



УДК 577.153.2.02+547.962.04

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
ФОСФОЛИПАЗЫ A_2 . ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ
ПО СВОБОДНЫМ АМИНОГРУППАМ НА АКТИВНОСТЬ
ФОСФОЛИПАЗЫ A_2 ИЗ ЯДА КОБРЫ**

*Апсалон У. Р., Айянян А. Е., Мещерякова Е. А.,
Сурина Е. А., Мирошников А. И.*

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

Готгельф И. М., Магазаник Л. Г.

*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова
Академии наук СССР, Ленинград*

Проведена химическая модификация свободных аминогрупп фосфолипазы A_2 (изофермент ЕЗ) яда кобры *Naja naja oxiana* различными реагентами. Показано, что блокирование α -аминогруппы N-концевого аспарагина приводит к потере ферментативной активности. Модификация только ϵ -аминогрупп, происходящая без изменения заряда, не приводит к значительному уменьшению активности фермента, тогда как модификация тех же ϵ -аминогрупп, меняющая их положительный заряд на отрицательный, инактивирует фермент. Обнаружено также, что сохранение положительного заряда молекулы фосфолипазы A_2 — важное условие проявления антигенной активности белка. При исследовании пресинаптического эффекта модифицированных производных фосфолипазы A_2 установлено, что, за исключением ацетилированного фермента, пресинаптическая активность зависит от ферментативной.

Интерес к структурно-функциональным исследованиям фосфолипаз A_2 (КФ 3.1.1.4) из различных источников связан с тем, что, с одной стороны, эти ферменты являются ключевыми в ряде физиологических процессов, например в синтезе простагландинов в животном организме [1], в механизме цитотоксического лизиса клеточной мембраны лимфоцитами Т [2], а с другой — способностью гидролизовать сложноеэфирную связь во 2-м положении 1,2-диацил-*sn*-глицеро-3-фосфатидов обладают некоторые чрезвычайно специфические нейротоксины, в низких концентрациях блокирующие выброс нейромедиаторов из пресинаптических нервных окончаний [3—8]. Такое различие в биологическом действии фосфолипаз A_2 при определенной гомологии первичной структуры представителей этого класса, выделенных из поджелудочной железы млекопитающих и яда различных змей [9], может найти свое объяснение при изучении функциональной важности отдельных аминокислотных остатков. Подход к решению этой задачи состоит в специфической модификации белка и последующем функциональном исследовании полученных производных.

В настоящее время достаточно убедительно показано, что в активном центре всех исследованных фосфолипаз A_2 находится остаток гистидина, который может быть модифицирован *n*-фенацилбромидом с потерей фер-

Результаты неселективной модификации аминокрупп в фосфолипазе из яда
Naja naja oxiana

Реагент	Прореагировавшие аминокруппы		Актив-ность **, %	Пресинаптическая активность **, %	
	ϵ	α		частота спонтанных ответов	квантовый состав вызванных ответов
1. Уксусный ангидрид *					
pH 7,5; 100 моль/моль	6	Своб.	75	0	0
pH 8,0; 400 моль/моль	6	+	0		
2. Яптарный ангидрид *	6	Своб.	8	5	10
3. О-Метилизо мочевины	6	»	96	100	100
4. Nps-Карбоксиангидрид глицина	6	»	120	100	100
5. 2,4-Динитрофторбензол *	5	»	0		
6. 2,4,6-Тринитробензолсульфо-кислота	6	+	0		
7. Пиридоксальфосфат	1	Своб.	7		
8. Расщепление BrCN	1	+	6		

* После реакции сразу проведена обработка гидроксиламинном.

** В процентах от активности нативной фосфолипазы.

ментативной активности [10, 11]. Роль других аминокислотных остатков в фосфолипазах A_2 неясна, так как данные по химической модификации отдельных представителей этого класса ферментов достаточно противоречивы. Так, например, при модификации фосфолипазы A_2 из яда гремучей змеи *Crotalus adamanteus* [12] диэтилпиروкарбонатом было обнаружено, что инактивация фермента происходит одновременно с блокированием одного остатка лизина на две молекулы белка. Была отмечена также чрезвычайно быстрая инактивация фермента из яда *Crotalus atrox* под действием О-метилизо мочевины [13], однако судить о наличии функционально важного остатка лизина в этом случае преждевременно, так как отсутствует какой-либо анализ модифицированного фермента.

