



УДК 577.153.04

О СТРУКТУРЕ Ca^{2+} -СВЯЗЫВАЮЩЕГО ЦЕНТРА ФОСФОЛИПАЗЫ
 A_2 ИЗ ЯДА СРЕДНЕАЗИАТСКОЙ КОБРЫ
NAJA NAJA OXIANA

*Мещерякова Е. А., Айянян А. Е., Гостецкий П. В.,
Мирошников А. И.*

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

Спектральными методами (КД, разностная УФ-спектроскопия и флуоресценция) исследовано влияние модифицированной α -аминогруппы, остатков His⁴⁷, Asp³⁸, Tyr³ и Tyr²⁷, Trp¹⁸ и Trp⁶¹ фосфолипазы A_2 из яда кобры на конформацию белковой молекулы и способность ее к связыванию с ионами Ca^{2+} . Показано, что присоединение Ca^{2+} к фосфолипазе A_2 не меняет ее вторичную структуру и происходит в мольном отношении 1:1, а также зависит от ионизации N -концевой аминогруппы (pK 6,7), сближенной в апоферменте с карбоксильной группой Asp³⁸ (pK 3,5). С помощью КД установлено, что α -аминогруппа остатка Asn¹ выполняет роль «стабилизатора» нативной конформации фермента. По разностным УФ-спектрам вблизи Ca^{2+} -связывающего центра фосфолипазы A_2 обнаружены остаток His⁴⁷ (pK 7,8) и карбоксильная группа (pK 5,2), с которыми сближаются N -концевая аминогруппа при образовании комплекса фермент – Ca^{2+} . При изучении нитрованного производного фермента удалось установить, что одним из лигандов иона кальция в его комплексе с фосфолипазой A_2 является Tyr²⁷. На основании полученных результатов предлагается модель участка фосфолипазы A_2 , связывающего кальций.

Особенности структурно-функциональной организации фосфолипаз A_2 (КФ 3.1.1.4) из различных источников проявляются в специфичности их биологического действия. Если у ферментов из поджелудочной железы млекопитающих отсутствуют токсические свойства, то структурно-гомологичные фосфолипазы из яда змей, например нотексин, обладают мощным нейротоксическим эффектом. Возможно, различия в биологическом действии объясняются пространственной структурой белковой молекулы, способностью специфического связывания с поверхностью мембран, заменой функциональных групп отдельных аминокислотных остатков. В связи с этим для построения молекулярной модели действия ферментов из различных источников целесообразно провести сравнительный анализ структур фосфолипаз A_2 с помощью разнообразных химических и физико-химических методов.

С помощью химической модификации отдельных аминокислотных остатков ранее нами была показана роль N -концевого фрагмента в процессе связывания фосфолипазы A_2 из яда кобры *Naja naja oxiana* с организованной поверхностью фосфолипидов [1]. Химическая модификация может оказаться полезной и при выявлении особенностей формирования Ca^{2+} -связывающего центра фосфолипазы A_2 , поскольку ионы этого металла необходимы в процессе проявления ферментом биологической активности.

Цель настоящей работы — изучение с помощью спектральных методов структуры Ca^{2+} -связывающего центра фосфолипазы A_2 из яда кобры *N. n. oxiana*, выяснение роли отдельных аминокислотных остатков, участвующих во взаимодействии с ионами металла. Для решения этой задачи был использован изофермент ЕЗ, первичная структура которого была установлена ранее [2], а также ряд производных, полученных химической модификацией отдельных аминокислотных остатков [4, 3]. С учетом большого структурного и функционального сходства ферментов из разных источников (ядов змей, поджелудочной железы) [4] было проведено также сравнительное изучение их первичных и вторичных структур.

