

УДК 577.112

ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНАЯ ФОСФОЛИПАЗА A_2
 ИЗ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА.
 ОЧИСТКА И НЕКОТОРЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

АПАНЯН А. Е.

Институт биохимии им. Г. Х. Бунятына НАН Армении, Ереван

Серое вещество мозга быка содержит растворимую высокомолекулярную форму фосфолипазы A_2 . Разработана методика ее выделения и очистки, включающая гель-фильтрацию, гидрофобную, ионообменную и аффинную колоночные хроматографии. По данным ПААГ, электрофорез с ДДС-Na является Ca^{2+} -зависимым, фермент имеет M_r около 100 кД, гидролизует фосфолипиды предпочтительно с остатком арахидоновой кислоты в *sn* 2-положении, действует при pH 8,5, концентрации ионов металла 10 мМ в *in vitro* измерениях, в условиях, способствующих выявлению гидролитической активности.

Внутриклеточные фосфолипазы A_2 стали в настоящее время объектом широкого исследования, поскольку в весьма низких концентрациях они вовлекаются в ключевые клеточные процессы, регулируя образование арахидонатов и в последующем синтез простагландинов, тромбоксанов и лейкотриенов [1]. В ЦНС указанные эйкозаноиды в физиологических условиях играют роль нейромодуляторов, регуляторов температуры тела, цикла сна, нейросекреции гормонов, процессов восприятия и сознания. Внутриклеточные фосфолипазы A_2 как медиаторы функционируют при агрегации тромбоцитов, митогенезе лимфоцитов, хемотаксисе лейкоцитов, высвобождении гистамина. В патологии (ишемия, гипоксия, конвульсия) тоническое высвобождение арахидоновой кислоты также происходит через систему активации фосфолипазы A_2 . Однако комплексная природа регуляции, а также физиологические механизмы внутриклеточных фосфолипаз A_2 как в мозгу, так и в других тканях до сих пор остаются недостаточно выясненными. К настоящему времени известно существование ряда изоферментов внутриклеточных иммунологически неидентичных фосфолипаз A_2 , отличающихся от секреторных фосфолипаз A_2 , но в целом относящихся к категории Ca^{2+} -зависимых и гормонально регулируемых ферментов, принимающих активное участие в увеличении уровня внутриклеточных ионов кальция [2—4].

Ранее нами сообщалось о выделении и очистке фосфолипазы A_2 с M_r 14 кД из мозга крупного рогатого скота [5]. Настоящая работа посвящена выделению высокомолекулярной Ca^{2+} -зависимой

фосфолипазы A_2 из мозга быка, а также изучению ее некоторых физико-химических свойств.

Материалы и методы

Мозг быка брали сразу после забоя и помещали на лед.

Использовали сефадексы и фенил-сефарозу фирмы «Pharmacia» (Швеция), ионообменники и хроматографические колонки фирмы «Whatman» (Англия) и отечественного производства, аффинный сорбент на основе аминокстекла, аппарат для ультрафильтрации («Amicon», США), диспергатор ультразвуковой УЗДН-2Т (СССР), установку для колоночной хроматографии («ЛКВ», Швеция). Тонкослойный электрофорез выделенных белков проводили на аппарате фирмы «ЛКВ» (Швеция), а диск-электрофорез в трубке—на аппарате фирмы «Reanal» (Венгрия). Измерение ферментативной активности осуществляли на автитраторе ТТТ-2 («Radiometer», Дания). Все процедуры проводили при 4°.

25 (50) г свежего мозга гомогенизировали в 75 мл (150 мл) 10 мМ аммоний-ацетатного буфера, рН 7,2, содержащего 0,15 М NaCl, 0,25 М сахарозу и 1 мМ ЭДТА. Для удаления ядер гомогенат центрифугировали при 1000 g 15 мин, надосадочную жидкость подвергали воздействию ультразвука при 22 кГц в течение 0,5—2,0 мин, затем центрифугировали при 90000 g 1 ч, надосадочный раствор желто-коричневого цвета анализа против дистиллированной воды не использовали как источник фосфолипазы A_2 . Первую стадию его хроматографической очистки или ионофилизованного порошка проводили на колонке с сефадексом G-75 sl (1,2 × 140 см), уравновешенным 10 мМ ацетатным буфером, содержащим 0,15 М NaCl, рН 7,2 (рис. 1). Объем каждой фракции в 2 мл отбирали для измерения ферментативной активности в присутствии 0—20 мМ $CaCl_2$ при скорости элюции 6 мл/ч.