Для фосфолипаз A_2 из других источников наличие особо реакционно-способной или функционально важной ϵ -аминогруппы остатка лизина не было подтверждено. При ацетилировании аминокрупп в фосфолипазе из яда *Crotalus durissus terrificus* снижение ферментативной активности и токсичности происходит постепенно в зависимости от числа модифицированных групп [14]; другие модификации приводят к потере токсичности с сохранением ферментативной активности [15]. Ацилирование ангидридами жирных кислот фосфолипазы A_2 из яда медоносной пчелы повышает ферментативную активность; выяснено, что причина такой суперактивации кроется в дополнительном гидрофобном взаимодействии модифицированной белковой молекулы с фосфолипидами [16, 17]. Тем не менее не исключено, что аминокруппы фосфолипазы A_2 могут играть определенную роль в каталитическом акте, в связывании с субстратом и поддержании активной конформации молекулы (или агрегатов). Во всяком случае для панкреатической фосфолипазы показано [18, 19], что α -аминогруппа N-концевого фрагмента ответственна за связывание белка с организованной поверхностью фосфолипидной мицеллы.

Изучение функциональной важности аминокрупп у фосфолипаз A_2 из яда кобр ранее не проводилось. Поэтому целью настоящей работы является исследование влияния химической модификации свободных аминокрупп на биологические свойства одного из изоферментов фосфолипазы A_2 из яда кобры *Naja naja oxiana*.

*Влияние химической модификации
на ферментативную активность*

Из первичной структуры фосфолипазы A_2 (изофермент ЕЗ) следует, что молекула белка содержит в остатках лизина и свободную аминогруппу N-концевого остатка аспарагина [20]. При ацилировании белка ангидридами уксусной и янтарной кислот (100-кратный мольный избыток), N-карбоксиянгидридом *o*-нитрофенилсульфенилглицина и рядом других реагентов (таблица) происходит замещение только ϵ -аминогрупп остатков лизина, N-концевая аминогруппа остатка аспарагина остается свободной. Полностью ацилированную фосфолипазу удалось получить только при использовании большого избытка уксусного ангидрида и/или в присутствии депатурирующих агентов (мочевины или хлоргидрата гуанидина). Из приведенных в таблице данных видно, что изучаемая фосфолипаза A_2 не имеет функционально важных остатков лизина, но терлет ферментативную активность при блокировании α -аминогруппы.

Некоторые из использованных нами реагентов (ангидриды кислот, динитрофторбензол) могут взаимодействовать также с аминокислотными остатками, содержащими оксигруппы (тирозин, серин, треонин); поэтому в этих случаях было проведено деблокирование полученных соединений гидроксиламином. Ацилированные фосфолипазы имели одну и ту же активность как до, так и после такой обработки. Динитрофенилирование привело к полной потере активности, и только при малом времени реакции арилирования последующий гидроксиламинолиз приводил к частичному восстановлению активности. Вероятно, динитрофторбензол арилюет также функционально важный остаток гистидина в положении 47 полипептидной цепи. Низкая ферментативная активность фосфолипазы, модифицированной янтарным ангидридом, может быть следствием замены положительных зарядов на столько же отрицательных, что имеет существенное значение для связывания белка с фосфолипидами.

Увеличение общего положительного заряда заменой остатков лизина на остатки гомоаргинина (обработкой фермента *O*-метилизомочевинной) не снижает способности белка к гидролизу фосфолипидов. Явление суперактивации наблюдается только при химической модификации фосфолипазы N-карбоксиянгидридом *o*-нитрофенилсульфенилглицина. Активность не снижается при последующем удалении кислотлабильных *o*-нитрофенилсульфенильных групп. Модификация фермента N-оксисукцинимидным эфиром уксусной кислоты приводит к блокированию двух ϵ -аминогрупп (определено реакцией с 2,4,6-тринитробензолсульфокислотой); при этом ферментативная активность по отношению к лецитину остается полной.

При селективной модификации фосфолипазы пиридоксальфосфатом происходит резкое снижение ферментативной активности; после восстановления основания Шиффа и разделения белковой смеси на катионите был выделен продукт, содержащий одну пиридоксаминофосфатную группу на молекулу белка и обладающий 7% удельной фосфолипазной активности. Эти результаты подтверждают предположение о существовании фосфатсвязывающего участка в ферменте, но не говорят прямо о его природе. Ковалентная связь пиридоксальфосфата в этом случае осуществляется с остатком лизина, который, возможно, находится вблизи аннонсвязывающего участка. На роль аннонсвязывающей группы может претендовать остаток аргинина, находящийся вблизи остатка лизина, связывающего пиридоксальфосфат.

