



# БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

том 6 \* № 6 \* 1980

УДК 577.453.211.08

## ИММОБИЛИЗОВАННАЯ ФОСФОЛИПАЗА А<sub>2</sub> КАК МЕМБРАННЫЙ ЗОНД

*Барсуков Л. И., Кисель М. А., Иванова В. П.,  
Бергельсон Л. Д.*

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

Для изучения топографии фосфолипидов в биологических мембранах предложено использовать фосфолипазу А<sub>2</sub> (*Naja naja oxiana*), ковалентно иммобилизованную на сепарозе 4В. Показано, что иммобилизованная фосфолипаза А<sub>2</sub> проявляет активность по отношению к различным липидным субстратам, используемым как в мицеллярной форме, так и в составе биологических мембран. С помощью иммобилизованной фосфолипазы А<sub>2</sub> изучено трансмембранное распределение фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина в микросомах печени крысы.

При изучении топологической фосфолипидной асимметрии биологических мембран широко используются фосфолипазы [1]. С их помощью в последние годы неоднократно предпринимались попытки установить трансмембранное распределение фосфолипидов в микросомах печени [2—5], однако результаты оказались противоречивыми. Так, Нильссон и Дальтнер [2, 3] обнаружили наличие фосфолипидной асимметрии в микросомной мембране на основании результатов, полученных с помощью фосфолипазы А<sub>2</sub> (*Naja naja*). В частности, ими был сделан вывод, что весь фосфатидилэтаноламин и 55% фосфатидилхолина микросом находятся на наружной поверхности мембраны [3]. Иное распределение фосфолипидов было предложено Хиггинс и Даусоном [4] при использовании фосфолипазы С (*Clostridium welchii*). Эти авторы полагают, что фосфатидилэтаноламин расположен преимущественно на внутренней поверхности мембраны, а фосфатидилхолин — на наружной. Наконец, Сандлер и др. [5], использовав для обработки микросом фосфолипазу А<sub>2</sub> из трех источников (*N. naja*, *Crotalus atrox* и *Bungarus multicinctus*), пришли к выводу, что в микросомной мембране вообще нет асимметричного распределения фосфолипидов.

Причина столь существенных различий в выводах о распределении фосфолипидов в мемbrane микросом неясны. Однако при анализе перечисленных работ обращает на себя внимание тот факт, что в них для изучения асимметрии не только использовались разные фосфолипазы, но и существенно различались условия их применения. Так, Нильссон и Дальтнер [3] отмечают, что, если не принимать мер к ограничению доступа фосфолипазы А<sub>2</sub> внутрь микросомных пузырьков, то гидролизу подвергаются все микросомные фосфолипиды. Поэтому было предложено проводить обработку микросом фосфолипазой А<sub>2</sub> при 0°С в присутствии избытка сывороточного альбумина, который добавляли для удаления из мембраны продуктов фосфолипазного гидролиза (лизофосфолипидов и жирных

Гидролиз фосфолипидов под действием иммобилизованной  
фосфолипазы А<sub>2</sub> (*N. naja oxiana*)\*

Фосфолипидный субстрат	Состояние субстрата	Степень гидролиза, %
Яичный фосфатидилхолин	Смешанные мицеллы с тритопом Х-100	88
Дифосфатидилглицерин	Протопласти <i>M. lysodeikticus</i>	48
Фосфатидилглицерин		66
Фосфатидилхолин	Микросомы печени крысы	49
Фосфатидилэтаноламин		74

\* Условия см. в «Экспериментальной части».

кислот), обладающих поверхностно-активным действием. С другой стороны, Хиггинс и Даусон [4] утверждают, что альбумин не проявляет защитного действия при использовании фосфолипазы А<sub>2</sub> (*N. naja*). Что же касается фосфолипазы С, послужившей основным инструментом в работе [4], то специальных мер, предотвращающих проникновение ее внутрь микросом в процессе гидролиза, не предпринималось. В работе Сандлера и др. [5] также не предпринимались меры, предотвращающие взаимодействие фосфолипазы А<sub>2</sub> с липидами на внутренней поверхности мембраны, и не контролировалась целостность микросом в процессе ферментативного гидролиза.

