определяли по начальной скорости окисления о-дианизидина перекисью водорода [6]. Использовали 2,3 мл 0,01 М Na-фосфатный буфер в 0,1 М KNO_3 (pH 7,0), 0,07 мл 2,6 мМ раствора о-дианизидина в 96%-ном спирте, 0,07 мл, 10 мМ раствора H_2O_2 и 0,05 мл раствора фермента концентрации 2,5—10 мМ. Увеличение оптической плотности при 460 нм после перемешивания реагентов регистрировали на приборе Specord UV-VIS (ГДР). За меру активности фермента принимали количество микромолей субстрата, окисленного за 1 с, таким количеством нативного или конъюгированного фермента, в котором содержится 1 мкмоль гемина.

Для быстрого определения свободных аминогрупп белка реакцию с 2, 4, 6-ТНБС проводили в 0,1 М боратном буфере (pH 9,5). На раствор белка с концентрацией 0,1 мг/мл добавляли 10 мкл 1,1 М водного раствора реагента. Реакцию останавливали через 15 мин и измеряли поглощение при длине волны $\lambda = 420$ нм ($E_{\varepsilon-NH_2} = 22000\ M^{-1}\,см^{-1}$, $E_{\varepsilon-NH_2} = 10202\ M^{-1}\,см^{-1}$ [8].

N-концевые аминокислоты определяли в виде дансильных производных [9].

Аминокислотный состав белков устанавливали на автоматическом анализаторе D-500 (Durrum, США) после 24 ч гидролиза в 6 N HCl.

Гель-фильтрацию на сефадексе G-75 sf проводили в 0,05 М аммонийацетатном буфере (pH 7) на колонке (1,5×90 см) со скоростью 5 мл/час.

Сшивание двух молекул фосфолипазы A_2 бифункциональными реагентами осуществляли в 0,05 М боратном (pH 9,5) буфере или 0,05 М фосфатном буфере (pH 8,5) при концентрации белка 1 мг/мл, в присутствии 10^{-1} М $CaCl_2$ или 1 мг/мл лизолецитина. К раствору белка добавляли 10 мкм реагента (ДМА или ДМС). Через 2 ч реакцию останавливали и после быстрого обессоливания смеси на колонке (1,5×30 см) с сефадексом G-25 белок лиофилизовали.

При проведении реакции конъюгирования фосфолипазы A_2 с пероксидазой из хрена были взяты следующие соотношения компонентов: 10 мг фосфолипаза A_2 5 мг пероксидазы.

Результаты и обсуждение. Известно, что большинство фосфолипаз A_2 змеиных ядов стабильны, либо в концентрированных растворах белка находятся в форме димера [10]. С другой стороны, известно также, что из присутствующих в исходном яде нескольких изоферментов одни, например, образуют димеры при pH 7,5, а другие—их не образуют [11], причем димеробразующие фосфолипазы в основном кислые, а не димеризующиеся—щелочные.

Для α- и β-форм фосфолипазы A_2 из яда змей Grotalus adamanteus известно, что образование активных димерных форм в результате реассоциации диссоциированных идентичных мономеров приводит к экспозиции одного лизинового остатка на димер [14]. В отношении фосфолипазы A_2 из яда среднеазиатской кобры Naja naja oxiana установлено, что при молярных концентрациях выше 5×10^{-5} М белковая молекула в катализе участвует в виде димера [3, 5]. Этот факт подтверждается модификацией п-бромфенацилбромидом единственного остатка His, входящего в активный центр фермента. При указанных концентрациях, по данным аминокислотного анализа фермента, модифицируется 0,5 моль His на молекулу белка, а ферментативная активность падает до 1% от нативной [1, 3]. Эти данные дополняются результатами исследований на липидных монослоях и даже сделана попытка предложить рабочую модель димерной фосфолипазной молекулы [5].