Что касается N-концевой аминогруппы, то на основе вышеприведенных данных предполагается, во-первых, ее важность для функционирования фермента и, во-вторых, пониженная реакционная способность (по сравнению с ϵ -аминогруппами лизинов). Нами было проведено удаление N-концевого участка путем расщепления полипептидной цепи по связи Met⁸—Pe⁹ бромцианом. Оказалось, что такая обработка приводит к инак-

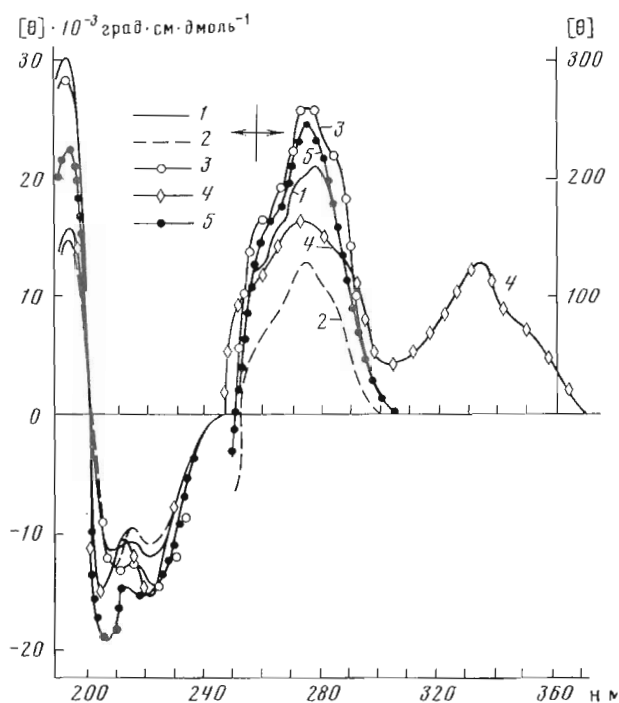


Рис. 1. Спектры КД при pH 8,0 фосфолипазы A_2 нативной (1), ацетилированной по ϵ -аминогруппам остатков лизина (2), сукцинилированной (3), динитрофенилированной (4), гуанидилированной (5)

тивации фосфолипазы (остаточная активность менее 0,5%); попытка нековалентной рекомбинации обоих фрагментов оказалась безуспешной. Аналогичные явления были уже отмечены для свиной панкреатической фосфолипазы [21]. Однако результаты иммунохимического анализа белка, лишённого N-концевого октапептида и избирательной химической модификации α -аминогруппы (работа в стадии завершения), свидетельствуют о некоторых различиях в функционировании N-концевого участка между фосфолипазами A_2 из яда среднеазиатской кобры и поджелудочной железы свиньи.

Спектры кругового дихроизма

Как и нейротоксины I и II, фосфолипаза A_2 из яда кобры *Naja naja oxiana* обладает чрезвычайно стабильной конформацией, которая, по-видимому, обеспечивается наличием 7 дисульфидных связей на полипептидную цепь, состоящую из 149 аминокислотных остатков. Спектры КД этого фермента обнаруживают $n \rightarrow \pi^*$ - и $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходы амидных групп полипептидной цепи при 223, 208 и 192 нм, а также характеризуются малоинтенсивными $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходами ароматических остатков в ближней УФ-области (250–300 нм) (рис. 1). Из анализа спектров КД фосфолипазы видно, что положение и интенсивность полос практически не изменяются в широком диапазоне pH (от 2,0 до 10,0). Расчет содержания упорядоченных структур по методу Чена — Янга [22] дает следующие результаты: 47% α -спирали и 18% β -структуры. Однако нельзя исключить возможность искажения спектра КД в исследованной области за счет вклада в дихроичное поглощение других упорядоченных структур, стабилизированных дисульфидными связями [23].

Исследование модифицированных по свободным аминогруппам фосфолипаз A_2 показывает, что нативная структура белка сохраняется вне зави-

симости от типа модификации (рис. 1). В основном сохраняется как вторичная, так и третичная структура молекулы, за изменениями которой удобно следить по полосам дихроичного поглощения в ближней УФ-области. Вариации в интенсивности $\pi \rightarrow \pi^*$ -полос можно отнести за счет дополнительного вклада в дихроичное поглощение дополнительных хромофоров, вводимых в молекулу белка. Например, динитрофенильная группа (рис. 1, 4) имеет свою полосу дихроичного поглощения при 330 нм и несколько сглаживает тонкую структуру колебательных полос ароматических остатков. Аналогичные данные получены и при изучении фосфолипазы A_2 , модифицированной N-карбоксихидридом Nps-глицина. Наибольшие отличия в спектрах КД в области 240—190 нм наблюдаются только для гуанидильированной фосфолипазы A_2 (рис. 1, 5). В этом случае увеличивается содержание α -спирали на 10%. Таким образом, изменение поверхностного заряда фосфолипазы A_2 существенно не влияет на общую конформацию молекулы белка в растворе. По-видимому, жесткая структура фосфолипазы определяется в основном наличием дисульфидных связей и положительные заряды остатков лизина не участвуют в стабилизации активной конформации молекулы.