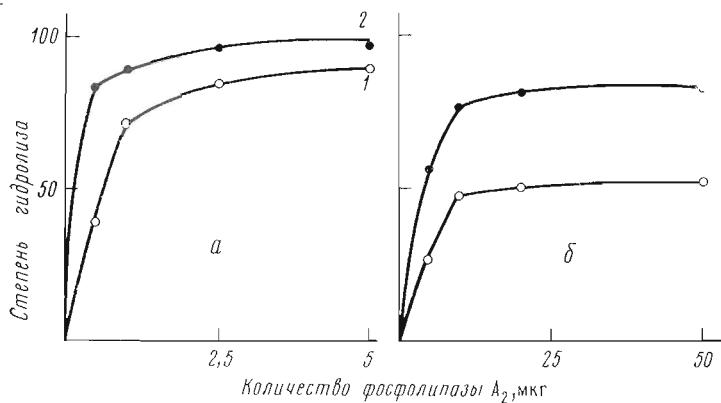
Поскольку мнения разных авторов о стабилизирующем действии альбумина на микросомную мембрану в процессе фосфолипазного гидролиза расходятся, мы в настоящей работе использовали другой способ ограничения проникновения фосфолипаз через мембрану. С этой целью фосфолипаза А<sub>2</sub> (*N. naja*, КФ 3.4.1.4) была ковалентно связана с сефарозой 4В. При этом проникновение фосфолипазы внутрь микросом становится невозможным, так как гранулы сефарозы по своим размерам сравнимы с самими микросомами. Ниже изложены результаты, полученные при изучении фосфолипидной асимметрии микросомной мембранны с помощью иммобилизованной фосфолипазы А<sub>2</sub>.

При реакции фосфолипазы А<sub>2</sub> с BrCN-сефарозой 4В происходит полное связывание белка, сопровождающееся значительным уменьшением удельной активности фермента (более чем на 90%). Аналогичное снижение ферментной активности наблюдали Адамич и др. [6] при иммобилизации фосфолипазы А<sub>2</sub> (*N. naja*) на пористых стеклянных шариках.

Мы нашли, что иммобилизованная фосфолипаза А<sub>2</sub> проявляет активность по отношению к различным липидным субстратам, используемым в мицеллярной форме или входящими в состав биологических мембран (таблица). Так, она легко расщепляет яичный фосфатидилхолин, солюбилизованный неионным детергентом тритоном Х-100, гидролизует дифосфатидилглицерин и фосфатидилглицерин в плазматической мембране *Micrococcus lysodeikticus*, а также фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин в микросомах печени крысы.

На рисунке (а, б) приведены данные по гидролизу фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина в микросомной мемbrane свободной и иммобилизованной формами фосфолипазы А<sub>2</sub>. Вследствие уменьшения активности фосфолипазы в связанном с сефарозой 4В состоянии на одно и то же количество микросомных фосфолипидов иммобилизованной фосфолипазы требуется приблизительно в 10 раз больше, чем растворимого фермента.

Сравнение рисунков а и б показывает, что иммобилизованная фосфолипаза, так же как и растворимый фермент, гидролизует фосфатидилэтаноламин с большей скоростью, чем фосфатидилхолин. Для растворимого фер-



Гидролиз ( $30^\circ\text{C}$ , 40 мин) фосфатидилхолина (1) и фосфатидилэтаноламина (2) в микросомах (120 мкг Р) растворимой (а) и иммобилизованной (б) фосфолипазой  $A_2$ . Приведены средние значения, полученные из 3–4 опытов. Относительная ошибка не превышала  $\pm 10\%$

менте такое соотношение активностей фосфолипазы  $A_2$  по отношению к этим двум фосфолипидам обычно наблюдается, когда они одновременно присутствуют в смеси (см., например, [7]). Таким образом, иммобилизация фермента не приводит к изменению его субстратной специфичности.

По мере увеличения количества растворимой фосфолипазы в инкубационной среде гидролиз фосфатидилэтаноламина и фосфатидилхолина микросом протекает практически полностью (рисунок а), тогда как при обработке микросом иммобилизованной фосфолипазой гидролиз тех же фосфолипидов не доходит до конца (рисунок б). Так, с увеличением количества иммобилизованной фосфолипазы степень гидролиза микросомного фосфатидилэтаноламина достигает  $\sim 80\%$ , а фосфатидилхолина —  $50\%$  и после этого существенно не изменяется при дальнейшем увеличении количества фермента.

