



УДК 577.153.211.02

АРГИНИН В АКТИВНОМ ЦЕНТРЕ ФОСФОЛИПАЗЫ  $A_2$   
ИЗ ЯДА КОБРЫ

Ансалон У. Р., Мирошников А. И.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шелякина  
Академии наук СССР, Москва

Химической модификацией фосфолипазы  $A_2$  (изофермент E3) из яда кобры 1,2-циклогександионом и ацетилацетоном показано, что фермент имеет функционально важный остаток аргинина, ответственный за связывание с молекулой субстрата. Найдено, что функционально важный остаток аргинина расположен в 16-м положении полипептидной цепи.

Информация о природе и функции каталитических групп активного центра фосфолипаз  $A_2$  (КФ 3.1.1.4) из различных источников ограничивается лишь локализацией в нем остатка гистидина [4–5] и идентификацией остатка аспарагиновой кислоты [6, 7]. По данным исследования гидролиза субстратов [8] и конкурентного ингибирования [9], была показана важность фосфатной или другой отрицательно заряженной группы в молекуле субстрата для панкреатической фосфолипазы  $A_2$ . Такая специфичность предполагает существование в белковой молекуле аннонсвязывающего участка, несущего положительный заряд.

Целью настоящей работы является выявление и локализация аннонного центра связывания фосфолипазы  $A_2$ , выделенной из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana*.

На роль аннонного центра связывания в ферменте при трехмерной ориентации фосфолипида в фермент-субстратном комплексе могут претендовать положительно заряженные  $\epsilon$ -аминогруппы остатков лизина и гуанидиногруппы остатков аргинина. Ранее мы показали, что превращение остатков лизина в остатки гомоаргинина обработкой фермента *O*-метилпизоучевиной не приводит к изменению ферментативных свойств белковой молекулы и даже ацелирование всех  $\epsilon$ -аминогрупп только на 25% снижает способность фермента к гидролизу фосфолипидов\*. Следовательно, на роль фосфатсвязывающего центра претендуют только положительно заряженные гуанидиновые группы остатков аргинина. Следует отметить, что из известных в настоящее время ферментов, обладающих функционально важным остатком аргинина в активном центре, более половины имеют в качестве субстратов или коферментов эфиры или ангидриды фосфорной кислоты (NADH, пиридоксальфосфат, АТР, АДФ и т. д.). К ним относятся щелочная фосфатаза [10], РНК-зависимая ДНК-полимераза [11], адепшлатциклаза [12], глутаматсинтетаза [13] и др.

\* Данные будут опубликованы в одном из ближайших номеров журнала.

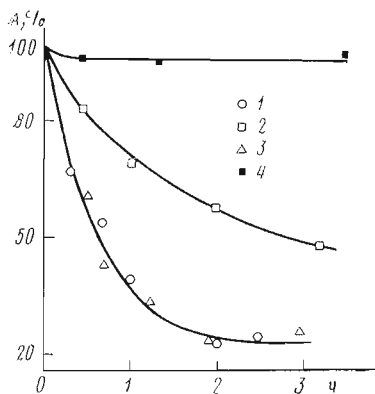


Рис. 1

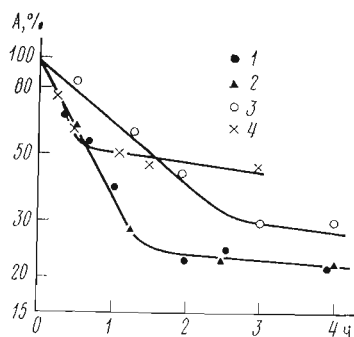


Рис. 2

Рис. 1. Инактивация фосфолипазы циклогександионом в стандартных условиях (0,05 М боратный буфер, pH 9,2; 0,05 М циклогександион) (1) и защита лизолецитином (2 мг/мл) без добавок (2) или в присутствии 0,01 М  $\text{CaCl}_2$  (3) или  $\text{SrCl}_2$  (4)

Рис. 2. Инактивация фосфолипазы (шкала активности — логарифмическая) циклогександионом: в стандартных условиях (см. подпись к рис. 1) (1), с добавкой 0,01 М  $\text{CaCl}_2$  (2), в боратном буфере, pH 8,3 (3), в 0,1 М N-метилморфолин-HCl-буфере, pH 8, 9, содержащем 0,01 М  $\text{CaCl}_2$  (4)

