



УДК 577.152.311\*4'135 : 547.953.04

© 1991 г.

*Н. Г. Евстратова, Г. А. Серебренникова***ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АФФИННЫХ СОРБЕНТОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ  
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФОСФОЛИПАЗЫ  $A_2$  С СУБСТРАТАМИ***Институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова, Москва*

Описано получение биоспецифических сорбентов на основе полисахаридных матриц с включением различных фосфолипидных лигандов. Методом аффинной хроматографии получены количественные характеристики образования комплексов фосфолипазы  $A_2$  с фосфолипидами. Показано, что на данных сорбентах образуются два типа комплексов с соотношением липид — фермент (40—154) : 1 и (5—7) : 1 в зависимости от содержания липида на носителе. Обсуждается вопрос выбора биоспецифических сорбентов для аффинной хроматографии фосфолипазы  $A_2$ .

Одной из актуальных задач биохимии является всестороннее изучение процессов ассоциации различных физиологически активных веществ, в том числе липид-белковых взаимодействий. В этой связи важная роль отводится исследованию специфических комплексов фосфолипаза  $A_2$  — фосфолипид.

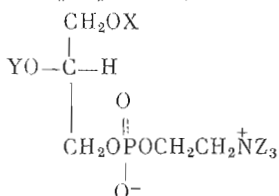
Как известно, гидролиз фосфолипазой  $A_2$  осуществляется при определенных параметрах поверхности субстратных агрегатов. Очень крупные липидные частицы или, наоборот, растворимые в воде субстраты действию фермента не подвергаются. Создание определенной поверхностной структуры липидов может быть осуществлено несколькими способами: обработкой их ультразвуком, добавлением органического растворителя или поверхностно-активного вещества, а также иммобилизацией субстрата на какой-либо матрице (например, на кремниевой кислоте [1], органических сорбентах [2—5], неорганических носителях [6]). Различия в размерах и структуре этих твердых носителей приводят к получению широкого спектра модельных поверхностей, на которых может осуществляться связывание липида и его гидролиз фосфолипазой  $A_2$ .

Ранее нами были получены количественные характеристики образования комплекса фосфолипаза  $A_2$  — фосфолипид на биоспецифических сорбентах органокремнеземной природы, содержащих разнообразные по структуре липидные субстраты [6]. Было показано, что 1 моль белка связывается с 15—17 моль иммобилизованного фосфолипида независимо от его строения, однако следует учитывать высокую неспецифическую сорбцию аффинных сорбентов на основе кремнеземных матриц и получение за счет этого искаженных данных о процессах связывания фермента с лигандом. В настоящей работе описано исследование биоспецифических сорбентов на основе полисахаридных матриц, лишенных отмеченного недостатка.

Известно, что в образовании комплексов фосфолипаза  $A_2$  — субстрат существенная роль отводится силам как гидрофобного, так и полярного взаимодействия между белком и липидом. Отсутствие в молекуле липида гидрофобных цепей, а также уменьшение их длины могут вызывать ослабление связей между ферментом и субстратом и распад комплекса. Наличие заряженных групп в субстрате усиливает прочность связывания фосфолипазы  $A_2$ , однако значительное их увеличение может также привести к разрушению комплекса [7—9].

Сокращения: DCC — дициклогексилкарбодимид.

Характеристика состава биоспецифических сорбентов с иммобилизованными фосфолипидами \*



Тип сорбента	Лиганд	X	Y	Z	Матрица
1	Глицерофосфохолин (I)	H	H	CH <sub>3</sub>	Эпоксисефароза
2	Октадециламин (II)	-	-	-	»
3	Глицерофосфохолин + октадециламин (II)	H	H	Z	»
4	Лизофосфатидилхолин (IV)	COR	H	CH <sub>3</sub>	»
5a	Карбоксифосфатидилхолин (Va)	COR	CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH	CH <sub>3</sub>	Аминогексилгагароза
5б	Оксисленный яичный фосфатидилхолин (Vб)	COR	CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	CH <sub>3</sub>	»
6a	Фосфатидилэтаноламин (VI)	COR'	COR''	H	Карбоксиагароза
6б	»	»	»	»	Эпоксисефароза

\* R, R' и R'' — жирнокислотные остатки.