С целью получения химического подтверждения димерной рабочей модели фосфолипаз мы и применяли ковалентное сшивание двух молекул фосфолипазы A_2 из яда кобры водорастворимыми имидоэфирами различной длины молекулы.

Сшивание проводили в боратном (pH 8,5) или фосфатном (pH 9,5) буферах при различных концентрациях фосфолипазы A_2 ($<5\times10^{-3}$ М$<$) в условиях различных избытков реагента (до 10 мкмоль).

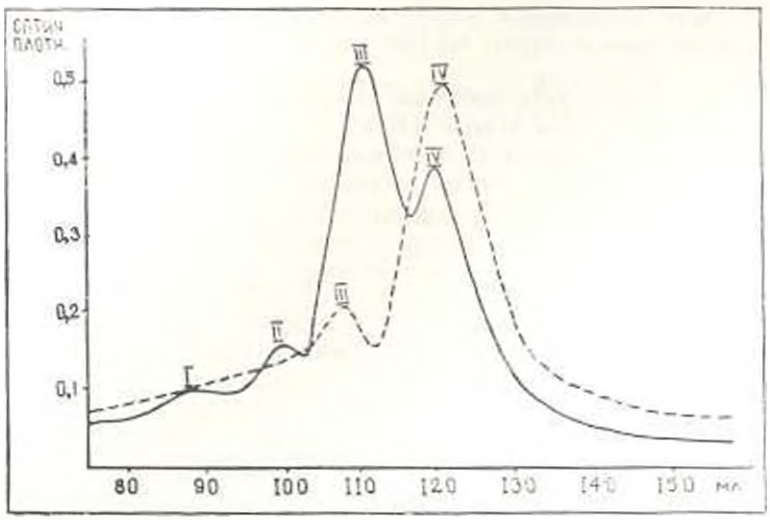

Рис. 1. Разделение ковалентно сшитых олигомеров фосфолипазы A_2 из яда змеи на колонке с сефадексом G-75 сверхтонкий. Условия реакции: 10 мг/мл белка + 1 мг ДМА (———), или 10 мг/мл белка + 1 мг ДМС (——— pH 8,5; I—тетрамер, II—тример, III—димер, IV—мономер фосфолипазы A_2.

Исследовано также влияние присутствующих в реакционной среде молекул фосфолипидов (1 мг/мл) и ионов Ca^{2+} (до 10^{-3} М) на процесс димеризации белковой молекулы фермента (рис. 1, 2, 3).

В отдельных экспериментах было применено как одновременное,

так и последовательное или попарное добавление компонентов в реакционную среду.

Как видно из приведенных рисунков, в идентичных условиях применение диметилсуберимидата больше способствует образованию ковалентно сшитых димеров, причем вместе с димерами образуются также тримеры и тетрамеры фосфолипаз A_2 (рис. 1). Увеличение pH среды на одну единицу особенно влияет на выход и направление реакции (рис. 2). Присутствие в реакционной среде молекул липидов спо-

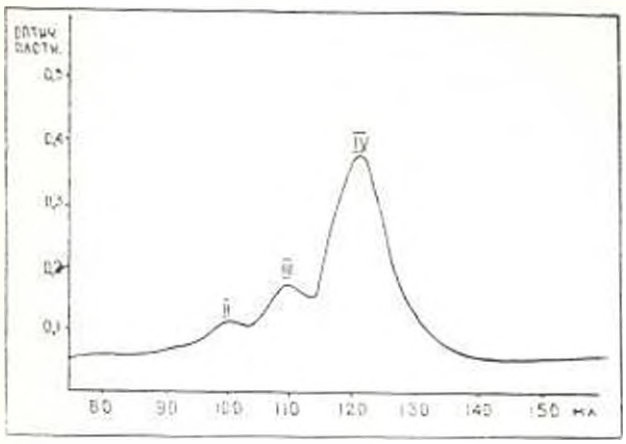

Рис. 2. То же (см. рис. 1), условия реакции: 10 мг/мл белка+0,65 мг ДМС, pH 9.5, 1 час

собствует димеризации белковых молекул, особенно при одновременном присутствии также ионов Ca^{2+} в растворе. Однако только наличие ионов Ca^{2+} в среде практически не способствует этому процессу (рис. 3).