Фракцию с фосфолипазной активностью далее концентрировали до 2—3 мл и наносили на колонку с фенил-сефарозой (2,0 × 10 см), в 10 мМ ацетатном буфере, содержащем 5—10 мМ $CaCl_2$, рН 7,2. Как показано на рис. 2, после вымывания стартовым буфером несвязавшихся на колонке белков, адсорбированные белки с фосфолипазной активностью промывали буфером, не содержащим Ca^{2+} (в буфер добавляли 5—10 мМ ЭДТА), а фракции собирали по 3 мл.

Элюат с фосфолипазной липолитической активностью после анализа против дистиллированной воды и концентрирования наполнили на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой, уравновешенной тем же 10 мМ ацетатным буфером (1,5 × 12 см), рН 7,6. Связанные на колонке белки промывали в градиенте ионной силы NaCl от 0 до 0,4 М (2 × 300 мл) со скоростью 20 мл/ч. Все фракции проверяли на фосфолипазную активность.

Последнюю стадию очистки проводили биоаффинной хроматографией на сорбенте, состоящем из липид—лиганда, ковалентно сшитого с амино-стеклом, с использованием колонки размером 1,0 ×

12 см. Условия опыта соблюдались те же, что и при хроматографии на фенол-сефарозе. Осаждение белков на колонке проводили в стартовом ацетатном буфере, содержащем Ca^{2+} . Промывание фосфолипазной активности осуществляли тем же буфером в отсутствие Ca^{2+} .

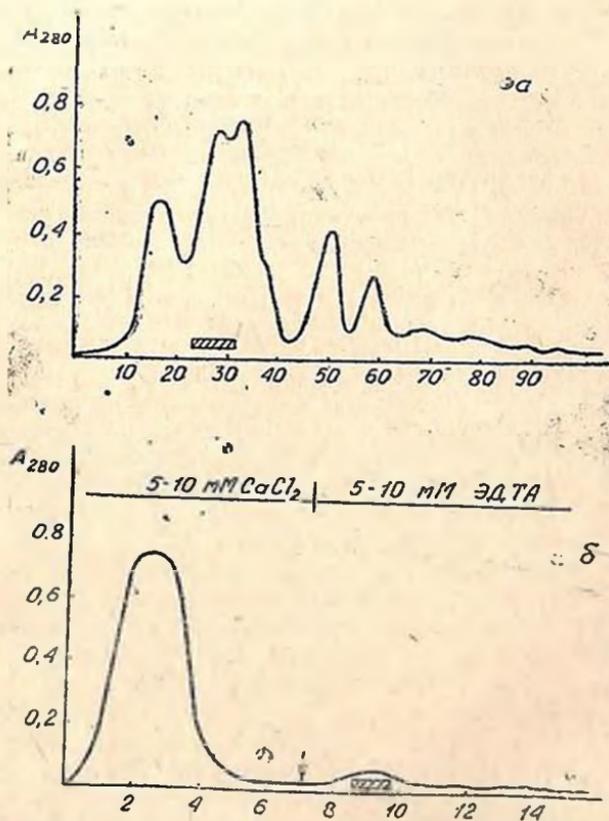


Рис. а. Разделение белковой смеси гомогената мозга животного на колонке с сефардексом G-75 сверхтонкий в 10 мМ аммонийацетатном буфере, содержащем 0,15 м NaCl, pH 7,2. Отмечен пик с фосфолипазной активностью. б. Разделение фракции с фосфолипазной активностью после гель-фильтрации на колонке с фенол-сефарозой, уравновешенной в 10 мМ ацетатном буфере, содержащем 5—10 мМ CaCl_2 , pH 7,2. Фосфолипазная активность элюировалась тем же буфером, но содержащим 5—10 мМ ЭДТА

Фосфолипазную активность на всех стадиях очистки определяли ранее описанным методом ацидометрического титрования [7] с некоторыми изменениями. Реакционная среда содержала 10 мМ Трис, 0,05 М NaCl, 5—20 мМ CaCl_2 , 0,5 мМ ЭДТА, 0,5% детергента тригон X-100, pH 8—8. В качестве субстрата использовали дипальмитонилфосфатидилхолин или 1-пальмитонил-2-арахидонилфосфатидил-

хояли. В инкубационную смесь вносили 1—100 мкг фермента или фракцию с фосфолипазной активностью. Гидролиз проводили при 37°. В отдельных экспериментах по исследованию металлозависимости фосфолипазы A_2 Ca^{2+} были заменены Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} в виде их хлорпроизводных.