Идентифицирование функционально важных остатков в белковых молекулах удается осуществить, как правило, применяя приемы химической модификации. Для модификации гуанидиновых групп в белках используются различные дикарбонильные соединения [14]. Наиболее часто употребляются  $\alpha$ -дикетоны (2,3-бутандион, 1,2-циклогександион), которые образуют циклические аддукты, стабилизируемые борат-ионами. Эти модификации являются обратимыми, и относительная неустойчивость получаемых продуктов создает определенные неудобства. Глюкоксаль и его монопроизводные также могут быть использованы для модификации остатков аргинина в белках. При этом образуются производные, включающие 2 моль реагента на 1 остаток аргинина [15]. Хотя механизм последней реакции не выяснен до конца, фенилглюкоксаль нередко применяется в химии ферментов. Другим типом реагентов являются различные  $\beta$ -дикетоны (или диальдегиды), образующие с гуанидиногруппами аргинина стабильные гетероциклические производные. Наиболее используемые в химии белка представители этого класса — ацетилацетон [16] и тетраэтоксипропан [17], однако одновременное взаимодействие с аминогруппами лизина в первом случае и жесткие условия во втором ограничивают широкое использование этих реагентов при выяснении функциональной важности остатков аргинина в белках.

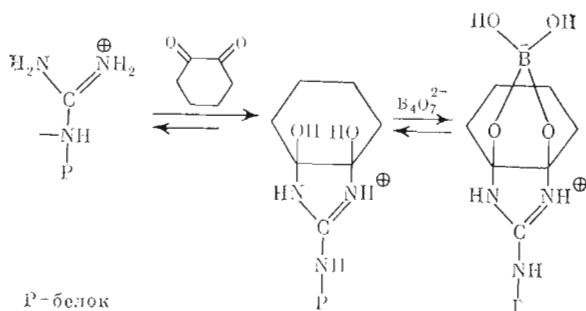
В настоящей работе описаны химические модификации изофермента E3 фосфолипазы  $A_2$  из яда кобры 1,2-циклогександионом и ацетилацетоном, протекающие без нарушения третичной структуры белка. Молекула белка содержит пять остатков аргинина, расположенных в положениях 16, 30, 42, 94 и 117 полипептидной цепи [18]. При обработке белка 1,2-циклогександионом в боратном буфере (pH 9,2) происходит модификация 1,8 остатков аргинина на 1 моль белка, сопровождающаяся инактивацией фермента с  $t_{1/2}$  40 мин (при pH 8,3 заметно медленнее —  $t_{1/2}$  90 мин) (рис. 1 и 2). Известно, что кофактор  $\text{Ca}^{2+}$  и его аналоги, ингибиторы  $\text{Sr}^{2+}$  и  $\text{Ba}^{2+}$ , способны замедлять специфическую модификацию фосфолипазы по остатку гистидина [1–3], однако в случае реакции 1,2-циклогександиона с остатками аргинина или кальций, ни стронций не защищают фосфолипазу яда кобры от инактивации (рис. 2, 2). Лизолецитин, который можно рассматривать как аналог субстрата, существенно снижает скорость инактивации до  $t_{1/2}$  160 мин (рис. 1, 2). В присутствии ионов кальция эта способность

### Свойства модифицированных фосфолипаз

Реагент	Число модифицированных остатков аргинина		Удельная активность, % от нативного фермента	
	по аминокислотному анализу	спектрофотометрически, $\lambda$ 300 нм	без добавок	с боратом, pH 9
1,2-Циклогександион	1,8	—	80	21 (0,01 M)
Ацетилацетон	0,7	0,9	95	67 (0,02 M)

лизолецитина не проявляется (рис. 1, 3), возможно, по причине гидролиза лизолецитина в этих условиях [19, 20]. Совместно с  $\text{SrCl}_2$  лизолецитин защищает фермент от инактивации практически полностью.