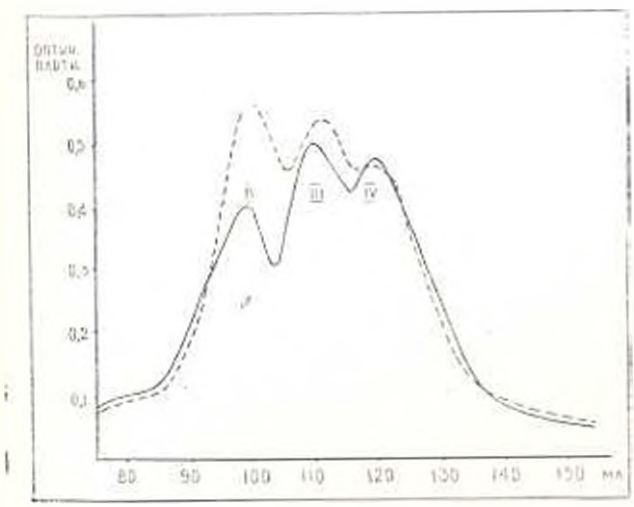

Рис. 3. То же, (см. рис. 1), условия реакции: 10 мг/мл белка+0,65 мг ДМС, pH 8.5, в присутствии 1 мг/мл лизолецитина (——) или 1 мг/мл лизолецитина с 0,1 мг $CaCl_2$ (— — —).

Разделение ковалентно сшитых димеров от высших олигомеров, а также других реакционных смесей осуществляли с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-75 sf. Ферментативную активность выделенных димеров, а также олигомеров измеряли как ацидометрическим титрованием в отношении мицеллярных фосфолипидов, так и с помощью монослойной техники [2, 5].

Оказалось, что ковалентно сшитые димеры сравнительно малоактивны (80—90%) по сравнению с нативной формой фосфолипазы A_2. Причем при инкубации с субстратом их активность проявляется не сразу, а с некоторой задержкой, слегка нарушая прямолинейность ацидометрического титрования. Рассматривая процесс гидролиза фосфолипидов с точки зрения предложенной ранее димерной модели на основе монослойной техники, можно полагать, что, по-видимому, образованная ковалентная сшивка двух молекул фосфолипазы A_2 жесткая и мешает гибкому и свободному движению молекул белка в димерной структуре фермента тогда, когда они должны быстро диссоциировать, чтобы после гидролиза субстрата снова реассоциировать уже с другой единицей во вновь образовавшемся димере.

Число свободных аминогрупп белка, не участвующих в ковалентном связывании с реагентом, вычисляли путем измерения поглощения при $\lambda = 420$ нм, после их модификации 2,4,6-ТНБС в щелочной среде

$$(\varepsilon_{[illegible]} = 22\,0 [illegible]\ см^{-1},\ \varepsilon_{NH_2} = 1\,2 [illegible]\ М^{-1} см^{-1}).$$

N-концевым анализом ковалентно сшитых препаратов доказано, что α-аминогруппы белковых молекул свободны и не вовлечены в связывание. На основании аминокислотного анализа сшитых форм фермента, а также с помощью метода 2,4,6-ТНБС найдено, что в ковалентном связывании участвуют 2 остатка Lys на молекулу димера фосфолипазы A_2.

К настоящему времени ряд авторов показали, что фосфолипазы A_2 из различных ядов змей обладают пресинаптической активностью— способностью нарушать процесс освобождения медиатора из двигательных нервных окончаний.