Влияние химической модификации на антигенные свойства фосфолипазы

Ранее было показано, что яд кобры *Naja naja oxiana* содержит 7 изоферментов фосфолипазы A_2 , имеющих общие (или близкие) антигенные детерминанты к антителам, полученным к одному из изоферментов [24]. Различия в первичной структуре этих изоферментов, по-видимому, не играют существенной роли в процессе связывания белка с антителами. В отличие от этого (как показано ниже) модификация свободных аминогрупп в изоферменте ЕЗ приводит к снижению сродства антигена к антителам. Участки молекулы белка, определяющие ее антигенные свойства, должны находиться на поверхности глобулы, т. е. быть доступными действию клеточных структур, ответственных за биосинтез антител. Исследую влияние поверхности расположенных аминогрупп, можно сделать некоторые заключения относительно не только антигенных детерминантов, но и пространственной структуры молекулы.

Как было показано для миоглобина каналота [25, 26], флагелина [27], аргининкиназы [28] и других белков, процесс связывания антигена с антителами зависит от распределения зарядов, в частности положительных зарядов ϵ -аминогрупп остатков лизина, на поверхности молекулы белка. Химическая модификация свободных аминогрупп фосфолипазы сказывается на способности фермента к взаимодействию с антителами. Видно (рис. 2), что подвижность гуанидильированного производного фермента при иммуноэлектрофорезе такая же, как и подвижность исходного образца, в то время как ацетилированный и сукцинизированный образцы значительно отличаются по подвижности от нативного фермента. Это происходит в результате снижения положительного заряда в случае ацетилирования и замены положительного на отрицательный заряд в случае сукцинирования.

Антигенную активность исследовали методом количественной преципитации. Как видно из рис. 3, гуанидильированный образец проявляет антигенную активность на уровне нативной фосфолипазы. Это вполне объяснимо, так как модификация в этом случае не вызывает изменений ни в конформации молекулы (рис. 1, 5), ни в распределении зарядов, что следует из электрофоретической подвижности (рис. 2, 4), а размеры самой гуанидиновой группы слишком малы, для того чтобы влиять на взаимодействие антигена с антителом. В ацетилированных и сукцинизированных образцах происходит падение антигенной активности соответственно на 10 и 65%. Так как спектры КД (рис. 1) не выявили существенных из-

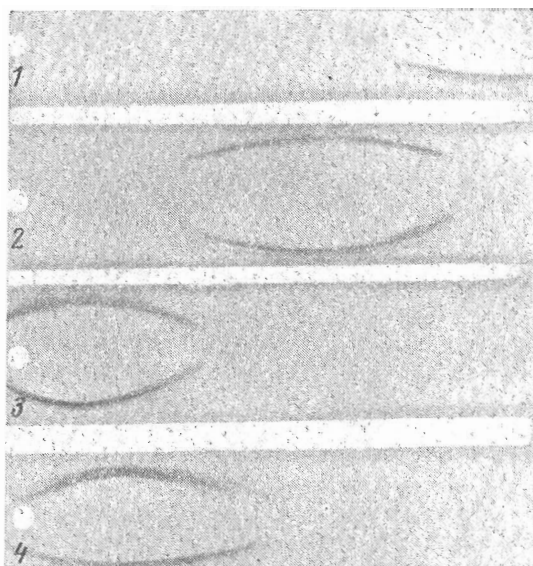


Рис. 2. Иммунофоретическое исследование образцов фосфолипазы A_2 : сукцинированной (1), ацетиливанной (2), нативной (3), гуанидильной (4) (1% агарозный гель, барбиталовый буфер pH 8,6)

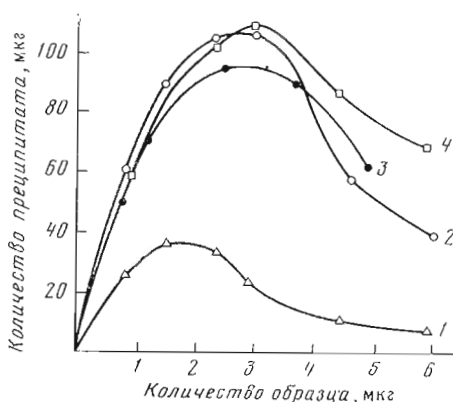


Рис. 3. Кривые количественной преципитации образцов фосфолипазы нативной (1), сукцинированной (2), ацетиливанной (3), гуанидильной (4)

менений в пространственной структуре этих модифицированных аналогов, можно предположить, что изменение антигенности происходит в результате модификации остатков лизина, входящих в состав антигенных детерминантов. Не исключено также, что изменения заряда приводят к локальным конформационным перестройкам, которые не проявляются в спектрах КД, но вносят изменения в структуру антигенных детерминантов. В отличие от ацетильной группы сукцинильная не только нейтрализует положительный заряд аминокислотной группы, но и меняет его на обратный; кроме того, последняя группа больше по объему. Поэтому в ацетилованном ферменте способность к взаимодействию с антителами снижена незначительно, а в сукцинилованном наблюдается существенная потеря антигенной активности.