Следует отметить, что инактивация модифицированного циклогександионом фермента, отделенного гелем-фильтрацией от избытка реагентов, проявляется в должной мере только в присутствии борат-ионов (таблица). При pH 4 способность борат-ионов инактивировать фермент проявляется слабее — активность снижается только до 41% (по-видимому, из-за меньшей эффективной концентрации борат-ионов в кислой среде). Этот факт можно объяснить наличием положительного заряда в аншопсвязывающем участке даже после модификации фермента циклогександионом, так как из механизма реакции [21] следует, что гуанидиногруппа при модификации сохраняет положительный заряд, который нейтрализуется только в комплексе с борат-ионом:



Зависимость функциональной активности модифицированного фермента от наличия борат-ионов проявляется и для других ферментов [22, 23], имеющих в активном центре остатки аргинина. Помимо того что борат-ион влияет на свойства модифицированного фермента, во время реакции он сдвигает равновесие вправо, всегда способствуя более полному (и более быстрому) протеканию модификации  $\alpha$ -дикетонами. Возможно, именно отсутствием вклада борат-ионов в образование комплекса циклогександион — гуанидиногруппа аргинина можно объяснить отличие кинетики ингибирования фосфолипазы в N-метилморфолиновом буфере вместо боратного: инактивация проходит с такой же начальной скоростью, но явно в меньшей степени (рис. 2, 4).

Данные, приведенные в таблице и на рис. 2, показывают, что фосфолипаза  $A_2$  после селективной модификации циклогександионом имеет 20% остаточной ферментативной активности. Такая же неполнота инактивации наблюдается при модификации этим реагентом других ферментов, имеющих функционально важный остаток аргинина [22], возможно, из-за обратного характера реакции. Увеличение времени реакции до 16 ч вместо 4 ч и использование большого количества реагента приводит к полностью инактивированному производному и без добавления борат-ионов, к тому

же вызывает протекание побочной реакции по свободным аминогруппам, о чем свидетельствует появление поглощения при 440 нм ( $E_{440}^{0,1} = 0,15$ , см. [24]).

Для химической модификации остатков аргинина в молекуле фосфолипазы был использован также 2,4-пентадион (ацетилацетон). Оказалось, что модификацию фермента этим реагентом можно проводить как в 0,5 М карбонатном буфере [16], так и в трис-хлоридном в присутствии  $\text{CaCl}_2$ . Известно, что помимо гуанидиногрупп аргинина в реакцию с ацетилацетоном вступают и все свободные аминогруппы [16]. Деблокирование последних проводили обработкой модифицированного белка 20% уксусной кислотой. Как в процессе самой модификации, так и после обработки кислотой фосфолипаза при модификации ~1 остатка аргинина на 1 моль белка сохраняла практически полную удельную активность, но в небольшой степени теряла ее в присутствии борат-ионов (таблица). Хотя специфическое взаимодействие 2-аминозамещенного пиримидинового основания — продукта взаимодействия ацетилацетона с гуанидиногруппами аргинина — с борат-ионом невозможно, образование этого гетероциклического производного является процессом обратимым и борат-ион может связываться с нециклическим промежуточным соединением, сдвигая тем самым равновесие не в пользу пиримидинового цикла. Аналогичное явление описано при модификации этим реагентом остатка аргинина в различных белках [23], например, эффект борат-ионов на ферментативную активность модифицированной глутаматдекарбоксилазы проявляется одинаково при обработке белка бутандиолом, 1,2-циклогександиолом и ацетилацетоном.

Хотелось бы остановиться на оценке достоверности методов определения степени модификации остатков аргинина. Ввиду отсутствия радиоактивно помеченных реагентов и неудовлетворительных результатов, получаемых в нашем случае при применении методики включения в белок циклогександиона в виде цветного комплекса его диоксима с  $\text{Ni}^{2+}$  [22], мы в основном определяли количество прореагировавших остатков по убыли аргинина в белковых гидролизатах. Хотя этот метод может оказаться малоприменимым для других белков, в случае фосфолипазы он дает достаточно точные и воспроизводимые результаты.

