



УДК 577.15.04

АКТИВНЫЙ ЦЕНТР ФОСФОЛИПАЗЫ A_2 ИЗ ЯДА
СРЕДНЕАЗИАТСКОЙ КОБРЫ.
КАТАЛИТИЧЕСКИ АКТИВНАЯ КАРБОКСИЛЬНАЯ ГРУППА

*Желковский А. М., Дьяков В. Л., Гинодман Л. М.,
Антонов В. К.*

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

Исследована модификация фосфолипазы A_2 из яда кобры *Naja naja oxiana* специфическим реагентом на карбоксильную группу — N-диазоацетил-N'-(2,4-динитрофенил)-этилендиамином (ДДЕ) и рядом других диазосоединений. Показано, что ДДЕ реагирует с одной карбоксильной группой в димере фосфолипазы A_2 , полностью инактивируя фермент. Неактивный фермент медленно регенерирует активность до 40—50% исходной без отщепления модификатора, что, по-видимому, обусловлено перестройкой субъединиц димера с образованием активных форм. Установлено, что модификация фермента происходит по остатку аспарагиновой кислоты. Ионы Ca^{2+} и конкурентный ингибитор профлавин практически не защищают фермент от ингибирования ДДЕ. Обсуждается функциональная роль карбоксильной группы в активном центре фермента. Предложена модель функционирования димера фосфолипазы A_2 при гидролизе водорастворимых субстратов.

Хотя фосфолипаза A_2 (КФ 3.1.1.4) из различных источников является объектом обширных кинетических [1], структурных [2,3] и кристаллографических [4] исследований, до сих пор нет четких данных о природе и функциях каталитических групп ее активного центра. Однозначно установлено [5—7] лишь то, что имидазольная группа остатка His⁵⁶ панкреатической фосфолипазы A_2 важна для ферментативной активности, но ее роль в катализе является предметом дискуссий. Высказывалось предположение [4] о каталитической роли остатков Asp⁵⁶ и Tyr³⁵, однако доказательства этого отсутствуют.

В настоящей работе мы показали *, что в активном центре фосфолипазы A_2 из яда среднеазиатской кобры (*Naja naja oxiana*) функционирует карбоксильная группа остатка аспарагиновой кислоты. Мы исследовали модификацию карбоксильных групп в этом ферменте диазосоединениями — реагентами, специфически блокирующими карбоксильные группы в белках с образованием сложноэфирной связи и хорошо зарекомендовавшими себя при исследовании кислых протеиназ [9]. Оказалось, что диазосоединения реагируют специфически с одной карбоксильной группой фермента в расчете на его димер, практически полностью его инактивируя.

Было исследовано действие на фосфолипазу A_2 трех диазосоединений: N-диазоацетил-N'-(2,4-динитрофенил)-этилендиамина (I), метилового

* Предварительное сообщение см. в работе [8].

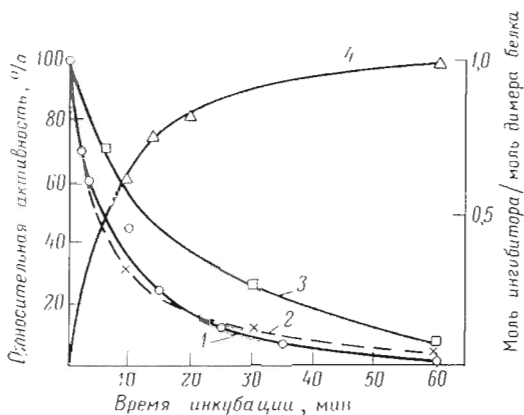
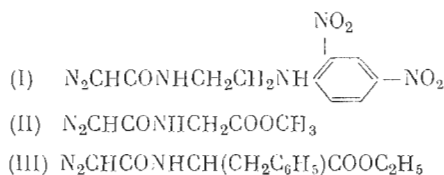


Рис. 1. Изменение каталитической активности при модификации фосфолипазы A_2 реагентами: (I) — I, (III) — 2, (II) — 3. 4 -- включение ингибитора (I) в ходе инактивации в белок. $[E]_0 = 7,7 \cdot 10^{-6}$ M, $[CuSO_4] = 2$ mM, концентрация ингибитора 2,5 mM; pH: для соединений (I) и (II) 5,6, для соединения (III) 6,5, $t = 25^\circ$