Таким образом, показано, что сохранение положительного заряда на молекуле фосфолипазы (или его увеличение) является важным условием для сохранения полной антигенной активности. Если это так, то динитро-

фенилпроизводное фосфолипазы A_2 также должно иметь высокий уровень преципитации. Действительно, это производное сохраняет $\sim 80\%$ антигенной активности (рис. 3). Однако эта цифра, возможно, завышена по причине большого содержания ароматических групп в этом производном фермента. Для точного расчета необходимо ввести поправку при количественном определении белка (как по УФ-поглощению, так и методом Лоури), величина которой зависит от переменного состава преципитата.

Влияние химической модификации на пресинаптическую активность фосфолипазы

Ранее было показано, что исследуемая фосфолипаза обладает способностью паразитировать на секреторной мембране нейромедиатора из двигательных нервных окончаний. При обработке фосфолипазой изолированных нервно-мышечных препаратов портняжной мышцы лягушки или диафрагмы крысы наблюдается значительное уменьшение как спонтанного, так и вызванного раздражением нерва освобождения нейромедиатора. Этот эффект необратим, не устраняется удалением свободной фосфолипазы из раствора, окружающего препараты, и завершается полным блокированием освобождения нейромедиатора. Пресинаптический эффект фосфолипазы зависит от присутствия ионов Ca^{2+} в окружающем препарат растворе [29]. Поскольку на основании полученных ранее результатов и некоторых литературных данных [30] можно полагать, что механизм пресинаптического действия фосфолипазы складывается из начального этапа специфической сорбции на двигательных нервных окончаниях и последующего повреждения механизма освобождения медиатора, представлялось важным исследовать изменение пресинаптического эффекта после химической модификации фосфолипазы яда кобры.

Проследивая изменение пресинаптической активности при модификации ϵ -аминогрупп остатков лизина и сопоставляя его с изменениями ферментативной активности и антигенных свойств, можно составить представление как о природе специфической сорбции, так и о роли фосфолипазной активности в пресинаптическом эффекте.

Как видно из таблицы, гомоаргининовое производное фосфолипазы сохраняет полностью и ферментативную, и пресинаптическую активность. Это коррелируется также с сохранением антигенных свойств. Сукцинилирование фосфолипазы ослабляет примерно одинаково ферментативную и пресинаптическую активность. В то же время ацетилирование ϵ -аминогрупп белка, мало сказываясь на способности фермента к гидролизу фосфолипидов, полностью лишает полученное производное способности нарушать освобождение нейромедиаторов пресинаптической мембраны. Этот эффект трудно объяснить снижением положительного заряда при ацетилировании, поскольку даже замена положительного заряда на отрицательный при сукцинилировании не приводит к такому сильному падению пресинаптической активности. Одной из наиболее вероятных причин эффекта ацетилирования является нарушение способности этого производного фосфолипазы к специфической сорбции на пресинаптической мембране. Поэтому представляется необходимым сравнение пресинаптической активности и антигенных свойств производных фосфолипазы. Хотя их изменения имеют одну и ту же направленность (ослабляются после сукцинилирования и ацетилирования), между ними не наблюдается количественного соответствия, поскольку антигенные свойства при ацетилировании снижаются незначительно, а пресинаптическая активность исчезает. Очевидно, антигенные детерминанты и участки молекулы фосфолипазы, обеспечивающие ее способность к специфической сорбции, полностью не совпадают.

Обращает на себя внимание тот факт, что все проведенные с фосфолипазой химические реакции, существенно ослабляющие ее ферментатив-

ную активность, обязательно приводят к ослаблению и пресинаптической активности. С другой стороны, обнаруживаются производные, сохранившие ферментативную активность, но утратившие пресинаптическую. По-видимому, ферментативная атака на фосфолипиды пресинаптических структур — неперемнное, но не единственное условие проявления пресинаптического токсического эффекта.

Экспериментальная часть

Выделение фосфолипазы A_2 (изофермент ЕЗ) из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana* описано ранее [24]. Ферментативную активность определяют ацидометрическим методом с субстратом, используя смешанные мицеллы с детергентом тритон X-100, как указано в предыдущей работе [24]. В качестве субстрата использовали дипальмитоиллецитин, гидролиз проводили при 37° С.