При модификации  $\beta$ -дикетонами количество образовавшегося пиримидинового цикла, поглощающего при 300 нм, предложено [16] определять спектрофотометрически. Строго говоря, возрастание поглощения в области 300 нм за длительное время реакции может быть вызвано не только образованием необходимого продукта, но и просто агрегацией белка или другими причинами. Поэтому нами был поставлен контрольный опыт с выдерживанием фермента в условиях реакции без добавления ацетилацетона; в итоге было обнаружено только небольшое повышение поглощения в районе 300—340 нм (относительно  $D_{280}$ ), соответствующее образованию менее чем 0,2 остатка  $\text{N}^\epsilon$ -(2-пиримидил)орнитина на молекулу белка (это учитывалось при оценке степени модификации). Кроме того, в пользу прошедшей реакции в нашем случае свидетельствует появление в спектре КД модифицированного продукта небольшого, но четкого максимума при 315 нм, при сохранении спектра в целом. Остается еще добавить, что на включение реагента в фосфолипазу указывает влияние добавления борат-ионов на ферментативную активность белка, модифицированного как тем, так и другим реагентом.

С целью локализации модифицированных 1,2-циклогександиолом или ацетилацетоном остатков аргинина в полипептидной цепи молекулы фосфолипазы белок после блокирования  $\epsilon$ -аминогрупп и разрушения дисульфидных связей подвергался ограниченному гидролизу трипсином по остаткам аргинина. Согласно первичной структуре изучаемой фосфолипазы  $L_2$  [18], в результате ограниченного трипсинолиза должны образоваться пептиды со следующими N-концевыми остатками аминокислот: Ser, Gly, Leu и Cys в соответствующей форме (цистеиновая кислота в случае моди-

фикации 1,2-циклогександионом и карбоксиметилцистеин при модификации ацетилацетоном). Такой результат и был получен при N-концевом анализе гидролизата трипсином соответствующих обработанных образцов немодифицированной фосфолипазы. В гидролизатах обоих модифицированных образцов из упомянутых остатков отсутствовал только серин, что однозначно указывает на место атаки фосфолипазы дикетонами — остаток аргинина в положении 16, связанный с серином.

Строго говоря, приведенная стратегия в целом не позволяет надежно обнаружить частично (до 30–40%) модифицированные остатки аргинина. К тому же N-концевой остаток цистеина образуется в двух точках расщепления полипептидной цепи фермента — после Arg<sup>12</sup> и Arg<sup>117</sup>, и, чтобы исключить возможность ошибки, нами была проведена гель-фильтрация гидролизата модифицированного циклогександионом фермента с целью отделения образующегося C-концевого дипептида Cys(SO<sub>3</sub>H)<sup>118</sup>-Gln<sup>119</sup> от фракции остальных более крупных фрагментов. N-Концевой анализ показал значительное содержание цистеиновой кислоты в обеих фракциях.

C-Концевой анализ высокомолекулярной основной фракции карбоксипептидазами А и В показал отсутствие в ней пептидов с C-концевым глутамином. Это является доказательством расщепления белковой цепи трипсином по связи Arg<sup>117</sup>-Cys(SO<sub>3</sub>H)<sup>118</sup>, так как, судя по первичной структуре белка, единственным фрагментом ограниченного трипсинолиза, имеющим глутамин на C-конце, должен быть дипептид Cys(SO<sub>3</sub>H)<sup>118</sup>-Gln<sup>119</sup>, отделенный гель-фильтрацией.

Таким образом, показано, что фосфолипаза А<sub>2</sub> из яда среднеазиатской кобры модифицируется обоими реагентами по остатку аргинина в положении 16. При модификации 1,2-циклогександионом происходит существенная потеря активности, проявляющаяся в присутствии борат-ионов. Защита лизолецитином, а также зависимость ингибирования от присутствия борат-ионов указывает на участие модифицируемого остатка аргинина-16 в связывании отрицательно заряженной фосфатной группы молекулы субстрата.

Напомним, что, по данным рентгеноструктурного анализа панкреатического зимогена фосфолипазы А<sub>2</sub> [25], наиболее близким к активному центру является остаток аргинина в положении 100. По гомологии этот остаток соответствует Arg<sup>94</sup> в нашем белке. Не отрицая ценности рентгеноструктурного анализа для развития представлений о структуре и механизме действия фосфолипаз А<sub>2</sub>, следует осторожно относиться к гипотезе о роли Arg<sup>100</sup>, так как рентгеноструктурные данные, демонстрирующие близость к гистидину активного центра этого остатка аргинина, получены для белка в присутствии ионов Ca<sup>2+</sup>, но без субстрата или его аналога.