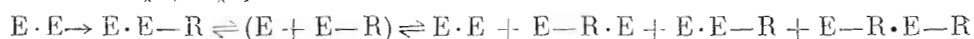
эфира N-диазоацетилглицина (II) и этилового эфира N-диазоацетил-L-фенилаланина (III):



Все три реагента модифицировали фермент со сравнимыми скоростями (рис. 1), однако наиболее удобным оказался реагент (I), содержащий хромофорную группировку ($\lambda_{\text{макс}} 360$ нм, $\epsilon 20500$ M $^{-1}$ ·см $^{-1}$), что позволяет количественно оценивать включение ингибитора в белок. Последующие опыты проводили только с этим ингибитором. Модификацию осуществляли при различных значениях pH среды в присутствии сульфата меди при 30-кратном избытке ингибитора. Активность фермента определяли титриметрически на pH-стате, используя в качестве субстрата 1,2-дibuтирсил-*m*-глицерофосфолихолин (IV). В ряде случаев за ходом модификации следили по кинетике гидролиза субстрата (IV), проводя реакцию непосредственно в ячейке pH-стата. В этих условиях реакционная смесь наряду с ферментом, модификатором и сернистой медью содержала также субстрат (IV) и хлористый кальций. Как видно из рис. 1, активность фермента практически полностью исчезает за 1 ч. Включение реагента контролировали по изменению оптической плотности растворов белка при 280 и 360 нм после освобождения от избытка реагентов гель-фильтрацией на сефадексе G-25. Было установлено, что практически полная инактивация (остаточная активность 3—5% от исходной) сопровождается включением 1 моль ингибитора на моль димера фосфолипазы A_2 или 0,5 моль в расчете на мономер ($M 13\ 000$). В контрольных опытах было показано, что в присутствии одних лишь ионов меди или только реагента (I) без ионов меди белок не инактивируется и реагент практически не включается в молекулу фермента. Оказалось, далее, что активность растворов модифицированного фермента после продолжительного стояния реакционной смеси (4—5 ч) заметно повышается. Полностью инактивированный фермент восстанавливает активность до 40—50% активности нативной фосфолипазы A_2 . При этом наблюдается лишь незначительное отщепление ингибитора (5—7%). Можно добиться практически эквимольного (в расчете на мономер)

включения ингибитора, если проводить повторные обработки модифицированного фермента в тех же условиях, причем каждая последующая обработка приводит к модификации половины от общего количества оставшегося немодифицированного белка. Те же результаты получаются, если в одном опыте реагент добавлять порциями с интервалом в 1—2 ч. Как показали опыты по гидроксиламинолизу модифицированного белка (см. ниже), в этих случаях кроме карбоксильной затрагиваются и другие группы фермента.

Полученные данные можно объяснить на основе модели несимметричного димера фосфолипазы A_2 , предположив, что модификации подвергается лишь одна карбоксильная группа в димере. При гель-фильтрации или стоянии раствора происходит перестройка субъединиц димера с образованием активных форм фермента:



При этом формы $E \cdot E$ и $E - R \cdot E$ обладают каталитической активностью и при повторной модификации вновь могут реагировать с диазореагентом. Очевидно, что скорость перестройки субъединиц значительно ниже, чем скорость спонтанного распада медного комплекса карбена, который является, очевидно, активным промежуточным соединением в реакции модификации карбоксильной группы [10]. Недавно [7] было показано, что при модификации остатков гистидина в фосфолипазе A_2 из яда пакистанской кобры (*Naja naja naja*) модифицируется также лишь один остаток гистидина на димер. На рис. 2 представлена рН-зависимость скорости инаktivации фосфолипазы диазореагентом (I). При логарифмировании этой зависимости выявляется участие в реакции двух групп с $pK_{\text{наж}}$ 5,7 и 7,0, однако трактовка этих результатов затруднительна, поскольку на скорость модификации могут влиять такие факторы, как стабильность комплекса медь-карбен, скорость диссоциации димеров и, возможно, реактивации фермента за счет спонтанного гидролиза сложноэфирной связи. Согласно общепринятой точке зрения, диазореагенты модифицируют в белках неионизированную карбоксильную группу [10]. Если влияние этой группы сказывается на наблюдаемой рН-зависимости скорости инаktivации фермента, то ее pK_a (наж) должно быть весьма высоким (~ 7). Следует отметить, что группа с $pK_a \sim 7$, функционирующая в ионизированном состоянии, проявляется также в рН-зависимости скорости реакции второго порядка катализируемого фосфолипазой A_2 гидролиза субстрата (IV) (рис. 3).