Электрофорез в присутствии 0,1% ДДС-Na проводили на пластинках ПААГ (10—20%) согласно известной методике [8]. Индивидуальность белка проверяли с помощью стандартного диск-электрофореза в 15%-ном ПААГ [9].

В измерениях по pH-зависимости ферментативной активности использовали следующие буферные системы: ацетат—Na/уксусная кислота, pH 4,0—6,0, какодлат—Na/HCl, pH 6,0—7,5, трис/HCl, pH 7,5—9,0, глицин/NaOH, pH 9,0—10.

Для определения N-концевого аминокислотного остатка был применен общеизвестный метод данилирования [10].

Результаты и обсуждение

В качестве источника фермента использовали гомогенаты свежего, а в отдельных опытах—замороженного мозга. Было установлено, что при замораживании в течение 1—2 месяцев фосфолипазная активность в сером веществе почти полностью сохраняется (80—90% от исходной активности). После обработки ультразвуком в течение 1 мин, последующих процедур центрифугирования и диализа концентрат или лиофилизированный порошок надосадочной жидкости подвергали хроматографической очистке.

Как видно из рисунка, при хроматографии белков сульфатамта гомогената мозга на колонке с сепадексом G-75sf (сверхтонкий) основной белковый пик, соответствующий смеси с M_r 60—70 кД, проявлял фосфолипазную активность в присутствии 5—10 мМ Ca^{2+} (45—65 мл). В отсутствие ионов кальция ферментативная активность этой фракции не проявлялась. После гель-фильтрации выход белка по липолитической активности составлял в среднем около 60—70% от исходной в гомогенате. При фракционировании сырого тканевого экстракта с помощью гель-хроматографии, особенно в присутствии NaCl в буферной системе, в разных случаях было обнаружено неодинаковое экспонирование фосфолипазной активности.

Например, M_r этой фракции соответствовала то 60, то ≥ 70 кД.

Дальнейшее фракционирование белковой смеси с фосфолипазной активностью осуществляли с помощью гидрофобной хроматографии на фенил-сефарозе (рис. б). Белки, адсорбированные на колонке, содержащие благодаря их Ca^{2+} -зависимости около 85% от исходной ферментативной активности, промывали стартовым буфером, не содержащим Ca^{2+} . Выход активности по завершении этой стадии хроматографии составлял приблизительно 70—75% от исходной.

Диализованную и концентрированную без потерь белковую смесь далее подвергали ИОХ на ДЭАЭ-целлюлозе в ацетатном буфере, pH 7,6. Примерно 80% стартовой фосфолипазной активности удерж-

живалось на колонке. Элюирование связавшихся на колонке белков проводили с помощью линейного градиента 600 мл раствора NaCl от 0 до 0,4 М. Вымывание пика, содержащего основную липолитическую активность, достигали при концентрации NaCl примерно 0,26 М. Оно составляло до 60% при скорости элюирования 20 мл/ч. Выявленные при этом другие минорные пики, содержащие низкую ферментативную активность, дальнейшему изучению не подвергали.

Заключительную стадию хроматографической очистки концентрированного раствора фосфолипазы A_2 осуществляли с помощью биоаффинного фракционирования. На этой стадии очистки примерно 90% фермента связывалось на колонке, а условия элюирования фосфолипазной активности и общая картина хроматографии поддерживались в тех же пределах, что и для хроматографии на фенол-сефарозе, обеспечивавшие выход исследуемого материала около 85—90%.

Для измерения ферментативной активности высокомолекулярной фосфолипазы A_2 от pH использовали 4 разные буферные системы, поочередно заменяющие друг друга при pH 4—10. Диапазон pH выделенной фосфолипазы A_2 колеблется в пределах 5—10. Максимальное проявление ферментативной активности наблюдается при щелочных значениях pH 7,5—9,5 в присутствии 10 мМ Ca^{2+} и более конкретно при pH 8,5.

Попытки определить N-концевые аминокислоты выделенной нами фосфолипазы A_2 оказались безуспешными, что мы склонны объяснить недоступностью, возможно, упакованного в глобуле N-конца белка.