Авторы благодарят акад. Ю. А. Овчинникова за интерес к работе и ценные советы и замечания.

### Экспериментальная часть

Выделение фосфолипазы А<sub>2</sub> (изофермент ЕЗ) из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana* описано ранее [26]. Ферментативную активность образцов определяли при 37°С ацидометрическим методом, используя в качестве субстрата синтетический дипальмитоилфосфатидилхолин в смешанных мицеллах с тригоном Х-100 (по ранее описанной методике [26]). В этих условиях удельная активность фермента равна 0,3 рН/мл·мкг белка. Для определения активности модифицированных образцов их растворяли в 0,5 М уксусной кислоте, затем добавляли борат натрия и в завершение нейтрализовали раствор NaOH до pH 9, соблюдая часовые интервалы между добавлением компонента и последующим взятием проб для измерения активности.

Количество модифицированных остатков аргинина определяли по данным аминокислотного анализа после 24-часового гидролиза азетропной HCl. Анализ проводили на приборе D-500 (Durrum, США) с коррекцией [22]. УФ-спектры снимали на приборе Gilford-250 (США) в 0,03 M NaHCO<sub>3</sub>; степень модификации ацетилацетоном вычисляли по ε<sub>300</sub> 3400 [16].

*Модификация 1,2-циклогександионом.* К раствору белка (~1 мг/мл) в 0,05 M боратном буфере (pH 9,2) при 20° C добавляли твердый 1,2-циклогександион (5 мг/мл) (Pierce, США) и перемешивали 4 ч (при необходимости отбирая пробы для определения активности). Для остановки реакции смесь выливали в холодную 80% уксусную кислоту и обессоливали на сефадексе G-25 в 30% уксусной кислоте. Модифицированный продукт хранили в лиофилизованном состоянии.

*Модификация ацетилацетоном.* К раствору белка (1–2 мг/мл) в 0,05 M трис-HCl-буфере (pH 9), содержащем 5 mM CaCl<sub>2</sub>, добавляли реагент (15 мкл/мл раствора), встряхивали его, доводили pH до 8,8 и оставляли на неделю при 20° C в темноте. Смесь подкисляли 1% уксусной кислотой, выдерживали 1 ч и отделяли белок от низкомолекулярных веществ гель-фильтрацией на сефадексе G-25 в 1% уксусной кислоте. Очистку главного продукта проводили на анионообменной целлюлозе DE-32 (Whatman, Англия) в трис-HCl-буфере (pH 8) в линейном градиенте NaCl от 0 до 0,2 M.

*Локализация модифицированных остатков.* Реакцию с циклогександионом проводили с белком, предварительно ацетилированным уксусным ангидридом\*, для того чтобы в процессе дальнейшей обработки избежать расщепления трипсином по остаткам лизина и сохранить модификацию по остатку аргинина. После расщепления дисульфидных связей надмуравьиной кислотой [27] образец гидролизovali 2 ч при 37° C (Worthington, США), 1 : 500, в 0,1 M боратном буфере (pH 8,5). N-Концевые аминокислоты образовавшихся пептидов были определены в виде дапсильных производных после ТСХ на силикагеле.

Отделение C-концевого дипептида от остальной массы гидролизата проводили путем гель-фильтрации на сефадексе G-25 (1,5×35 см) в 30% уксусной кислоте. C-Концевые аминокислоты были определены с помощью аминокислотного анализа после обработки смеси пептидов одновременно карбоксипептидазами А и В [28].