Модификация фермента диазореагентом (I) идет, по-видимому, без образования промежуточного ковалентного фермент-ингибиторного комплекса, поскольку при фиксированной концентрации диазореагента (2,5 мМ) скорость инаktivации линейно увеличивается при увеличении концентрации ионов меди до 4 мМ включительно, т. е. с увеличением концентрации медного комплекса карбена. Кроме того, как видно из рис. 1, диазореагенты разной структуры инаktivируют фосфолипазу A_2 с очень близкими скоростями.

То обстоятельство, что в ходе модификации реагирует остаток аспарагиновой кислоты, было подтверждено опытами по гидроксиламинолизу инаktivированной фосфолипазы A_2 . Препарат фермента, содержащий 1 моль ингибитора на моль мономера, обрабатывали 0,5—1 М раствором гидроксилamina при рН 8—9 в течение 20—24 ч. При этом наблюдалось отщепление 80—90% ингибитора и активность фермента практически не регенерировалась. Судя по гидроксаматной реакции, в белок включается ~ 1 моль гидроксилamina на моль мономера.

Кроме того, ингибированный белок подвергали восстановлению $NaBH_4$. В полном кислотном гидролизате восстановленного белка обнаруживается гомосерин в количестве 0,7 моль на моль препарата. Попытки локализовать модифицированную группу аспарагиновой кислоты в последовательности фосфолипазы A_2 дают основание предполагать, что эта

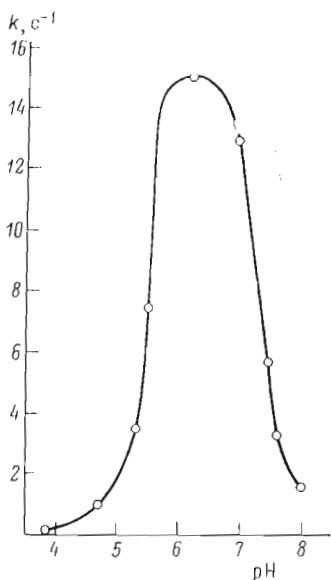


Рис. 2

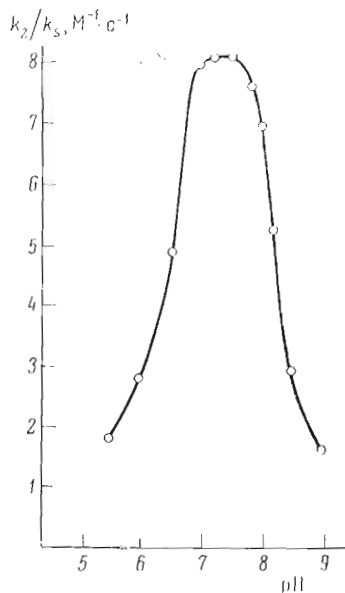


Рис. 3

Рис. 2. Зависимость скорости инактивации фосфолипазы A_2 диазореагентом (I) от pH среды. $[E]_0 = 7,7 \cdot 10^{-6} \text{ M}$

Рис. 3. Зависимость скорости реакции второго порядка катализируемого фосфолипазой A_2 гидролиза субстрата (IV). $[E]_0 = 7,7 \cdot 10^{-6} \text{ M}$

группа находится вблизи единственного остатка гистидина в белке. Работа в этом направлении продолжается и будет предметом отдельного сообщения.