Ca^{2+} -зависимость фосфолипазной активности была проверена на примере субстратов дипальмитонилфосфатидилхолина и 1-пальмитонил-2-арахидонилфосфатидилхолина. Было установлено, что при *in vitro* титровании лучшим субстратом для действия высокомолекулярной фосфолипазы A_2 служил последний из них с остатком арахидоновой кислоты. В его присутствии очищенный фермент демонстрирует более чем 3—4-кратную активность. Увеличение в реакционной среде концентрации Ca^{2+} от 100 мкМ до 20 мМ также приводило к повышению фосфолипазной активности, и ее максимальное проявление имело место при наличии в среде Ca^{2+} . Замена последних на другие двухвалентные ионы— Mg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} не приводила к выявлению сколь-нибудь заметной активности фермента.

Сравнивая методику выделения представленной в этой статье высокомолекулярной фосфолипазы A_2 с методикой ранее выделенной нами фосфолипазы A_2 с M_r 14 кД следует отметить, что в данном случае был применен более мягкий способ выделения ферментного белка, чем в предыдущей работе [5], где гомогенат подвергали более жестким формам обработки—длительному воздействию ультразвуком, 18-часовому отстаиванию и температурной обработке при 70° в течение 5—10 мин, в результате чего большинство лабильных белков необратимо инактивировалось и выпало в осадок, способствуя

тем самым очистке только высокостойкой Ca^{2+} -зависимой фосфолипазы A_2 с M_r 14 кД. Следует отметить, что электрофореграмма, наряду с основной полосой, соответствующей белку с M_r 14 кД, содержала также слабо выраженную полосу с M_r 28—29 кД, что позволяет предположить о существовании димерной структуры фосфолипазы A_2 с M_r 14 кД.

Обобщая работы по выделению и очистке фосфолипазы A_2 из мозга, можно заключить, что применение двух разных методов позволило из больших полушарий мозга животного выделить и охарактеризовать две индивидуальные формы внутриклеточной Ca^{2+} -зависимой фосфолипазы A_2 —низкомолекулярную (с M_r 14 кД) и высокомолекулярную (с M_r 100 кД). Наличие их оказалось равномерным и для растворимой фракции тромбоцитов кролика [11], где они значатся как гепаринсвязывающая и гепариннесвязывающая формы. Первая из них расположена внутри секреторных гранул в растворимом или мембраносвязанном виде. При обработке тромбоцитов активатором первая форма с M_r 14 кД высвобождается внеклеточно и не оказывает предпочтения субстрату с арахидонильным остатком. Вторая же с M_r 88 кД находится в цитоплазматической фракции тромбоцитов и гидролизует субстрат с арахидонильным остатком намного лучше, чем с линоленильным. Предполагается существование обеих форм фосфолипазы A_2 и в человеческих тромбоцитах [12].

Высокомолекулярная фосфолипаза A_2 из почек крысы, активируемая при физиологических концентрациях Ca^{2+} , при ДДС- Na электрофорезе фракционируется на две белковые полосы, соответствующие M_r 110 и 55 кД [3]. Белок с M_r 110 кД подобно фосфолипазам A_2 секреторных клеток, проявлял высокую степень У.А. и при колоночной гель-фильтрации мигрировал как гидрофобный белок. Второй же после отмывки с электрофоретических пластинок не содержал ферментативной активности в присутствии Ca^{2+} , что позволило авторам высказать предположение о дисульфид-изомеразной природе этого белка. Эти сведения дополняют ранее опубликованные данные о наличии в почке крысы наряду с фосфолипазой A_2 с M_r 14 кД и другой разновидности этого фермента, которая при гель-фильтрации проявляет себя как белок с M_r 60 кД, а при ДДС- Na электрофорезе выявляет полосу белка с M_r 110 кД [13].

Противоположная информация сообщена в работе Leslie и соавт. [14] по выделению фермента из клеток макрофага, аномально мигрирующего по колонке при гель-фильтрации, а при последующем ПААГ электрофорезе с ДДС- Na дающего основную полосу при M_r 55 кД и менее выраженную при 110 кД. Не проводя отмывки белков с геля, авторы предположительно связывают именно полосу с величиной M_r 55 кД с фосфолипазой A_2 активностью. Фосфолипаза A_2 из макрофагов мышей также является растворимой, Ca^{2+} -зависимой и высокомолекулярной, проявляющей при гель-фильтрации одинаковую с ферментом из почек крысы молекулярную массу [15]. Этого

нельзя сказать в отношении растворимой фосфолипазы A_2 тромбоцитов овцы со сходной Ca^{2+} -зависимостью при ДДС-Na электрофорезе, но выявляющей лишь полосу белка с величиной M_r 30 кД [16].