Явно выраженный бифазный характер зависимости степени гидролиза фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина от количества иммобилизованной фосфолипазы свидетельствует о том, что в мембране микросом есть два фонда фосфолипидов, различающихся по доступности для этой формы фермента. В то же время для свободной фосфолипазы был доступен практически весь фосфатидилэтаноламин и  $\sim 90\%$  фосфатидилхолина микросом. Исчерпывающий гидролиз фосфолипидов микросом наблюдался ранее [3] при действии свободной фосфолипазы  $A_2$  (*N. paiva*) в условиях, когда не принимали специальных мер для ограничения доступа фермента внутрь микросомных пузырьков. Если же фосфолипазу обработку проводили при  $0^\circ\text{C}$  в присутствии альбумина, препятствующего проникновению фосфолипазы через мембрану, то гидролизу подвергалось только  $53\%$  фосфатидилхолина и  $\sim 90\%$  фосфатидилэтаноламина [3]. Сходные результаты в аналогичных условиях были получены также группой Ван-Деенена [8].

Проведенные нами эксперименты показывают, что в случае иммобилизованной фосфолипазы содержащиеся в микросомах фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин не расщепляются полностью даже при  $30^\circ\text{C}$  и в отсутствие альбумина. Весьма показательно, что полученные при этом цифры довольно близки к тем, которые были получены при обработке микросом растворимой фосфолипазой  $A_2$  в присутствии альбумина [3, 8].

Так как фосфолипаза, иммобилизованная на граулах сефарозы 4В, заведомо неспособна проникать внутрь микросомных пузырьков, то можно полагать, что она расщепляет только те фосфолипиды, которые находятся на наружной поверхности мембранны. Следовательно, в расчете на фосфолипиды, подвергшиеся расщеплению при использованных нами максимальных концентрациях иммобилизованной фосфолипазы (рисунок б),

можно предположить, что на наружной поверхности мембранные микросомы находится не менее 80% фосфатидилэтаноламина и ~50% фосфатидилхолина. Однако вывод о статичном распределении фосфолипидов в микросомной мембране не согласуется с высказанным недавно предположением о быстрой трансмембранный миграции (флип-флопе) фосфолипидов в этой мембране [8, 9]. Так, согласно данным по межмембранныому обмену в присутствии липидпереносящих белков, скорость трансмембранный миграции фосфатидилхолина характеризуется временной постоянной  $\tau_{1/2} \leq 2-3$  мин [8]. Исходя из этого следует ожидать, что за время фосфолипазного гидролиза (40 мин) практически весь фосфатидилхолин должен перейти из внутреннего межклеточного пространства в наружный и таким образом стать доступным для фосфолипазы. Тем не менее расщеплению иммобилизованной фосфолипазой подвергается только половина всего фосфатидилхолина. Противоречие между результатами опытов, проведенных с липидпереносящими белками, и данными, полученными с фосфолипазой A<sub>2</sub>, может быть объяснено двояким образом:

1) в отличие от фосфолипазы (иммобилизованной или использованной в присутствии альбумина) липидпереносящие белки проникают через микросомную мембрану либо индуцируют быстрый флип-флоп фосфатидилхолина;

2) в микросомной мембране может происходить довольно быстрый флип-флоп фосфатидилхолина, который, однако, ингибируется в условиях фосфолипазного гидролиза.

В настоящее время первое объяснение кажется маловероятным, так как до сих пор индукция флип-флопа под влиянием липидпереносящих белков или их проникновение внутрь мембранны никогда не наблюдалось ни в искусственных, ни в биологических системах [1]. Второе предположение, напротив, представляется возможным в связи с недавно появившимися данными о структурной организации липидов в микросомах. С помощью <sup>31</sup>P-ЯМР было показано, что в микросомной мембране липидный бимолекулярный слой существует со структурами, имеющими небислойную организацию [10, 11], причем бислойная и небислойная фазы находятся в состоянии равновесия. С другой стороны, было высказано предположение, что образование небислойных липидных структур лежит в основе явления флип-флопа [12]. В липосомах факторами, способствующими образованию небислойных структур, являются присутствие фосфатидилэтаноламина [13] или наличие перекисей фосфолипидов [14]. При обработке микросом фосфолипазой A<sub>2</sub> эти факторы должны частично элиминироваться благодаря преимущественному расщеплению фосфатидилэтаноламина и (или) переводу окисленных жирокислотных остатков фосфолипидов в водорастворимую форму. Таким образом, фосфолипазная обработка микросом может привести к стабилизации бислойной структуры липидов. Что касается продуктов фосфолипазного гидролиза, то они, видимо, не стимулируют трансмембранный миграцию фосфолипидов. В пользу этого предположения говорит, например, тот факт, что в модельных мембранах (озвученные липосомы) лизофосфатидилхолин не способствует образованию небислойных структур и не индуцирует флип-флоп даже в случае термодинамически невыгодного асимметричного распределения фосфолипидов [14].