		5	10	15	20	25	30	35																													
I	N	L	Y	Q	F	K	N	M	I	K	C	T	V	P	S	R	S	W	L	D	F	A	N	Y	G	C	Y	C	G	R	G	G	S	G			
II	D	L	T	Q	F	G	N	M	I	N	K	M	G	Q	S	V	F	D	Y	I	Y	Y	A	Y	G	C	Y	C	G	W	G	G	K	G			
III	S	L	V	Q	F	E	T	L	I	M	K	V	A	K	R	S	G	L	L	W	Y	S	A	Y	G	C	Y	C	G	W	G	G	K	G			
IV	A	L	W	Q	F	N	G	M	I	K	C	K	I	P	S	S	E	P	L	L	D	F	N	N	Y	G	C	Y	C	G	L	G	G	S	G		
		6	0	6	0	0	6	5	3	0	5	4	6	6	5	3	5	6	6	5	4	4	6	5	0	0	0	0	0	5	0	0	5	0			
		40	45	50	55	60	65	70																													
I	T	P	V	D	D	L	D	R	C	C	Q	I	H	D	N	C	Y	N	E	A	G	K	I	S	G	C							W	P	Y	F	
II	K	P	I	D	A	T	D	R	C	C	F	V	H	D	C	C	Y	G					K	M	G	T	Y							D	T	K	W
III	R	P	Q	D	A	T	D	R	C	C	F	V	H	D	C	C	Y	G					K	A	T	N	C							N	P	K	T
IV	T	P	V	D	D	L	D	R	C	C	Q	T	H	D	N	C	Y	K	Q	A	K	K	L	D	S	C	K	V	L	V	D	N	P	Y	T		
		5	0	5	0	4	4	0	0	0	4	5	0	0	4	0	0	5	5	4	5	0	6	6	6	3	3	3	3	3	3	5	3	4	5		
		75	80	85	90	95	100	105																													
I	K	T	Y	S	Y	E	C	S	Q	G	T	L	T	C	K	G	D	D	N	C	A	A	S	V	C	D	C	D	R	L	A	A	Y	C			
II	T	S	Y	N	Y	E	I	Q	N	G	G	I	D	C	D	E	D	P	Q	K	K	E	L	C	E	C	D	R	V	A	A	I	C				
III	V	S	Y	T	Y	S	E	E	N	G	E	I	V	C	G	G	D	P	C	G	T	Q	I	C	E	C	D	K	A	A	A	I	C				
IV	N	N	Y	S	Y	S	C	S	N	N	E	I	T	C	S	S	E	N	N	A	C	E	A	F	I	C	N	C	D	R	N	A	A	I	C		
		6	5	0	5	0	4	5	5	3	3	5	3	5	0	5	5	5	3	5	5	3	6	5	6	5	0	5	0	0	3	6	0	0	3	0	
		110	115	120	125	130																															
I	F	A	G	A	P	Y	N	N	D	N	Y	N	I	N	L	K	A	R	C	Q																	
II	F	A	N	N	R	N	T	Y	N	S	N	Y	F	G	H	S	S	S	K	C	T	G	T	E	Q	C											
III	F	R	D	N	I	P	S	Y	D	N	K	Y	W	L	F	P	P	K	D	C	R	Q	E	P	E	P	C										
IV	F	S	K	V	P	Y	N	K	E	H	K	N	L	D	K	K	N	C																			
		0	5	6	5	5	5	5	5	5	5	4	6	6	6	5	6	5	6	0	6	3	5	5	4	5	4										

Рис. 1. Аминокислотные последовательности четырех гомологичных фосфолипаз *N. n. oxiana* (I), *Bitis gabonica* (II), *Crotalus adamanteus* (III), *Bovine pancreas* (IV). В рамках выделены консервативные участки. В нижней строке представлена сумма аминокислотных замен в каждой позиции при шести возможных попарных сравнениях