Какова функциональная роль модифицируемой карбоксильной группы? К сожалению, получить данные по защите субстратом модифицируемого остатка не удастся, так как короткоцепочечные лецитины (типа IV) имеют величину K_m , значительно превышающую критическую концентрацию мицеллообразования [11], а использование мицеллярных растворов не позволяет однозначно интерпретировать данные вследствие распределения ингибитора между водной и мицеллярными фазами. Поэтому мы испытали защитное действие конкурентного ингибитора фосфолипазы A_2 — профлавина [11]. Оказалось, что добавление в реакционную систему профлавина в концентрации, превышающей константу его комплексообразования с ферментом ($K_m \approx 0,7 \text{ mM}$), практически не сказывается на скорости инактивации фермента. Таким образом, модифицируемая карбоксильная группа, по-видимому, расположена вне гидрофобной области субстратсвязывающего участка фермента.

Исследование влияния ионов Ca^{2+} на инактивацию фосфолипазы A_2 диазореагентом показало, что Ca^{2+} не только не снижает скорость или степень включения ингибитора, но несколько ее увеличивает. По-видимому, этот эффект связан с изменением скорости перестройки димеров в модифицированном белке (рис. 4).

Можно предположить, что остаток аспарагиновой кислоты входит в каталитический центр фермента, играя роль или нуклеофила, или донора протонов. Нельзя также исключить участия этого остатка в фиксации субстрата за счет образования ионной пары с положительно заряженной диметиламиногруппой лецитина. Выяснение роли модифицируемой группы в катализе фосфолипазой A_2 нуждается в дополнительном исследовании.

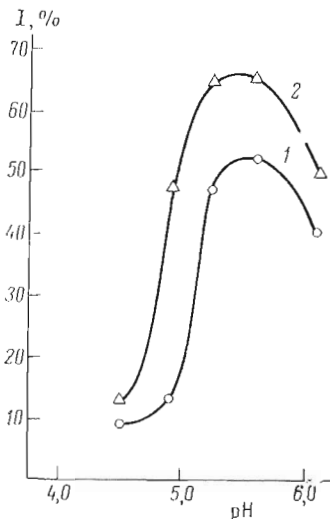


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость включения ингибитора (I) в молекулу мономера фосфолипазы A_2 от pH среды в отсутствие (1) и присутствии ионов кальция (2). Время инкубации 1 ч при 25° . $[E]_0 = 7,7 \cdot 10^{-5} M$

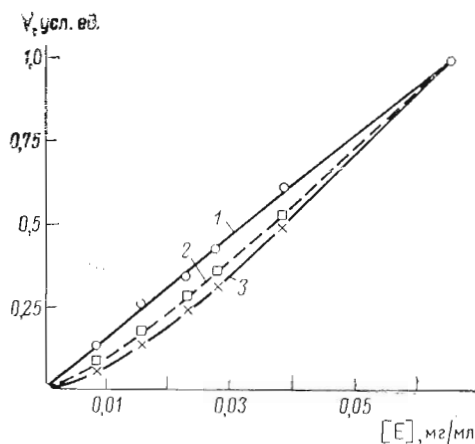


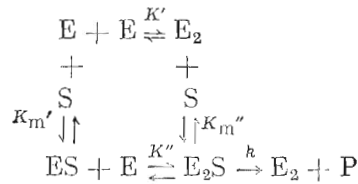
Рис. 5

Рис. 5. Зависимость активности, измеренной по гидролизу субстрата (IV), от концентрации фермента: 1 — экспериментальная зависимость; 2 — теоретическая кривая, вычисленная в предположении, что активность мономера составляет 10% от активности димерной формы и в системе существует мономер-димерное равновесие с $K = 2 \cdot 10^{-5} M$; 3 — теоретическая кривая, вычисленная в предположении, что активна лишь димерная форма

В заключение хотелось бы остановиться на некоторых особенностях функционирования фосфолипазы A_2 . Из данных по модификации карбоксильной группы и данных [7] по ингибированию фосфолипазы пакистанской кобры *n*-бромфенацилбромидом можно заключить, что каталитически активной формой фермента является димер. Исследование мономер-димерного равновесия методом микроколоночной гель-хроматографии (эта часть работы будет предметом отдельного сообщения) показало, что фосфолипаза A_2 при концентрации ниже 0,05 мг/мл существует преимущественно в виде мономера, причем константа диссоциации димера $K \sim 2 \cdot 10^{-5} M$. Эти результаты хорошо согласуются с литературными данными [12]. При оптимальном для активности значении pH (7,5) ионы Ca^{2+} практически не влияют на мономер-димерное равновесие. Поэтому, если активной формой является димер, то в области концентраций фермента, близких к константе диссоциации димера, зависимость активности фосфолипазы A_2 от концентрации белка должна была бы отклоняться от линейной.