Как бы то ни было, результаты, полученные в настоящей работе с использованием иммобилизованной фосфолипазы A<sub>2</sub>, однозначно показывают, что не менее 80% микросомного фосфатидилэтаноламина должно находиться на наружной поверхности мембранны и что фосфатидилхолин микросом не подвергается быстрому флип-флопу в процессе фосфолипазного гидролиза. Поэтому тот факт, что в одних и тех же условиях (в отсутствие альбумина при 20–30°C) растворимая фосфолипаза A<sub>2</sub> расщепляет весь микросомный фосфатидилхолин, а иммобилизованная форма фермента — только половину его, доказывает, что фосфатидилхолин распределяется равномерно между наружной и внутренней поверхностями

микросомной мембранны. Таким образом, наши результаты являются независимым подтверждением представлений о фосфолипидной асимметрии микросомной мембранны, предложенных Нильссоном и Дальнером [3], и разрешают существующие по этому предмету споры. Вместе с тем результаты настоящей работы демонстрируют перспективность использования иммобилизованных фосфолипаз в качестве зондов для исследования топологического распределения фосфолипидов в биологических мембранах.

## Экспериментальная часть

В работе использована фосфолипаза А<sub>2</sub> (изофермент 3) яда кобры *Naja naja oxiana*. Выделение фосфолипазы, ее иммобилизация на BrCN-сепарозе 4B и определение активности описаны в статье [15]. По данным Апсанлона и др. [15], фосфолипаза А<sub>2</sub>, иммобилизованная на сепарозе 4B, сохраняет ~10% удельной активности по отношению к фосфатидилхолину, устойчива при хранении в течение нескольких месяцев при -5°C и содержит 20 мг белка на 1 г сорбента. Фосфатидилхолин выделяли из желтоков куриных яиц [16]. Протопласты *M. lysodeikticus*, меченные [<sup>32</sup>P]глицерином, выделяли как описано ранее [17]. Для получения микросом, меченных <sup>32</sup>P, крысам вводили внутрибрюшинно изотонический раствор [<sup>32</sup>P]фосфата натрия (в расчете 0,5–1,0 мКи на животное). Через 20 ч животных забивали, извлеченную печень гомогенизировали в буфере (рН 7,4), содержащем трис-HCl, и центрифугировали 15 мин при 600g. Надосадочную жидкость центрифугировали при 15 000 g в течение 30 мин. Осадок отбрасывали, а надосадочную жидкость центрифугировали 1 ч при 105 000g. Полученный осадок суспензировали в 0,15 M трис-HCl (рН 8,0) и центрифугировали 1 ч при 105 000g для удаления адсорбированных на микросомах белков. Осадок ресуспензировали в буфере, содержащем 0,25 M сахарозу и 10 mM трис-HCl (рН 7,4). Белок определяли по Лоури [18]. Липиды экстрагировали согласно Блаю и Дайеру [19]. Липидный фосфор анализировали по Васьковскому и сотр. [20].

При проведении фосфолипазного гидролиза <sup>32</sup>P-меченные микросомы (120 мкг липидного фосфора) в 10 mM трис-HCl, pH 7,4, содержащем 0,25 M сахарозу, инкубировали с растворимой (10 мкг белка) или иммобилизованной (10 мкг белка) фосфолипазой А<sub>2</sub> в присутствии 1 mM CaCl<sub>2</sub> в течение 40 мин при 30°C. Гидролиз останавливали с помощью 5 mM EDTA. Липидный экстракт анализировали двумерной хроматографией в тонком слое силикагеля KC<sub>6</sub>, промывая пластиинки в первом направлении смесью хлороформ — метанол — вода (65:25:4), а во втором — смесью хлороформ — метанол — 28%-ный водный аммиак (14:6:1). Вещества обнаруживали парами иода, зоны адсорбента, содержащие фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин, вырезали и определяли их радиоактивность на счетчике Mark II (Nuclear Chicago) с использованием в качестве сцинтиляционной жидкости раствора 0,4% PPO и 0,01% POPOP в толуоле.