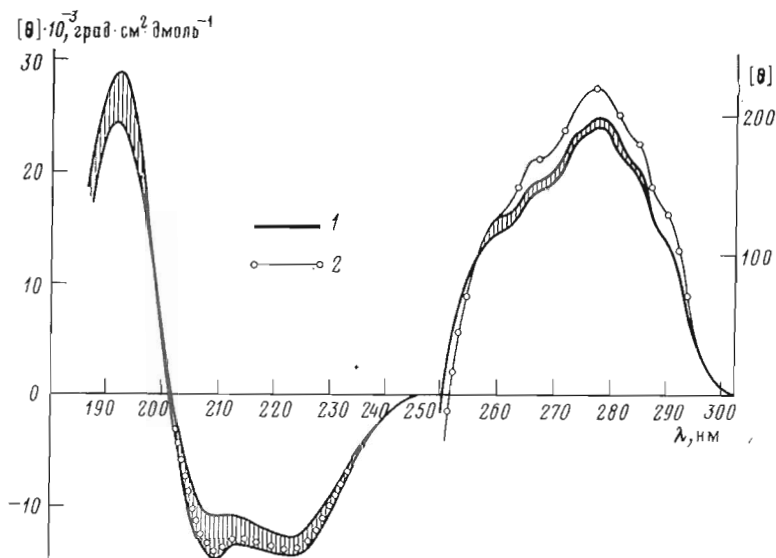


Рис. 2. Спектры КД фосфолипазы A_2 : 1 — при различных pH; заштрихованная часть спектра показывает изменения интенсивности полос в диапазоне pH 2,0–10,0; 2 — при добавлении $CaCl_2$ (pH 7,8, c_{CaCl_2}/c_{Φ} 200)

На рис. 1 в однобуквенном коде [5] представлены наиболее характерные аминокислотные последовательности ферментов, полученных из различных источников (остальные не отличаются существенным образом от приведенных). Попарное сравнение их показывает, что число одинаковых аминокислотных остатков в последовательности составляет от 31% для пары II и IV до 53% для пары I и IV. Замены распределены неравномерно вдоль полипептидной цепи. На рис. 1 отмечены три консер-

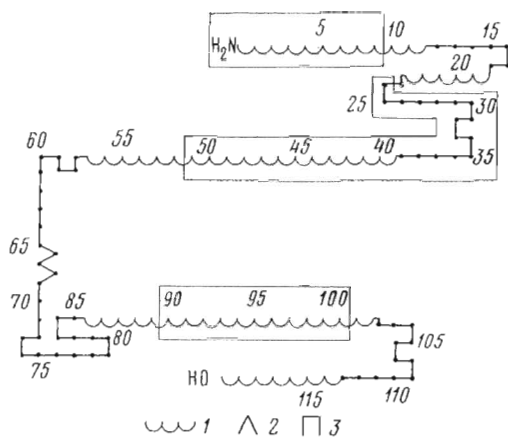


Рис. 3. Модель вторичной структуры фосфолипазы $A_2 N. n. oxiana$: 1 — α -спираль; 2 — β -структура; 3 — β -изгиб. Рамкой обведены «консервативные зоны» молекулы фермента (см. текст). Нумерация дана по аминокислотной последовательности фосфолипазы A_2 [2]

вативные зоны с малым числом аминокислотных замен: 1–9, 25–52 и 96–106 (нумерация остатков согласно рис. 1).

В спектрах КД фосфолипазы A_2 из яда кобры *N. n. oxiana* (рис. 2) наблюдаются $n \rightarrow \pi^*$ - и $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходы пептидных хромофоров основной цепи (223, 208 и 192 нм), а также малоинтенсивные $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходы ароматических остатков в области 250–300 нм. Данные анализа колебательной структуры полос по низкотемпературным спектрам поглощения и спектрам КД модельных соединений и белков [6–8] позволяют отнести полосы 267, 261 и 255 нм в фосфолипазе A_2 из яда кобры к остаткам фенилаланина, 284, 277 и 272 — к остаткам тирозина, 291 и 284 — к остаткам триптофана. В области 250–320 нм должны также находиться полосы дисульфидных связей, но, как было показано [9, 10], они не обладают тошлой колебательной структурой.

Спектры КД исследуемого фермента, фосфолипазы из яда *B. gabonica* и панкреатической фосфолипазы [11, 12] обнаруживают большое подобие, что свидетельствует о близкой пространственной организации этих белков и наличии значительного количества упорядоченных структур. Расчет содержания регулярных структур для фосфолипазы из яда кобры *N. n. oxiana* по спектрам КД методом Чена и Янга [13] дает 47% α -спирали и 15% β -структуры. Важно, что спектры КД (рис. 2) не меняются в широком диапазоне pH (2,0–10,0) и в 8 М мочеvine (последнее на рис. 2 не показано), что свидетельствует о значительной устойчивости пространственной структуры, обеспечиваемой наличием семи дисульфидных связей на полипептидную цепь из 119 аминокислотных остатков.