На рис. 5 представлена полученная нами зависимость активности, измеренной по гидролизу соединения (IV), от концентрации фермента, а также нанесены для сравнения теоретические зависимости, учитывающие мономер-димерное равновесие в системе с $K \approx 2 \cdot 10^{-5} M$. Точки на теоретических кривых вычислены по методу, разработанному в работе [13] для диссоциирующих ферментативных систем, причем скорость гидролиза при максимальной концентрации фермента (0,065 мг/мл) принята за единицу. Как видно, в эксперименте наблюдается четкая линейная зависимость активности фосфолипазы A_2 от концентрации фермента, что не согласуется с указанными предположениями. Это различие можно объяснить тем, что в присутствии субстрата мономер-димерное равновесие смещается в сторону димера, т. е. фермент функционирует в соответствии с кинетической

схемой:



причем $K'' \ll K'$.

Ранее [11] мы показали, что обе боковые цепи водорастворимых субстратов вносят вклад в связывание с ферментом. Все это даст основание предположить следующую модель организации фермент-субстратного комплекса в случае фосфолипазы A_2 (рис. 6). Димер фермента организован асимметрично, так, что каталитически активный участок одной субъединицы маскирован в области межглобулярного контакта и не доступен модифицирующему агенту. Этот же участок во второй субъединице, а также сорбционные участки обеих субъединиц экспонированы в раствор. Субстрат может связываться как с мономерной формой, так и с димерной, причем ацильная группа в положении 1 и полярный фрагмент субстрата связываются с одной субъединицей, а ацильная группа в положении 2 — со второй субъединицей, в которой каталитически активный центр экспонирован. Если связывание происходит с мономером, то образование димерного фермент-субстратного комплекса облегчается за счет дополнительного взаимодействия присоединяющейся субъединицы с боковой цепью субстрата. В результате гидролиза сложноэфирной связи в положении 2 возникает возможность разделения субъединиц и тем самым разделения продуктов гидролиза. Такой механизм разделения, вероятно, особенно важен в случае мицеллярных субстратов. Образовавшиеся мономеры вновь способны к связыванию субстрата. Таким образом, в этой модели субъединицы фосфолипазы, будучи идентичными, выполняют фактически разные функции. Одна субъединица связывает субстрат, а вторая — уходящую группу и осуществляет катализ, причем каждая из субъединиц взаимозаменяема. Если эта модель правильна, то можно предположить, что фосфолипаза A_2 представляет собой эволюционно упрощенный тип более сложных субъединичных ферментов, у которых отдельные каталитические и