Количество модифицированных групп определяли по аминокислотному анализу после гидролиза 5,7 н. HCl (на анализаторе Duggum D-500, США) и/или спектрофотометрически после реакции с 2,4,6-тринитробензолсульфокислотой [31] (в отличие от стандартной методики время реакции 30 мин). Кроме того, полноту реакции по α - и ϵ -аминогруппам проверяли дансильным методом с идентификацией с помощью ТСХ на силикагеле.

Модификацию фосфолипазы уксусным ангидридом проводили в 0,05 М фосфатном буфере, содержащем ацетат натрия (0,2 г/мл) при 20° С. К раствору белка (2–7 мг/мл) при перемешивании в 3–4 приема добавляли уксусный ангидрид (100 мкмоль реагента на 1 мкмоль белка), поддерживая постоянное значение рН (7,5) на автотитраторе ТТТ-2 (Дания) с помощью 0,5 н. NaOH. После окончания реакции в смесь добавляли 0,5 М гидроксилламин, через 1 ч при рН 8 модифицированный продукт отделяли от низкомолекулярных реагентов гель-фильтрацией на сефадексе G-25 в 0,05 М аммоний-бикарбонатном буфере и лиофилизовали. Для полной модификации фосфолипазы ацетилирование проводили при рН 8 с 500-кратным избытком реагента; исходный буфер содержал 50 мг/мл ацетата натрия.

При модификации N-оксисукцинимидным эфиром уксусной кислоты к раствору фосфолипазы (1 мг/мл) в 0,1 М боратном буфере (рН 9,2) добавляли сухой реагент (0,4 мг/мл), перемешивали 24 ч и затем модифицированный продукт выделяли гель-фильтрацией, как описано выше. Количество немодифицированных аминокрупп определяли реакцией с 2,4,6-тринитробензолсульфокислотой.

Модификация янтарным ангидридом. К раствору белка (3 мг/мл) в 0,1 М NaHCO_3 в 4 приема добавляли сухой янтарный ангидрид в количестве, равном по весу белку (~140 моль/моль), поддерживая рН 9. После окончания реакции смесь перемешивали 1 ч, обессоливали на G-25 в аммоний-бикарбонатном буфере.

Гуанидильрование [32]. В 1 М натрий-карбонатном буфере (рН 10,1) растворяли сульфат O-метилизочевяины (Merck, ФРГ) (концентрация реагента 0,2 М) и добавляли фосфолипазу (2 мг/мл). Через 70 ч перемешивания при 20° С подкисляли уксусной кислотой и обессоливали гель-фильтрацией на сефадексе G-25 в 1% уксусной кислоте.

Реакцию с N-карбоксиянгидридом Nps-глицина проводили по ранее описанной методике [33]: к раствору 5 мг белка в 2 мл 0,05 М боратного буфера (рН 9,5), содержащего $1 \cdot 10^{-2}$ М EDTA, приливали раствор 7 мг N-карбоксиянгидрида Nps-глицина в 2 мл абсолютного диоксана. Реакцию проводили в режиме рН-статирования. После окончания реакции модифицированный продукт выделяли гель-фильтрацией в 0,05 М аммоний-ацетатном буфере (рН 7). Удаление Nps-групп осуществляли раствором тиосульфата, как указано в той же работе [33].

Динитрофенилирование. К раствору белка (3 мг/мл) в 0,1 М боратном буфере (рН 9) добавляли раствор 2,4 динитрофторбензола в этаноле (0,1 мг/мл). Реакцию проводили при 20° С в темноте с перемешиванием в течение 4 ч. Избыток реагента экстрагировали 3 порциями (по 10 мл) эфира. К водному слою приливали раствор гидроксиламина с добавлением EDTA. Через 16 ч модифицированный белок выделили гель-фильтрацией на сефадексе G-25 в аммоний-бикарбонатном буфере.

Модификация пиридоксальфосфатом. К раствору белка (3 мг/мл) в фосфатном буфере (0,05 М, рН 7,6) добавляли эквимольное количество сухого пиридоксальфосфата. Через 2 ч перемешивания добавили 5-кратный избыток NaBH_4 и через 15 мин несколько капель уксусной кислоты. После обессоливания на сефадексе G-25 в 0,05 М аммоний-ацетатном буфере (рН 5) модифицированный продукт очищали ионообменной хроматографией на целлюлозе CM-32 (колонка 1×9 см) в градиенте аммоний-ацетатного буфера от 0,01 М (рН 5) до 0,03 М (рН 6). Объем градиента 400 мл.