Исходя из этих представлений, мы считали целесообразным при использовании биоспецифических сорбентов для изучения взаимодействия фосфолипазы A<sub>2</sub> с липидами проследить влияние степени гидрофобности лиганда и носителя, а также структуры полярной головки и степени заряженности аффинного сорбента на это взаимодействие. Поэтому были получены биоспецифические носители, отличающиеся степенью посадки липида и его структурой (табл. 1).

Глицерофосфохолин (I), лизофосфатидилхолин (IV) и окисленный яичный фосфатидилхолин (Vб) получали по известным методикам из яичного фосфатидилхолина [10]. Карбоксилсодержащий фосфатидилхолин (Va) синтезировали ацилированием лизофосфатидилхолина янтарным ангидридом. Иммобилизацию соединений, содержащих свободную аминокислотную группу ((II), (VI)) или гидроксильную группу ((I), (IV)) осуществляли посредством взаимодействия лиганда с предварительно полученной эпоксисефарозой [11] в растворе NaOH при pH 9,0—9,5 в течение 48—72 ч. При более жестких щелочных условиях наблюдается разрушение молекулы липида. Для улучшения растворимости октадециламина в реакционную массу добавляли хлороформ или диметилформамид и реакцию проводили при 40—60° С. Иммобилизацию фосфатидилэтаноламина (VI) на карбоксиагарозе проводили в присутствии DCC аналогично работе [12]. Реакцию фосфатидилхолинов (Va) и (Vб) с аминоагарозой осуществляли при pH 4 с добавлением водорастворимого карбодимида. Блокирование непрореагировавших эпокси- или карбоксильных групп во всех сорбентах осуществляли с помощью 2 М 2-аминоэтанола, а аминогрупп — ацелированием укусным ангидридом [13].

Связывание фосфолипазы A<sub>2</sub> со всеми аффинными сорбентами проводили в 50 мМ трис-HCl-буфере (pH 8), содержащем 25 мМ CaCl<sub>2</sub>, 0,1 М NaCl, 1 мМ EDTA. Во всех случаях на колонку наносили по 5 мг фермента, а связывание проводили 12—14 ч при 4° С. Количество наносимой фосфолипазы значительно превышало уровень насыщенности биоспецифических сорбентов, использованных в данной работе. Промывание исходным буфером приводило к элюированию фермента, не связавшегося с иммобилизованным фосфолипидом. Исключение из буфера ионов Ca<sup>2+</sup> способствовало разрушению комплекса фермент-субстрат и элюированию ос-

Связывание фосфолипазы  $A_2$  с липидами на биоспецифических сорбентах

Тип сорбента.	Количество сорбента, мг	Степень посадки лиганда, мкмоль/г	Общее количество липида, мкмоль	Количество связанной фосфолипазы $A_2$		Мольное отношение лиганд — фермент
				мкг	мкмоль	
1	100	43 5-25	4,3	—	—	—
2	125	6,4	0,8	300	0,022	36
3	150	38	5,7	1200	0,088	64
	166	3,9	0,65	1684	0,125	5,2
4	140	8,5	1,2	2330	0,17	7,0
5a	215	53,7	11,55	3172	0,235	49
5б	170	7,5	1,28	2835	0,21	6,0
6a	215	106	22,79	2000	0,148	154
6б	116	6,2	0,719	1903	0,141	5,1

тавшейся на колонке фосфолипазы  $A_2$ . Дальнейшее элюирование проводилось 1%  $CH_3COOH$ , что обеспечивало разрушение гидрофобных связей белка и липида [14]. Результаты эксперимента приведены в табл. 2.