С целью выяснения механизма подобного действия и выявления роли ферментативной активности белковой молекулы в пресинаптическом эффекте фосфолипазу A_2 из яда кобры N. n. oxiana конъюгировали с пероксидазой из хрена (М. м. 40000 Да). Последняя, как известно, является удобной меткой в гистохимических исследованиях и имеет соизмеримый с фосфолипазой A_2 (М. м. 13500 Да) молекулярный вес.

Помимо уже предложенных и известных методов для конъюгирования разных молекул белковой природы [7] применено сшивание двух белковых молекул с помощью ДМА и ДМС. В обоих случаях сшивание проведено в идентичных условиях, и выход реакции почти не обусловлен предпочтением какого-либо реагента.

Как видно из рис. 4, ковалентно сшитые конъюгаты (1:1) удается успешно разделить с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-75 sf. Выделенный конъюгат сохраняет ~50% фосфолипазной активности и ~40% пероксидазной активности. Последнюю измеряли по методу

изменения начальной скорости окисления о-дианизидина перекисью водорода в фосфатном буфере (pH 7,0) [6].

Известная в литературе методика определения активности пероксидазы на примере окисления пирогаллола в нашем случае не дала хорошей корреляции, а преимущество предложенного чувствительного метода было очевидно.

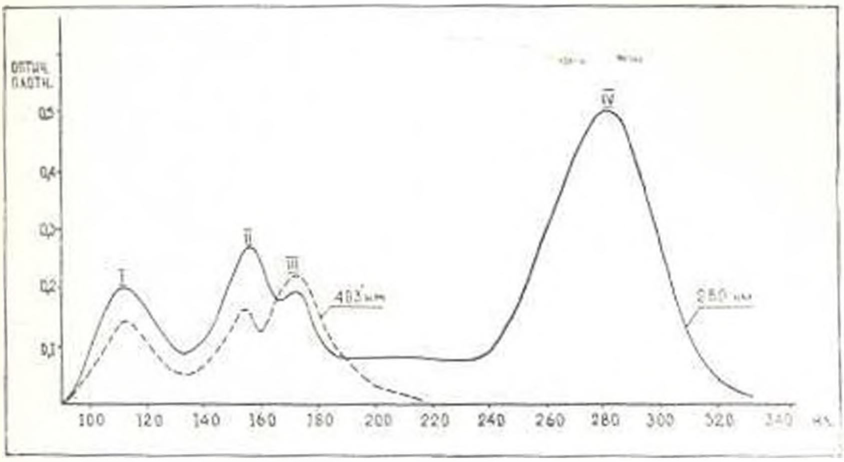

Рис. 1. Разделение конъюгата пероксидазы с фосфолипазой A_2 яда кобры на колонке с сефадексом G-75 сверхтонким (———) поглощение белка при 280 нм, (— — —) поглощение пероксидазы при 403 нм; I—олигомерный конъюгат пероксидазы с фосфолипазой A_2, II—конъюгат с молярным соотношением пероксидаза:фосфолипаза A_2=1:1, III—пероксидаза, IV—фосфолипаза A_2.

Исследование влияния конъюгата фосфолипазы A_2 с пероксидазой из хрена на частоту МПКП, проведенное при различных добавках конъюгата при 30° показало, что со снижением ферментативной активности конъюгированной фосфолипазы существенно снижается ее нейротоксическая активность. Установлено, что конъюгат необратимо связывается с пресинаптическими структурами и препятствует действию нативной фосфолипазы A_2, хотя пресинаптическая активность фосфолипазы A_2, конъюгированной с пероксидазой из хрена, сравнительно меньше активности нативной фосфорилазы A_2 [4].