Расщепление бромцианом. К раствору белка (5 мг/мл) в 70% муравьиной кислоте (с добавкой EDTA) добавляли равное по весу количество сухого бромциана и перемешивали 24 ч в темноте под азотом. После упаривания реакционную смесь разделяли на колонке (1,5×90 см) с сефадексом G-50 в 1% уксусной кислоте, выделяя высокомолекулярную фракцию.

Спектры КД снимали на дихрографе-III (Roussel-Jouan, Франция) при толщине слоя 1 и 0,01 см в трис-HCl-буфере (рН 8,0). Концентрация белка 10–30 мкМ.

Иммунизацию кроликов проводили путем введения под кожу 0,5 мг фосфолипазы A_2 в растворе полного адьюванта Фрейнда. Инъекции повторяли каждые 2 недели. Кровь отбирали на 50-е сутки от начала иммунизации.

Иммуноэлектрофорез проводили в 1% агарозном геле при 10–12° С в течение 2 ч и напряжении в геле 3,2 В/см. Для фореа использовали барбиталовый буфер, рН 8,6, содержащий 0,025 М барбитал натрия, 0,005 М барбитуровую кислоту и 0,1% азид натрия. Для получения полос преципитации после электрофореза использовали кроличью антисыворотку против нативной фосфолипазы.

Иммунопреципитация. Для определения иммунохимической активности фосфолипазы (нативной или модифицированной) использовали метод количественной преципитации [34]. К 50 мкл антисыворотки в центрифужной пробирке добавляли раствор модифицированного образца фосфолипазы и доводили объем до 0,4 мл 0,1 М Na-фосфатным буфером, рН 7,4. Реакционную смесь инкубировали 1 ч при 37° С и 20 ч при 4° С. Образовавшийся преципитат промывали 0,15 М NaCl. Количество белка в преципитате определяли по методу Лоури.

Измерение пресинаптической активности. Пресинаптическую активность фосфолипазы A_2 и ее производных оценивали по изменениям частоты спонтанных миниатюрных потенциалов концевой пластинки и квантового состава потенциалов, вызванных периодическим раздражением нерва (0,5 Гц). Регистрацию проводили внутриклеточно по общепринятой методике. Нервно-мышечный препарат (седалищный нерв – портняжная мышца лягушки) находится в растворе следующего состава (мМ): Na^+ 116; K^+ 2,5; Ca^{2+} 0,5; Cl^- 117; HCO_3^- 2,4. К этому раствору добавляли ионы магния в количестве, необходимом для устранения мышечных сокращений (3 мМ). После периода контрольной регистрации в ванночку с препаратом вносили 0,1 мл концентрированного водного раствора фосфолипазы или ее производных, с тем чтобы их конечная концентрация достигала $5 \cdot 10^{-5}$ – $5 \cdot 10^{-4}$ г/мл. Затем на протяжении 1–1,5 ч регистрировали синаптические потенциалы. После усреднения за определенные интервалы времени строили кинетические кривые пресинаптических эффектов исследу-

двух фосфолиаз. Сравнение производных проводили по эффекту, достигнутому к 30-й мин контакта с перво-мышечным препаратом.