Связывание фосфолипазы  $A_2$  на сорбенте с иммобилизованным глицерофосфохолином (тип 1) не наблюдалось при любой степени посадки лиганда на матрице. Поскольку удерживание фермента за счет одних полярных сил на сорбенте типа 1 не происходило, целесообразно было опробовать для этих целей гидрофобный сорбент типа 2, содержащий октадециламин. При этом фосфолипаза  $A_2$  удерживалась на сорбенте и при исключении из элюирующего буфера  $Ca^{2+}$ , но количество связанного фермента было незначительным. Вымывание связанного белка в данном случае осуществлялось лишь 1%  $CH_3COOH$ .

С целью создания сорбента, включающего гидрофобные и полярные компоненты, непрореагировавшие эпокси группы сорбента типа 1 (степень посадки глицерофосфохолина 43 и 5 мкмоль/г) обрабатывали октадециламином, в результате чего был получен сорбент типа 3 со степенью посадки липидного лиганда 38 и 3,9 мкмоль/г соответственно. Эффективность связывания фермента в этом случае определялась содержанием лиганда. Так, при высокой степени иммобилизации лиганда происходило значительно меньшее удерживание фосфолипазы  $A_2$  (табл. 2). Аналогичная закономерность наблюдалась также для сорбентов типа 5, включающих карбоксилсодержащие фосфатидилхолины. Подобная зависимость прослеживается и для сорбентов типа 6, в которых иммобилизация фосфатидилэтаноламина на носителе происходила с блокированием аминогруппы фосфолипида, не затрагивая при этом его анионных участков. В данных случаях, по-видимому, высокая степень иммобилизации фосфолипидов на матрице приводила к значительному увеличению количества заряженных участков на поверхности биоспецифического сорбента и негативно отражалась на образовании комплекса фосфолипаза—фосфолипид. Уменьшение степени посадки липидов способствовало существенному улучшению аффинных свойств биоспецифических сорбентов.

Таким образом, на биоспецифических сорбентах полисахаридной природы происходит образование двух типов комплексов в зависимости от количества иммобилизованного лиганда: 1) при высоком содержании фосфолипидов соотношение лиганд—фермент составляет величину от 36 : 1 до 154 : 1; 2) при невысокой степени посадки — от 5,1 : 1 до 7,0 : 1.

Проведенные исследования дают определенную информацию о взаимодействии липидных субстратов с фосфолипазой  $A_2$ , кроме того, их следует учитывать при выборе биоспецифических сорбентов для выделения данного фермента из различных источников.

## Экспериментальная часть

В работе использовали фосфолипазу  $A_2$  (КФ 3.1.1.4) из яда кобры *Naja naja oxiana* («Кемотех», г. Таллинн; *M*, 13 500), сефарозу 4В (Pharmacia, Швеция), производные агарозы («Кемотех», г. Таллинн). Концентрацию фосфолипида на сорбенте определяли по методу Бартлета [15]. Содержание белка при хроматографии устанавливали по поглощению растворов при 280 нм на приборе Beckman DU-8В (США) и измеряли затем по методу Лоури [16]. Активность фосфолипазы  $A_2$  проверяли ацидометрическим методом с применением яичного фосфатидилхолина [17].

*1-О-Ацил-2-О-суццинил-sn-глицеро-3-фосфохолин (Va)*. К 116 мг лизофосфатидилхолина (IV) в 15 мл безводного бензола и 15 мл безводного ацетонитрила добавляли 34 мг янтарного ангидрида и 56 мг *N,N*-диметил-аминопиридина, перемешивали 72 ч при 50° С. Растворитель отгоняли, вещество очищали хроматографией на силикагеле 40/250, элюируя смесью хлороформ — метанол — вода, 65 : 25 : 4. Выход 120 мг (98%). ТСХ на силуфоле. *R<sub>f</sub>* 0,2. Спектр ПМР ( $\delta$ , м. д.): 1,4м ( $CH_2$  цепи); 2,5 т ( $CH_2COOH$ , J 6 Гц); 3,8м ( $CH_2O$  глицерина); 4,0 плечо ( $CH_2-O-P$ ); 10,9с ( $CH_2COOH$ ).