Анализ аминокислотной последовательности методом Чоу и Фасмана [14, 15] показал, что молекула исследуемого фермента должна содержать ~25% α -спирали, 15% β -структуры и 50% β -изгибов. Для более надежного определения местоположения α -спиральных и β -структурных участков был дополнительно использован предсказательный алгоритм Ву и Кабата [16]. Найдено, что двум критериям одновременно соответствуют α -спирали, расположенные в участках последовательности 4–13, 17–22, 37–42 и 52–58 (рис. 1). Сравнение с данными, полученными из спектров КД (рис. 2), показывает, что расчет регулярных структур по аминокислотной последовательности дает заниженный процент содержания α -спирали. Наибольшее совпадение с данными КД было получено при использовании конформационных параметров Левитта [17], с помощью которых были обнаружены α -спиральные участки, локализованные между остатками 1–11, 20–24, 41–57, 92–107 и 120–126, и β -структурная область 71–76 (нумерация остатков дана по рис. 1), что составило 50% α -спирали и 7% β -структуры.

Таким образом, содержание α -спиральных и β -структурных участков, рассчитанное по аминокислотной последовательности фосфолипазы A_2 из яда кобры, удовлетворительно согласуется с данными спектров КД. В настоящее время невозможно достоверно оценить вклад β -изгибов по спектрам КД, поэтому при построении схематичной модели вторичной структуры фосфолипазы A_2 из яда кобры (рис. 3) положение β -изгибов определялось по расчетным данным метода Чоу и Фасмана.

Расчеты, выполненные на ЭВМ (см. «Экспериментальную часть»), показывают, что вероятность возникновения двух консервативных зон 24—51 и 90—100 (нумерация остатков рис. 3) случайным образом весьма мала и не превышает уровня 1%. Действительно, из шести возможных попарных сравнений аминокислотных последовательностей, представленных на рис. 1, следует, что участок 25—52 имеет только 41 аминокислотную замену (24%). С учетом средней величины этого показателя по всей длине (55%) это свидетельствует о высокой степени консервативности указанного фрагмента. Соответствующий расчет показал, что вероятность возникновения случайным образом в четырех гомологичных фосфолипазах непрерывного участка последовательностей из 4×28 аминокислотных остатков с 41 (или менее) аминокислотной заменой не превышает уровня 0,5%.

Обнаруженные высококонсервативные зоны в последовательности фермента из яда среднеазиатской кобры довольно точно совпадают с найденными α -спиральными участками (рис. 3) и позволяют предположить для них существенную роль в связывании и гидролизе фосфолипидов. Такое предположение согласуется с данными рентгеноструктурного анализа панкреатической фосфолипазы [18], для которой найдено два больших участка α -спирали, соединенных дисульфидными связями, и близко к ним расположенный N-концевой фрагмент, которому приписывается роль площадки, ответственной за связывание с поверхностью субстрата.

Ряд структурно и функционально важных аминокислотных остатков может находиться вне обнаруженных в настоящей работе консервативных зон. Так, функционально важный остаток аргинина-16 в фосфолипазе A_2 из яда кобры [19] располагается между двумя предсказанными α -спиральными участками. Присутствие положительно заряженного аминокислотного остатка в этом фрагменте является обязательным для всех известных фосфолипаз A_2 . В панкреатической фосфолипазе остаток лизина-10 расположен в петле, следующей за N-концевой α -спиралью и меляющей ход полипептидной цепи в направлении активного центра. Наличие подобной петли характерно для многих белков, взаимодействующих с фосфатсодержащими субстратами [20]. Связывание отрицательно заряженной фосфатной группы обеспечивается при этом как взаимодействием с положительно заряженным остатком лизина или аргинина, так и с диполями примыкающих α -спиралей [21].

Наиболее вариабельные фрагменты фосфолипаз A_2 расположены в участках последовательностей 10—24, 53—95 и 107—132. Эти участки могут отвечать в случае панкреатических фосфолипаз за взаимодействие с N-концевой частью неактивного белка-предшественника либо за взаимодействие фосфолипаз из ядов змей между собой (образование димеров) и с другими субъединицами в токсическом комплексе (тайпоксин, кротоксин) [22—24].

Таким образом, гомологичная аминокислотная последовательность, большое сходство вторичной и третичной структур фосфолипазы A_2 из яда кобры *N. n. oxiana* и фосфолипазы из поджелудочной железы млекопитающих позволяют привлечь данные химической модификации и рентгеноструктурного анализа последнего фермента для построения молекулярной модели активного центра.