Выделенная из почек крысы высокомолекулярная фосфолипаза с M_r 110 кД, как показано, ассоциируется с микросомными мембранами Ca^{2+} -зависимым способом [13]. Полагают, что наряду с активацией фермента, гормонально регулируемое повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} может способствовать транслокации фермента и его ассоциации с мембраной. Частично очищенная цитозольная фосфолипаза A_2 с величиной M_r 100 кД из мозга крысы также ассоциируется с синантосомными мембранами Ca^{2+} -зависимым способом при 10 мкМ и 1 мМ Ca^{2+} . Эти данные однозначно подтверждают промотирующую роль Ca^{2+} в транслокации цитозольной высокомолекулярной фосфолипазы A_2 к мембранным фосфолипидам [4]. В литературе также имеются сообщения о Ca^{2+} -зависимой ассоциации фосфолипазы A_2 с мембранами клеток макрофага [17]. Полуаксимимальная ферментативная активность проявляется в присутствии 500 нМ Ca^{2+} . Некоторые другие формы внутриклеточной фосфолипазы A_2 активируются только при субмиллимолярных концентрациях Ca^{2+} [18]. В то же время активирование фосфолипазы A_2 из мозга крысы носит двухфазный характер с первым пиком активации при 1—100 мкМ Ca^{2+} и вторым—при 10 мМ Ca^{2+} [4]. Несмотря на то, что приведенные высокие концентрации Ca^{2+} не являются физиологическими (0,1—0,3 мкМ), тем не менее предполагается, что они могут привести к начальной активации фермента, которая при дальнейшем гормонально стимулированном повышении уровня внутриклеточного Ca^{2+} , по всей вероятности, может вызывать транслокацию его к мембране, поскольку этот процесс сопровождается в условиях с относительно более высокой концентрацией Ca^{2+} (активирование при 10 мМ).

Две выделенные нами формы фосфолипазы A_2 из мозга быка с величиной M_r 14 и 100 кД проявляли оптимальную ферментативную активность при содержании 10 мМ Ca^{2+} в среде. Растворимая фосфолипаза с M_r 30 кД тромбоцитов овцы проявляет сходную с ферментом из почек с M_r 110 кД (10 мМ) Ca^{2+} -зависимость. Однако эти данные недостаточны для объяснения взаимосвязи между фосфолипазами A_2 с разной молекулярной массой при выявлении их биологических функций.

На примере внеклеточной и внутриклеточной фосфолипазы A_2 кролика показано сходство в аминокислотной последовательности белковой структуры, что частично подтверждается и в отношении аминокислотной последовательности фосфолипаз A_2 кролика и крысы также из фермента тромбоцитов и асцитной жидкости. Фосфолипаза A_2 , выделенная из митохондрий печени крысы, отличается от фермента из тромбоцитов только по N-концевой аминокислоте [19]. Эти данные говорят в пользу кодирования в клетках различного типа фосфолипазы A_2 с M_r 14 кД родственным генами, хотя и многое остается не ясным по экспрессии генов, кодирующих ферменты с M_r 14 кД.

При хроматографии сыворотки кролика на КМ-сефадексе проявляются три разные фосфолипазные активности, что указывает либо на гетерогенность фермента, либо на возможную ассоциацию молекулы фосфолипазы A_2 с другими белками. При этом остается неразрешенным и вопрос о природе внутриклеточных факторов, способствующих экзоцитозу фосфолипаз A_2 . Гель-фильтрация надосадочной жидкости клеток почек крысы с фосфолипазной активностью, стимулированных в присутствии протеазных ингибиторов, показала отсутствие секреции фермента с M_r 60 кД (белок с M_r 110 кД при гель-фильтрации ведет себя как глобула с M_r 60 кД) и одновременно исключила возможность появления фосфолипазы A_2 с M_r 14 кД в результате протеолитического расщепления (процессинга) более длинной исходной молекулярной формы фермента. Эксперименты по иммуноглобулированию контрольных и стимулированных клеток подтвердили присутствие в нестимулированных клетках фосфолипазы A_2 с M_r 14 кД в большом количестве, которое еще больше возрастает в клетках и супернатанте после 8-часовой стимуляции. Последнее свидетельствует о повышении клеточной ферментативной активности исключительно благодаря синтезу ферментного белка *de novo*, но не в результате активации предшественника фосфолипазы A_2 путем транслокации фермента из цитозоля к мембране. Не исключено, что в основе действия стимуляторов лежит экспрессия гена, сопровождающаяся повышением уровня ферментного белка фосфолипазы A_2 . Истинный механизм описанного эффекта нуждается в специальном изучении, но имеются реальные предпосылки о существовании корреляции между фосфолипазной активностью с M_r 14 кД и образованием протагландинов [20].