*Получение биоспецифических сорбентов. Сорбент типа 1*. К 10 мл сефарозы в 100 мл 2 М NaOH добавляли 10 мл эпихлоргидрина, встряхивали 24 ч, сорбент отфильтровывали, промывали водой. Содержание эпокси групп 400 мкмоль/г сухого сорбента \* [14]. К свежеприготовленному раствору 350 мг глицерофосфохолина (I) в 20 мл раствора NaOH (рН 9,0) добавляли 2 мл 2 М эпоксисефарозы, встряхивали 72 ч, сорбент отфильтровывали, промывали 100 мл воды, затем добавляли 2 мл 2 М 2-аминоэтанола, выдерживали 4 ч. Сорбент отфильтровывали, промывали 100 мл воды, 50 мл ацетона. Содержание фосфолипида 43 мкмоль/г сухого сорбента. Аналогично были получены сорбенты с содержанием соединения (I) от 5 до 25 мкмоль/г.

*Сорбент типа 2*. К 2 мл эпоксисефарозы в 10 мл 2 М NaOH добавляли 500 мг октадециламина (II) в 10 мл хлороформа, встряхивали 72 ч, сорбент отфильтровывали, промывали 50 мл хлороформа при 40° С, водой и 50 мл ацетона. Затем к сорбенту добавляли 2 мл 2М 2-аминоэтанола, встряхивали 4 ч, промывали 50 мл воды и 50 мл ацетона. Содержание октадециламина определяли по количеству азота на сорбенте до блокирования непрореагировавших эпокси групп.

*Сорбент типа 3*. К 2 мл сорбента типа 1, содержащего эпокси группы, в 10 мл раствора NaOH (рН 9,0) с концентрацией фосфолипида 43 или 5 мкмоль/г добавляли 500 мг октадециламина в 10 мл хлороформа, встряхивали 72 ч при 40° С. Дальнейшую промывку и блокирование непрореагировавших эпокси групп проводили как при получении сорбента типа 2.

*Сорбент типа 4*. К 2 мл эпоксисефарозы в 10 мл раствора NaOH (рН 9,5) добавляли 52 мг лизофосфатидилхолина (IV) в 5 мл хлороформа, встряхивали 72 ч. Сорбент отфильтровывали, промывали 50 мл хлороформа, 50 мл ацетона, 50 мл воды, добавляли 2 мл 2 М 2-аминоэтанол, встряхивали 4 ч, промывали как описано выше.

*Сорбент типа 5а*. К 2 мл аминоксисагарозы в 10 мл раствора HCl (рН 4) добавляли 100 мг фосфолипида (Va) и 500 мг 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид, встряхивали 72 ч, сорбент отфильтровывали и промывали как сорбент типа 4. Затем добавляли 0,6 мл уксусного ангидрида в 20 мл 1 М  $KHCO_3$ , поддерживая рН 8,5 с помощью 5 н. KOH. Суспензию перемешивали 1 ч при 4° С. Адсорбент промывали 50%-ным водным диоксидом (50 мл) и 100 мл воды.

*Сорбент типа 5б* получали аналогично из 100 мг фосфолипида (Vб).

*Сорбент типа 6а*. К 5 мл карбоксисагарозы в 5 мл воды добавляли 30 мг фосфатидилэтанолламина (VI) в 10 мл тетрагидрофурана и 30 мг DCC, встряхивали 24 ч. Сорбент промывали аналогично сорбенту типа 4, затем добавляли 2 мл 2 М 2-аминоэтанола (рН 5) и 500 мг 1-этил-3-(3-

\* Сухой сорбент получали путем высушивания его в эксикаторе над  $P_2O_5$  до постоянного веса.