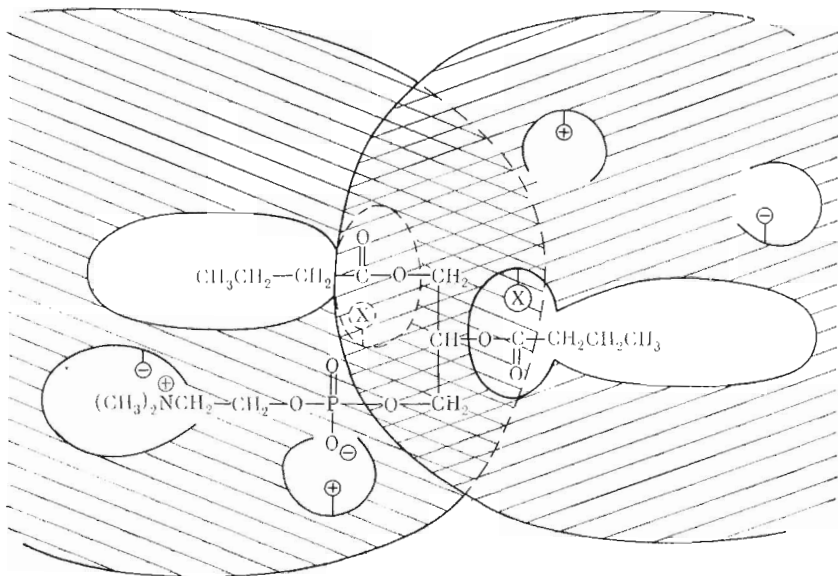


Рис. 6. Гишотетическая модель организации фермент-субстратного комплекса в случае фосфолипазы A_2

регуляторные функции разделены между субъединицами, имеющими различное строение. У фосфолипазы A_2 разделение функций связывания и катализа осуществляется в процессе фермент-субстратного взаимодействия путем временного выключения каталитических функций одной субъединицы при образовании димера.

Экспериментальная часть

Препарат фосфолипазы A_2 из яда кобры *Naja naja oxiana* (изофермент с изоэлектрической точкой 5,1) любезно предоставлен А. И. Мирошниковым (Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва). Характеристики фермента и критерии чистоты приведены в работе [14]. Диазокарбонильные ингибиторы, любезно предоставленные сотрудником нашей лаборатории Л. Д. Румшем, были синтезированы как описано ранее: ингибитор (I) — по методу [15], (II) — соответственно [16] и (III) — согласно [17]. Однокислотные лецитины природной (L) конфигурации получены по методу [11]. Коммерческими препаратами профлавина (ч.д.а., «Союзреактив»), гидроксилamina солянокислого (ч., Донецкий химзавод), сернокислой меди (ч.д.а., «Союзреактив»), хлористого кальция (ч., «Союзреактив»), боргидрида натрия (х.ч., «Союзреактив») и компонентами буферных растворов марки ч.д.а. пользовались без дополнительной очистки.

Ферментативную активность фосфолипазы A_2 определяли по гидролизу субстрата (IV) методом потенциометрического титрования в режиме рН-статирования (рН-стат ТТТ-60, Radiometer, Дания), используя автоматическую бюретку АВУ-13 объемом 0,25 мл. Реакции проводили в стеклянной термостатированной кювете, снабженной магнитной мешалкой (объем 1 мл, 25°, рН 7,0, концентрация Ca^{2+} 20 мМ, концентрация субстрата 12,5 или 25 мМ). Концентрацию фермента варьировали в зависимости от степени инактивации фермента в ходе модификации. Опыты по кинетике инактивации фосфолипазы A_2 диазокарбонильным ингибитором (I) (непосредственно в ячейке рН-стага) проводили в тех же условиях, используя кроме перечисленных компонентов 2 мМ сернокислую медь, 2,5 мМ ингибитор и $7,7 \cdot 10^{-5}$ М фермент.

Включение ингибитора в белок рассчитывали по изменению оптической плотности при 280 и 360 нм, используя для расчета определенные нами значения $\epsilon_{280} = 23\,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, $\epsilon_{360} = 20\,500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ и учитывая вклад ингибитора в полосу поглощения белка при 280 нм, составляющий 34% от поглощения при 360 нм.

Модификацию фосфолипазы A_2 диазокарбонильными ингибиторами проводили в зависимости от требуемого рН в 0,05 М ацетатном или 0,1 М боратном буфере в присутствии 2 мМ Cu^{2+} . Концентрацию фермента варьировали от $3,8 \cdot 10^{-5}$ до $3,8 \cdot 10^{-4}$ М. Тридцатикратный избыток ингибитора вносили после 10—15 мин инкубации белка с раствором медной соли в виде ацетонового раствора одновременно или 5—6 порциями. Концентрация ацетона в реакционной среде не превышала 10%. По завершении реакции смесь подвергали гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-25 в 1% уксусной кислоте и лиофилизовали.

В опытах по инактивации фосфолипазы A_2 в присутствии ионов кальция концентрация последних составляла 10^{-2} М.