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Брокерхофф Х., Дженсен Р. (1978) Липолитические ферменты, с. 242-300, «Мир», М.
2. Njikamp F. P., Flower R. J., Moncada S., Vane J. R. (1976) *Nature*, **263**, 479-482.
3. Strong P. N., Goerke J., Oberg S. G., Kelly R. B. (1976) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 178-182.
4. Kamenskaya M. A., Thesleff S. (1974) *Acta physiol. scand.*, **90**, 716-724.
5. Wernicke J. F., Vanker A. D., Howard B. D. (1975) *J. Neurochem.*, **25**, 483-496.
6. Halpert J., Eaker D., Karlsson E. (1976) *FEBS Lett.*, **61**, 72-76.
7. Abe T., Limbrick A. R., Miledi R. (1976) *Proc. Roy. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **194**, 545-553.
8. Abe T., Alema S., Miledi R. (1977) *Eur. J. Biochem.*, **80**, 1-12.
9. Drenth J., Enzing C. M., Kalk K. H., Vessies J. C. A. (1966) *Nature*, **264**, 373-377.
10. Roberts M. F., Deems R. A., Mincey T. C., Dennis E. A. (1977) *J. Biol. Chem.*, **252**, 2405-2411.
11. Viljoen C. C., Visser L., Botes D. P. (1977) *Biochim. et biophys. acta*, **483**, 107-120.
12. Wells M. A. (1973) *Biochemistry*, **12**, 1086-1093.
13. Wu T. W., Tinker D. O. (1969) *Biochemistry*, **8**, 1558-1567.
14. Jeng T. W., Fraenkel-Conrat H. (1978) *FEBS Lett.*, **87**, 291-296.
15. Habermann E., Schaub J. (1977) *Proc. Int. Soc. Neurochem. (Abstr. of 6th Intern. Meeting of the Intern. Soc. for Neurochem., Copenhagen, August 1977)*, **6**, 398.
16. Lawrence A. J., Moores G. R. (1975) *FEBS Lett.*, **49**, 287-291.
17. Drains D., Moores G. R., Lawrence A. F. (1978) *FEBS Lett.*, **86**, 49-52.
18. Slotboom A. J., de Haas G. H. (1975) *Biochemistry*, **14**, 5394-5403.
19. Slotboom A. J., Jansen E. H. J. M., Vlijm H., Pattus F., Soares de Araujo P., de Haas G. H. (1978) *Biochemistry*, **17**, 4593-4600.
20. Овчинников Ю. А., Мирошников А. И., Назимов И. В., Апсалон У. Р., Солдатов Л. Н. (1979) *Биоорг. химия*, **5**, 805-813.
21. Meijer H., Meddens M., Dijkman R., Slotboom A. J., de Haas G. H. (1978) *J. Biol. Chem.*, **253**, 8564-8569.
22. Chen Y. H., Yang J. T., Chau K. H. (1974) *Biochemistry*, **13**, 3350-3359.
23. Jirgensons V., de Haas G. H. (1977) *Biochim. et biophys. acta*, **494**, 285-292.
24. Апсалон У. Р., Шамборант О. Г., Мирошников А. И. (1977) *Биоорг. химия*, **3**, 1553-1559.
25. Perlstein M. T., Atassi M. Z. (1974) *Immunochemistry*, **11**, 63-70.
26. Koketsu J., Atassi M. Z. (1974) *Immunochemistry*, **11**, 1-9.
27. Venning M. M. (1975) *Immunochemistry*, **12**, 365-373.
28. Benjamin J., Guillou J., Desormeau-Bedot J., Robin J. (1976) *Eur. J. Biochem.*, **68**, 489-496.
29. Каменикая М. А., Магазаник Л. Г., Сатыбалдина Н., Котова Е., Мирошников А. И., Апсалон У. Р. (1979) *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, **5**, 396-399.
30. Magazanik L. G., Gotgile I. M., Slavnova T. L., Miroshnikov A. I., Apsalon U. R. (1979) *Toxicon*, **17**, 477-488.
31. Fields R. (1972) in: *Methods in Enzymol.* (Hirs C. N. W., Timasheff S. N., eds), vol. 25B, pp. 464-468, Acad. Press, N. Y.—San-Francisko—London.
32. Kimmel J. R. (1967) in: *Methods in Enzymol.* (Hirs C. N. W., ed.), vol. 11, pp. 584-591.
33. Мирошников А. И., Демьяшкин Е. Я., Руделин А. Б., Овчинников Ю. А. (1975) *Биоорг. химия*, **1**, 1702-1706.
34. Atassi M. Z., Saplin B. J. (1968) *Biochemistry*, **7**, 688-698.

Поступила в редакцию
8.1.1980

PHOSPHOLIPASE A₂ STRUCTURE-FUNCTIONAL STUDIES. THE EFFECT
OF MODIFICATION OF FREE AMINO GROUPS ON THE ACTIVITY
OF COBRA VENOM PHOSPHOLIPASE A₂

APSAŁON U. R., AIANYAN A. E., MESHCHERYAKOVA E. A., SURINA E. A.,
MIROSHNIKOV A. I., GOTGILF I. M., MAGAZANIK L. G.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow; I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology
and Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Leningrad*

Chemical modification of amino groups in *Naja naja oxiana* phospholipase A₂ (isoenzyme E₃) has been performed using the following reagents: acetic and succinic anhydride, O-methylisourea, glycine N-carboxyanhydride, 2,4-dinitrobenzene, 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid, and pyridoxal phosphate. It was shown that α -amino group of the N-terminal asparagine has lower reactivity than the ϵ -amino groups of lysine residues. The CD spectra indicated no dramatic changes in the protein native structure after the aforementioned modifications. Phospholipase A₂ modified at the ϵ -amino groups preserves about 80% of the initial enzymatic activity, whereas blocking the α -amino group entails a complete abolishment of the activity. The presence of positively charged amino groups was found to be essential for manifestation both of enzymic and antigenic activities. The interrelation between the phospholipase A₂ presynaptic and enzymatic activities was demonstrated, the only exception being the ϵ -amino acetylated phospholipase A₂ that preserves the former but shows no presynaptic action.