Клонирование соответствующего гена доказало его универсальность для транслированных форм фосфолипазы A_2 с M_r 14 кД во всех клетках этих животных. Более того, была показана гомологичность структур крысы и человека [21]. Эти исследования говорят в пользу секреторной природы ферментного белка (при экзоцитозе выделяется в хромаффинных и других нейроэндокринных тканях) и что его липолитическая активность выявляется лишь вне клетки. Несмотря на ряд совпадений в свойствах фосфолипаз с M_r 14 кД, обнаружены некоторые отличия в свойствах и аминокислотной последовательности ферментного белка у крысы [19]. Указанные различия можно объяснить дальнейшей модификацией первичного продукта трансляции [21], что подтверждается фактом обнаружения у кролика трех клеточных и внеклеточных разновидностей фосфолипазы A_2 , имеющих одинаковые N-концевые аминокислотные последовательности вплоть до 16—19 остатков, рН оптимум (7,5—9), Ca^{2+} -зависимость, специфическую активность, а также сообщениями о совпадении N-концевой последовательности фосфолипаз A_2 тромбоцитов и асцитной жидкости кролика и крысы [22], синовиальной жидкости и мембраны плаценты человека.

Вышеизложенное в обобщенном виде может быть положено в

известной степени в основу концепций относительно происхождения и функционирования различных форм фосфолипазы A_2 .

Известно, что вырабатываемые в нейтрофилах липокортины (семейство противовоспалительных белков) являются потенциальными ингибиторами фосфолипаз A_2 [23—25]. Они сходны с калликтинами—мембранными цитоскелетными белками. В литературе существуют противоречивые данные о том, ингибируют ли липокортины фосфолипазу A_2 путем прямого взаимодействия с ферментным белком или оно происходит благодаря взаимодействию фосфолипазного субстрата преимущественно ингибирующим белком, нежели с молекулой фосфолипазы. Не исключено также, что ингибирующее действие липокортинов на фосфолипазу A_2 осуществляется конкурентно к фосфолипидным субстратам. Но до сих пор не доказано, являются ли липокортины специфическими ингибиторами фосфолипаз A_2 *in vitro* и *in vivo*, поскольку их тормозящий эффект проявляется и в отношении фосфолипаз С и Д. Это основывается на исчезновении ингибирующего свойства липокортина *in vitro* при высоких значениях субстрата [24]. Отмечено, что связывание фосфолипидов липокортинами является процессом Ca^{2+} -зависимым как *in vitro*, так и *in vivo*, хотя в последнем случае оно происходит в присутствии микромолярных концентраций свободного Ca^{2+} , что, по всей вероятности, может привести к стабилизации конформации ингибитора.

Липокортины наряду с фосфолипазой A_2 присутствуют в больших количествах у животных и в бактериальных клетках, составляя около 1% клеточного белка. Они найдены также в яде змей и плазме крови. Известны липокортины с различной величиной M_r —36, 38, 68 кД (легкие, лимфоциты), 10, 42, 73 кД (плазма крови человека, крысы, кролика). Они являются как мономерными (36, 10, 42 кД), так и гетерогенными субъединичными (68, 73 кД) белками [23—25]. Полагают, что более короткие молекулярные формы липокортинов являются протеолитическими фрагментами родильных высокомолекулярных белков.

Исследование антифосфолипазной активности липокортинов, выделенных из легких свиньи и макрофагов, показывает высокую степень специфичности для различных фосфолипидов. Так, фракции с M_r 34 и 68 кД из легких ингибируют панкреатическую фосфолипазу A_2 только при использовании в качестве субстрата в первом случае фосфатидилэтаноламина, во втором—фосфатидилхолина [24].