Гидроксиламинолиз модифицированного белка проводили в 0,5—1 М растворе гидроксилamina при рН 8—9 и концентрации белка $7,7 \cdot 10^{-5}$ М с последующим обессоливанием на сефадексе G-25 и лиофилизацией. Гидроксамовые кислоты анализировали по методике, описанной ранее [18]. Восстановление сложноэфирной связи боргидридом натрия с одновременным восстановлением дисульфидных связей и их карбоксиметилированием осуществляли по методу [19].

Аминокислотный анализ кислотного гидролизата белка проводили на автоматическом анализаторе D-500 (Durrum, США).

ЛИТЕРАТУРА

1. Verger R., de Haas G. H. (1976) *Ann. Rev. Biophys. and Bioengn.*, 5, 77—117.
2. Joubert F. J. (1977) *Biochim. et biophys. acta*, 493, 216—227.
3. Henrikson R. L., Krueger E. T., Kein P. S. (1977) *J. Biol. Chem.*, 252, 4913—4921.
4. Drenth J., Enzing C. M., Kalk K. M., Vessies J. C. A. (1976) *Nature*, 264, 373—377.
5. Volwerk J. J., Pieterse W. A., de Haas G. H. (1974) *Biochemistry*, 13, 1446—1454.
6. Viljoen C. C., Visser L., Botes D. P. (1977) *Biochim. et biophys. acta*, 483, 107—120.
7. Roberts M. F., Deems R. A., Mincey T. C., Dennis E. A. (1977) *J. Biol. Chem.*, 252, 2405—2411.
8. Желковский А. М., Апсалон У. Р., Дьяков В. Л., Гинодман Л. М., Мирошников А. И., Антонов В. К. (1977) *Биоорган. химия*, 3, 1430—1432.
9. Clement G. E. (1973) in: *Progr. Bioorg. Mech.*, 2, 177—238.
10. Lundbland R. L., Stein W. H. (1969) *J. Biol. Chem.*, 244, 154—160.
11. Желковский А. М., Дьяков В. Л., Антонов В. К. (1978) *Биоорган. химия*, 4, 404—409.
12. Deems R. A., Dennis E. A. (1975) *J. Biol. Chem.*, 250, 9008—9012.
13. Апсалон У. Р., Шамборант О. Г., Мирошников А. И. (1977) *Биоорган. химия*, 3, 1553—1559.
14. Курганов Б. И. (1967) *Молекулярн. биология*, 1, 17—27.
15. Stepanov V. M., Lobareva L. S., Mal'tsev N. I. (1968) *Biochim. et biophys. acta*, 151, 719—721.
16. Curtius Th., Darapsky A. (1906) *Chem. Ber.*, 39, 1373—1378.
17. Козлов Л. В., Гинодман Л. М., Орехович В. Н. (1967) *Биохимия*, 32, 1011—1019.
18. Bergmann F., Segal R. (1956) *Biochem. J.*, 62, 542—546.
19. Grestfield A. M., Moore S., Stein W. H. (1963) *J. Biol. Chem.*, 238, 622—627.

Поступила в редакцию
2.VI.1978

ACTIVE SITE OF PHOSPHOLIPASE A₂ FROM THE MIDDLE ASIAN COBRA VENOM. A CATALYTICALLY ACTIVE CARBOXYL GROUP

ZHELKOVSKY A. M., DYAKOV V. L., GINODMAN L. M., ANTONOV V. K.

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

Modification of phospholipase A₂ of the *Naja naja oxiana* venom by the specific carboxyl-reacting compound N-diazoacetyl-N'-(2,4-dinitrophenyl)-ethylenediamine (DDE) and by some other diazocompounds has been studied. DDE reacts with one of the carboxyls in the phospholipase A₂ dimer resulting in the complete inactivation of the enzyme. The inactive enzyme slowly restores up to 40—50 per cent of the initial activity, without a loss of the modifier apparently, due to the recombination of the dimer subunits and the formation of catalytically active forms. It is found that modification affects an aspartic acid residue. Ca²⁺ ions and a competitive inhibitor, proflavin, do not protect the enzyme against modification by DDE. The functional role of the carboxyl group in the phospholipase A₂ active site is discussed. A model for the functioning of the enzyme dimer upon the hydrolysis of water-soluble substrates is proposed.