диметиламинопропил)карбодиимида, встряхивали 4 ч. Сорбент отфильтровывали и промывали.

Сорбент типа 6б. К 2 мл эпоксицефарозы в 10 мл раствора NaOH добавляли 100 мг фосфолипида (VI), встряхивали 72 ч, отфильтровывали и далее обрабатывали как сорбент типа 1.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Goerke J., Gier J., Bousen P. P. M. // *Biochim. et biophys. acta.* 1971. V. 248. № 2. P. 245—252.
2. Барсуков Л. И., Кисель М. А., Иванова В. И., Бергельсон Л. Д. // *Биоорганическая химия.* 1980. Т. 6. № 6. С. 923—926.
3. Рахимов М. М., Ахмеджанов Р. А., Салихова З. Т., Арипов Т. Ф. // *Прикладная биохимия и микробиология.* 1988. Т. 24. № 5. С. 607—613.
4. Natori J., Nishijima M., Nojima S., Saton H. // *J. Biochem.* 1983. V. 93. № 2. P. 631—637.
5. Maarten G., van Oort M. G., Dijkman R., Hille J. D. R., de Haas G. H. // *Biochemistry.* 1985. V. 24. № 27. P. 7987—7993.
6. Евстратова Н. Г., Серебrenникова Г. А., Евстигнеева Р. П. // *Биоорганическая химия.* 1982. Т. 8. № 11. С. 1497—1500.
7. Hille J. D. R., Donne-Op den Kelder G. M., Sauve P., de Haas G. H., Egmond M. R. // *Biochemistry.* 1981. V. 20. № 15. P. 4068—4078.
8. Hille J. D. R., Egmond M. R., Dijkman R., van Oort M. G., Jirgensons B., Sauve O., de Haas G. H. // *Biochemistry.* 1983. V. 22. № 18. P. 5353—5358.
9. van Eyk J. H., Vreheij H. M., Dijkman R., de Haas G. H. // *Eur. J. Biochem.* 1983. V. 132. № 1. P. 183—188.
10. Бергельсон Л. Д., Дятловицкая Э. В., Молотковский Ю. Г., Батраков С. Г., Барсуков Л. И., Проказова Н. В. *Препаративная биохимия липидов.* М.: Наука, 1981. С. 227.
11. Matsumoto J., Mizuno Y., Seno N. // *J. Biochem.* 1979. V. 85. № 4. P. 1091—1098.
12. Rock C. O., Snyder F. // *J. Biol. Chem.* 1975. V. 250. № 16. P. 6564—6566.
13. Wilchek M., Miron T. H. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1976. V. 72. № 7. P. 108—113.
14. Туркова Я. *Аффинная хроматография.* М.: Мир, 1980.
15. Кеймс М. *Техника липидологии.* М.: Мир, 1975.
16. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Faarr A. L., Randall R. J. // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. № 1. P. 265—275.
17. De Haas G. H., Slotboom A. M., Bousen P. // *Biochim. et biophys. acta.* 1970. V. 221. № 1. P. 54—61.

Поступила в редакцию  
6.VIII.1990

N. G. EVSTRATOVA, G. A. SEREBRENNIKOVA

#### USE OF AFFINITY SORBENTS FOR STUDY OF PHOSPHOLIPASE A<sub>2</sub> INTERACTION WITH SUBSTRATES

*M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow*

Preparation of biospecific sorbents of the polysaccharide type involving different phospholipid ligands is described. By means of affinity chromatography, the formation of the phospholipase A<sub>2</sub> — phospholipid complex was quantitatively characterized. Two types of the complexes are formed on this sorbents, with lipid — enzyme ratios (40—154): 1 and (5—7): 1 depending on the lipid concentration. Choice of biospecific sorbents for affinity chromatography of phospholipase A<sub>2</sub> is discussed.