Примечательны качественные различия фосфолипаз A_2 из других источников (панкреаса и макрофагов) к ингибированию липокортинами при использовании различных субстратов. Когда в качестве субстрата используют фосфатидилхолин, то фракция легких с величиной M_r 68 кД ингибирует только панкреатический фермент. В случае же применения фосфатидилэтаноламина как субстрата липокортин макрофага с M_r 34 кД ингибирует фосфолипазу A_2 , выделенную из макрофага, не проявляя какой-либо активности на панкреатический фермент. Эти данные позволяют предположить об

тмещем место комплексном взаимодействии, включающем специфическое связывание индивидуальных липокортинов с различными фосфолипидами, равно как и с фосфолипазой A_2 . Интересно отметить, что полное торможение активности фосфолипазы A_2 из яда щитомордника ингибитором из плазмы животного возможно лишь при предварительном ингибировании последнего с ферментом перед прибавлением к ферменту субстрата. По-видимому, в механизме описанного эффекта фигурирует пример образования прямого фермент-ингибиторного комплекса [23]. Еще одним доказательством этому служит тот факт, что при температурной обработке, триптического расщеплении отмечается полная утрата ингибирующей активности липокортинов. Имеются основания предполагать о существовании в плазме крови человека предшественника фосфолипазы A_2 , обычно низкий уровень активности которого заметно возрастает на фоне триптического гидролиза. Учитывая, однако, наличие в плазме крови человека и свиньи также ингибитора, подавляющего фосфолипазную активность, мы не исключаем вероятность участия в увеличении фосфолипазной активности в плазме фактора разрушения ингибитора. Исходя из вышесказанного, можно сделать следующие выводы.

1. Синтез фосфолипазы A_2 в клетке осуществляется в одной форме с M_r 14 кД.

2. Остальные формы фосфолипазы A_2 с большей молекулярной массой, по-видимому, являются комплексами фермента с различными липокортинами и подобными им белками в соотношении 1:1. Поскольку липокортины характеризуются неодинаковыми молекулярными массами, то и фосфолипазы A_2 , выделенные различными способами из клеток и тканей организма, также отличаются неповторяющимися молекулярными массами (55, 88, 100, 110 кД).

3. Внутриклеточные фосфолипазы A_2 , подобно секреторным ферментам, также наделены способностью к димерообразованию. Подтверждением этому служат данные электрофореза для выделенной нами фосфолипазы A_2 с M_r 100 и 14 кД, а также результаты ранее проведенных исследований [3, 14, 16].

4. К димеризации склонны не только фосфолипазы A_2 с M_r 14 кД, но и их комплексы с липокортинами и подобными белками (55 и 110 кД формы фермента). Причем, согласно различным литературным данным, димерные комплексы обладают хорошо выраженной фосфолипазной активностью в отличие от их мономерных форм.

5. Связывание фосфолипазы A_2 с растворимыми белками и липокортинами, по-видимому, приводит к образованию ряда разновидностей внутриклеточных фосфолипаз A_2 с различным проявлением биологической активности внутри клетки; во внеклеточном пространстве отмечена лишь форма фермента с M_r 14 кД.

6. Комплексообразование фосфолипаз A_2 с липокортинами и подобными им белками в целом сохраняет основные свойства фермента с M_r 14 кД.

7. Присоединение Ca^{2+} к различным растворимым формам внут-

риклеточной фосфолипазы A_2 и ее комплексам приводит к конформационным изменениям фермента, и его комплексов, влияя их физико-химические свойства; гидрофильность на гидрофобность, что, вероятно, облегчает транслокацию фермента и его комплексов от цитозоля к мембране клетки для связывания с фосфолипидами с целью их дальнейшего гидролиза на границе раздела фаз.

В заключение следует отметить, что образование различных комплексов фосфолипазы A_2 с липокартинами и им подобными белками, по всей вероятности, и обеспечивает возможность появления широкого спектра разнообразных форм внутриклеточных фосфолипаз A_2 , каждая из которых может выполнять определенную функцию, регулируемую различными сигнальными системами.

A HIGH-MOLECULAR-MASS PHOSPHOLIPASE A_2 FROM THE CATTLE BRAIN. PURIFICATION AND SOME PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES

AYANIAN A. Y.