В случае модификации ацетилацетоном вначале была проведена реакция по остаткам аргинина, а потом блокирование аминогрупп. Для восстановления дисульфидных связей использовали обработку дитиоэритритом с последующим карбоксиметилированием [29]. Расщепление трипсином было проведено аналогично предыдущему опыту, но в натрий-карбонатном буфере (0,1 M, pH 8,5).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Volwerk J. J., Pieterson W. A., de Haas G. H. (1974) *Biochemistry*, 13, 1446–1454.
2. Halpert J., Eaker D., Karlsson E. (1976) *FEBS Lett.*, 61, 72–76.
3. Roberts M. F., Deems R. A., Mincey T. C., Dennis E. A. (1977) *J. Biol. Chem.*, 252, 2405–2411.
4. Viljoen C. C., Visser L., Botes D. P. (1977) *Biochim. et biophys. acta*, 483, 107–120.
5. Kondo K., Toda H., Narita K. (1978) *J. Biochem.*, 84, 1291–1300.
6. Желковский А. М., Апсалоу У. Р., Дьяков В. Л., Гинодман Л. М., Мирошников А. И., Антонов В. К. (1977) *Биоорган. химия*, 3, 1430–1431.
7. Желковский А. М., Дьяков В. Л., Гинодман Л. М., Антонов В. К. (1978) *Биоорган. химия*, 4, 1665–1672.
8. Bonsel P. P. M., de Haas G. H., Pieterse W. A., van Deenen L. L. M. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, 270, 364–382.
9. Литвинко Н. М., Хургии Ю. И., Каверзнева Е. Д. (1977) *Биохимия*, 42, 85–93.
10. Daemen F. J., Takahashi K. (1974) *J. Biochem.*, 75, 455–462.

\* Экспериментальные подробности будут опубликованы отдельно (см. следующее сообщение Апсалоу и др. в одном из ближайших номеров журнала).

11. Borders C. L., Riordan J. F., Auld D. S. (1975) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **66**, 490–495.
12. Berghäuser J. (1975) *Biochem. et biophys. acta*, **397**, 370–379.
13. Powers S. G., Riordan J. F. (1975) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 2616–2624.
14. Yankeelov J. A. (1972) in: *Methods in Enzymol.* (Hirs C. H. W., Timasheff S. N. eds), vol. 25, pp. 566–577, Acad. Press, N. Y.
15. Takahashi K. (1968) *J. Biol. Chem.*, **243**, 6171–6179.
16. Gilbert H. F., O'Leary M. H. (1975) *Biochemistry*, **14**, 5194–5199.
17. Муранов А. В., Модянов Н. Н. (1979) *Биоорг. химия*, **5**, 210–216.
18. Овчинников Ю. А., Мирошников А. И., Назимов И. В., Апсалон У. Р., Солдато-ва Л. Н. (1979) *Биоорг. химия*, **5**, 805–813.
19. Shiloah I., Klibansky Ch., de Vries A., Berger A. (1973) *J. Lipid Res.*, **14**, 267–278.
20. Shiloah I. (1974) *Israel J. Chem.*, **12**, 605–614.
21. Patthy L., Smith E. L. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 557–564.
22. Patthy L., Smith E. L. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 565–569.
23. Tunncliffe G., Ngo T. T. (1978) *Experientia*, **34**, 989–990.
24. Liu W. H., Feinstein G., Osuga D. T., Haynes R., Feeney R. E. (1968) *Biochemistry*, **7**, 2886–2892.
25. Drenth J., Enzing C. M., Kalk K. H., Vessies J. C. A. (1976) *Nature*, **264**, 373–377.
26. Апсалон У. Р., Шамборант О. Г., Мирошников А. И. (1977) *Биоорг. химия*, **3**, 1553–1559.
27. Hirs C. H. W. (1967) in: *Methods in Enzymology* (Hirs C. H. W., ed.), vol. 11, pp. 197–199, Acad. Press, N. Y.
28. Виноградова Е. И., Фейгина М. Ю., Алданова Н. А., Липкина В. М., Смирнов Ю. В., Потапенко Н. А., Абдуллаев П. Г., Киселев А. П., Егоров Ц. А., Овчинников Ю. А. (1973) *Биохимия*, **38**, 3–21.
29. Crestfield A. M., Moore S., Stein W. H. (1963) *J. Biol. Chem.*, **238**, 622–627.

Поступила в редакцию  
19.X.1979

## ARGININE RESIDUE IN THE ACTIVE SITE OF THE COBRA VENOM PHOSPHOLIPASE A<sub>2</sub>

APSALON U. R., MIROSHNIKOV A. I.

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

Chemical modification of phospholipase A<sub>2</sub> (isozyme E3) from the cobra venom with 1,2-cyclohexanedione or acetylacetone revealed in the active site the presence of a functionally important arginine residue involved in the substrate binding. This residue was shown to occupy the 16 th position in the polypeptide chain.