ЛИТЕРАТУРА

1. *Апсалон У. Р., Айанян А. Е., Мещерякова Е. А., Сурина Е. А., Мирошников А. И., Готгильф И. М., Магазаник Л. Г.* Биоорган. химия, 6, 7, 1068—1077, 1980.
2. *Апсалон У. Р., Шамборант О. Г., Мирошников А. И.* Биоорган. химия, 3, 11, 1553—1559, 1977.
3. *Желковский А. М., Дьяков В. Л., Гинодман Л. М., Антонов В. К.* Биоорган. химия, 4, 12, 1665—1672, 1978.
4. *Каменская М. А., Коношевская М. В., Мартынова Е. Р., Мирошниченко М. Л., Айанян А. Е., Грицук В. И., Мирошников А. И.* ДАН СССР, 259, 5, 1271—1274, 1981.
5. *Ксенжек О. С., Гевод В. С., Айанян А. Е., Мирошников А. И.* Биоорган. химия, 7, 11, 1680—1686, 1981.
6. *Лебедева О. В., Угарова Н. Н., Березин И. В.* Биохимия, 42, 8, 1372—1379, 1977.

7. *Avrameas S.* In: Bull. Soc. Chim. Biol., 50, 1169, 1968.
8. *Fields R.* In: Methods in Enzymol., 25 (B), 464–468, Acad. Press. New—York—San—Francisco—London, 1972.
9. *Gray W. R.* In: Methods in Enzymol., 11, 139–151, Acad. Press., New-York—London, 1967.
10. *Ishimaru K., Kihara H., Ohno M.* J. Biochem., 88, 2, 443–451, 1980.
11. *Maraganore J. M., Heinrikson R. L.* J. Biol. Chem., 259, 22, 13839–13843, 1984.
12. *Roberts M. F., Deems R. A., Dennis E. A.* Proc. Nat. Acad. Sci., 74, 5, 1950–1954, 1977.
13. *Saluch J. J., Turini P., Seng R., Haeber J., Singer T. P.* J. Biol. Chem., 246, 2, 331–339, 1971.
14. *Wells M. A.* Biochemistry, 12, 6, 1086–1093, 1973.
15. *Wells M. A., Hanahan D. J.* In: Methods in Enzymol., 14, 179–181, Acad. Press., New—York-London, 1969.

Поступило 26.IV.1988

Биолог. ж. Армении, № 6 (42) 1989 УДК 577.352.5+577.151

МОДУЛЯЦИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЦИКЛАЗНЫХ СИСТЕМ К АЦЕТИЛХОЛИНУ ФОСФОЛИПАЗОЙ A_2

Д. М. МАРТИРОСЯН, С. С. ЛАДАЛИН, И. С. БАКУНЦ, Г. С. МАНТАРЯН, С. Н. АПРАПЕТЯН

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР, Ереван

Показано, что фосфолипаза A_2 увеличивает внутриклеточное содержание цАМФ и цГМФ и модулирует влияние ацетилхолина на систему циклических нуклеотидов.

Ցույց է տրված, որ A_2 ֆոսֆոլիպազը մեծացնում է ներբջջային ցԱՄՖ և ցԳՄՖ քանակը և վերափոխում ացետիլխոլինի ազդեցությանը տիպիկ նուկլեոտիդների համակարգի վրա։

It is shown that phospholipase A_2 increases the intracellular concentration of both cAMP and cGMP and modulates the acetylcholine influence on the cyclic nucleotides system.

Фосфолипаза A_2—циклические нуклеотиды—ацетилхолин.

Данные о влиянии ацетилхолина на внутриклеточное содержание циклических нуклеотидов противоречивы. Так, АХ увеличивал содержание цГМФ в синаптических ганглиях быка [8], но в нейрональных ганглиях виноградной улитки несколько снижал его [1]. Было показано также, что АХ ингибирует аденилатциклазу сердечной мышцы и печени [10], однако в срезах мозгового вещества надпочечника быка он стимулировал аккумуляцию цАМФ, не влияя на активность аденилатциклазы [4].

Известно, что фосфолипаза A_2 (ФЛ A_2) оказывает влияние на внутриклеточный уровень цГМФ [9], а также может модулировать ионную проводимость и АХ-чувствительность нервных клеток [3, 7].

Сокращения: ФЛ A_2—фосфолипаза A_2; ДК—деацилированная кислота.