Гидролиз яичного фосфатидилхолина (50 мкг Р) иммобилизованной фосфолипазой А<sub>2</sub> (10 мкг белка) проводили в течение 40 мин при 20°C в среде, содержащей 0,5% тритона X-100, 1 mM трис-HCl, 30 mM NaCl и 2 mM CaCl<sub>2</sub> (рН 7,8). Гидролиз иммобилизованной фосфолипазой А<sub>2</sub> (60 мкг белка) фосфолипидов в протопластах *M. lysodeikticus* (60 мкг Р) проводили в течение 30 мин при 20°C в 10 mM трис-HCl-буфере (рН 7,4), содержащем 0,8 M сахарозу и 2 mM CaCl<sub>2</sub>.

Во всех опытах объем инкубационной среды был равен 1 мл. Степень гидролиза фосфолипида (%) определялась как отношение количества фосфолипида, расщепленного фосфолипазой А<sub>2</sub>, к его количеству в контрольном опыте (без фермента).

Выражаем благодарность А. И. Мирошникову, любезно предоставившему препараты фосфолипазы А<sub>2</sub>.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Bergelson L. D., Barsukov L. I. (1977) *Science*, **197**, 224–230.
2. Nilsson O., Dallner G. (1975) *FEBS Lett.*, **58**, 190–193.
3. Nilsson O., Dallner G. (1977) *J. Cell Biol.*, **72**, 568–583.
4. Higgins J. A., Dawson R. M. C. (1977) *Biochim. et biophys. acta*, **470**, 342–356.
5. Sundler R., Sarcione S. L., Alberts A. W., Vagelos P. R. (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 3350–3354.
6. Adamich M., Voss H. F., Dennis E. A. (1978) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **189**, 417–423.
7. Adamich M., Dennis E. A. (1978) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **80**, 424–428.
8. van den Besselaar A. M. H. P., de Kruijff B., van den Bosch H., van Deenen L. L. M. (1978) *Biochim. et biophys. acta*, **510**, 242–255.
9. Zilversmit D. B., Hughes M. E. (1977) *Biochim. et biophys. acta*, **469**, 99–110.
10. Stier A., Finch S. A. E., Bösterling B. (1978) *FEBS Lett.*, **91**, 109–112.
11. de Kruijff B., van den Besselaar A. M. H. P., Cullis P. R., van den Bosch H., van Deenen L. L. M. (1978) *Biochim. et biophys. acta*, **514**, 1–8.
12. Cullis P. R., de Kruijff B. (1978) *Biochim. et biophys. acta*, **507**, 207–218.
13. Cullis P. R., de Kruijff B. (1978) *Biochim. et biophys. acta*, **513**, 31–42.
14. Виаторов А. В., Василенко И. А., Барсуков Л. И., Евстигнеева Р. П., Бергельсон Ю. Д. (1979) *Докл. АН СССР*, **246**, 478–482.
15. Апсалон У. Р., Шамборант О. Г., Мирошников А. И. (1977) *Биоорган. химия*, **3**, 1553–1559.
16. Dawson R. M. C. (1963) *Biochem. J.*, **88**, 414–423.
17. Барсуков Л. И., Кулаков В. И., Бергельсон Ю. Д. (1977) *Биохимия*, **42**, 1539–1555.
18. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265–275.
19. Bligh E. G., Dyer W. J. (1959) *Can. J. Biochem. and Physiol.*, **37**, 911–917.
20. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y., Vasendin I. M. (1975) *J. Chromatogr.*, **114**, 129–141.

Поступила в редакцию  
1.XI.1979

## IMMOBILIZED PHOSPHOLIPASE A<sub>2</sub> AS A MEMBRANE PROBE

BARSUKOV L. I., KISEL M. A., IVANOVA V. P., BERGELSON L. D.

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

Phospholipase A<sub>2</sub> (E.C. 3.4.1.4) from the cobra venom (*Naja naja oxiana*) has been covalently immobilized on BrCN-Sepharose 4B. The immobilized enzyme was active towards phospholipid substrates in Triton X-100/phospholipid mixed micelles, as well as in biological membranes (bacterial protoplasts or rat liver microsomes). The transverse distribution of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in rat liver microsomes was studied with the use of the immobilized phospholipase A<sub>2</sub>.