H. C. Bureltan Institute of Biochemistry, Acad. of Sci. Armenia
Yerevan

The cattle brain contains a soluble high-molecular-mass form of phospholipase A_2 . The method of isolation and purification for high-molecular-mass enzyme has been developed, including gel-filtration, hydrophobic, ion exchange and affinity column sequential chromatographies. The purified phospholipase A_2 was a 100 kDa polypeptide according to gel-electrophoresis in the presence of 0,1% Na-dodecyl sulfate and absolutely required Ca^{2+} ions for the activity. The *in vitro* optimal activity of the enzyme was observed at pH 8.5 in the presence of 10 mM Ca^{2+} ions. It was detected that the high-molecular-mass enzyme hydrolyzed phospholipids with arachidonoyl residues at the sn-2-position were more effective to study the phospholipase A_2 activity than phospholipid with palmitoyl residues.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Samuelson B., Goldyne M., Braustrom E., Hamberg M., Hammarstrom S., Malmsten C. Ann. Res. Biochem., v. 47, p. 997—1029, 1978.
2. Dennis E. A. Adv. in Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Research (ed. B. Samuelsson), New York, Raven Press Ltd., v. 20, p. 217—221, 1990.
3. Gronich J. H., Boncentre J. V., Nemenoff R. A. Biochem. J., v. 271, № 1, p. 37—43, 1990.
4. Yoshihara Y., Wa'anabe Y. Biochem & Biophys. Res. Commun., v. 17, № 2, p. 484—490, 1990.
5. Айянян А. Е. Нейрохимия, т. 9, № 1, с. 105—108, 1990.
6. Евстратова Н. Г., Айянян А. Е., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П. Биохимия, т. 47, вып. 2, с. 1547—1552, 1982.
7. Salach J. I., Turini P., Seng R., Hauber J., Singer T. P. J. Biol. Chem., v. 246, № 2, p. 331—339, 1971.

8. *Laemmli U. K.* Nature, v. 227, № 5259, p. 680—685, 1970.
9. *Reisfeld R. A., Lewis U. J., Williams D.* Nature, v. 195, № 4838, p. 231—233., 1962.
10. *Garay W. R.*—In: Methods in Enzymol., Acad. Press, New-York—London, v. 11 p. 139—151, 1967.
11. *Kim D. K., Kudo I., Fugimori Y., Mizushima H., Masuda M., Kakich R., Ikizawa K., Inoue K.* Biochem. & Biophys. Res. Commun., v. 15, № 2, p. 488—493, 1988.
12. *Kramer R. M., Hession C., Johansen B., Hayes G., Meharg F., Chow E. P., Tizard R., Pepinsky B.* J. Biol. Chem., v. 264, № 10, p. 5716—5775, 1989.
13. *Gronich J. H., Bonventre J. V., Nemeroff R. A.* J. Biol. Chem., v. 263, № 32, p. 16645—16651, 1988.
14. *Leslie C. C., Voetker D. R., Channon J. Y., Wall M. M., Zelarney P. T.* Biochem & Biophys. Acta, v. 963, № 3, p. 476—492, 1988.
15. *Wijkander J., Sundler R.* FEBS Lett., v. 244, № 1, p. 51—55, 1989.
16. *Loeb L. A., Gross R. W. J.* J. Biol. Chem., v. 261, № 25, p. 10437—10467, 1986.
17. *Channon J. Y., Leslie C. C.* J. Biol. Chem., v. 265, p. 5409—5415, 1990.
18. *Ulevitch R. J., Watanabe Y., Sano M., Lister M. D., Deems R. A., Dennis E. A.* J. Biol. Chem., v. 263, № 7, p. 3079—3085, 1988.
19. *Aarsman A. J., De Jong J. G. N., Arnoldussen E., Neyes F. W., van Wazsenaar P. D., van den Bosch H.* J. Biol. Chem., v. 264, № 17, p. 10903—10914, 1989.
20. *Schalkewijk C., Pfeilschifter J., Marki F., van den Bosch H.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 174, № 1, p. 268—275, 1991.
21. *Komada M., Kudo I., Inoue K.* Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 168, № 3, p. 1059—1055, 1990.
22. *Mizushima H., Kudo I., Horigome K., Murakami M., Hayakawa M., Kim D. K., Kohno E., Tomita M., Inoue K.* J. Biochem., v. 105, № 4, p. 520—525, 1989.
23. *Miwa M., Kubota I., Ichihashi T., Motojima H., Matsamoto M. F.* J. Biochem., v. 96, № 3, p. 761—773, 1984.
24. *Davidson F. F., Dennis E. E., Powell M., Glenney J. R.* J. Biol. Chem., v. 262, № 4, p. 1638—1705, 1987.
25. *Weber G., Ferber E.* J. Biol. Chem. Hoppe-Seyler, v. 371, p. 725—731, 1990.

Поступила 26. VI. 1991.