Большой интерес представляет изучение топографии кальцийсвязывающего центра в молекуле фосфолипазы A_2 и выявление функциональных групп аминокислотных остатков, участвующих в процессе связывания белковой молекулы с ионом металла. Ранее было установлено, что ионы Ca^{2+} необходимы для проявления ферментативной активности фос-

фолипаз A_2 , и этот факт связывался с конформационной перестройкой белковой молекулы, способствующей присоединению субстрата. Как показали наши исследования, добавление ионов кальция, бария и стронция не вносит заметных изменений в спектр КД фермента в области 190–240 нм (рис. 2). Небольшое увеличение интенсивности $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходов ароматических остатков, возможно, вызвано изменением полярности их окружения, происходящим при связывании белковой молекулы с ионами кальция.

Присоединение ионов Ca^{2+} к ферменту вызывает появление разностного УФ-спектра (рис. 4), в котором при pH 7,8 наблюдается отрицательная полоса (293 нм), две положительные (287 и 279 нм), а также в коротковолновой части спектра интенсивная положительная (242 нм) и отрицательная (227 нм) полосы. В зависимости от концентрации ионов Ca^{2+} характер спектра меняется в области 280–300 и ~ 230 нм. При соотношении $c_{Ca^{2+}}/c_{\text{фермента}}$, равном 1, спектр имеет только положительные полосы при 292 (плечо), 287 и 279 нм (рис. 4, 1). Увеличение концентрации соли кальция вызывает уменьшение интенсивности плеча при 292 нм и переход его в минимум при 293 нм, а также появление отрицательной полосы при 227 нм (рис. 4, 3). Одновременно полоса 288 нм сдвигается до 287 нм и интенсивность ее понижается незначительно, оставаясь положительной. Полосы при 293 и 242 нм показывают гиперболическую зависимость интенсивности от концентрации $CaCl_2$ (рис. 5а), что позволяет определить число мест связывания и константу диссоциации комплекса фосфолипазы с Ca^{2+} ($K_{\text{дис}} = 5 \cdot 10^{-4}$ М). При этом ход зависимости интенсивности для соотношения $c_{Ca^{2+}}/c_{\text{белка}}$ от 0 до 1 в случае полосы при 293 нм не влияет на окончательные значения констант диссоциации. Из зависимости $\Delta \epsilon_{292}$ от c_{CaCl_2} определено одно место связывания фермента с ионом Ca^{2+} (рис. 5б). Из графика зависимости $-\lg K_{\text{дис}}$ от pH (рис. 6) видно, что группа, влияющая на процесс связывания фермента с ионами Ca^{2+} , имеет рК 6,6. Такое значение рК может относиться к имидазольной группе остатка гистидина, α -аминогруппе N-концевого остатка или к карбоксильной группе в специфическом окружении.

В зависимости от pH среды разностные УФ-спектры комплекса фермента с ионами Ca^{2+} меняют знак и положение некоторых полос. При pH 5,5–6,0 (рис. 7, 2) спектр комплекса имеет только положительные полосы при 292 (плечо), 289, 279 и 242 нм в отличие от спектра, полученного при pH 7,8 (рис. 4, 3). Наблюдаемые изменения можно объяснить тем, что при образовании комплекса пертурбации подвергаются остатки триптофана, дающие полосы при 293 и 279 нм и вклад в полосу при 227 нм, а также остатки тирозина, дающие полосу 287 нм и вклад в полосу 227 нм. Пертурбация остатков триптофана и тирозина в зависимости от pH, а также концентрации ионов Ca^{2+} носит различный характер. Если при эквимольном соотношении фермента и соли (pH 7,8) ароматические остатки переходят в более гидрофобное окружение (положительные полосы кривой 1 на рис. 4), то при увеличении концентрации соли полоса при 293 нм, относящаяся к остаткам триптофана, претерпевает «голубой» сдвиг, характерный для перехода в более полярное окружение. Принимая во внимание, что по полосе 293 нм, так же как и по полосе 242 нм, определены константы диссоциации комплекса фермент — Ca^{2+} , зависящие от иониза-

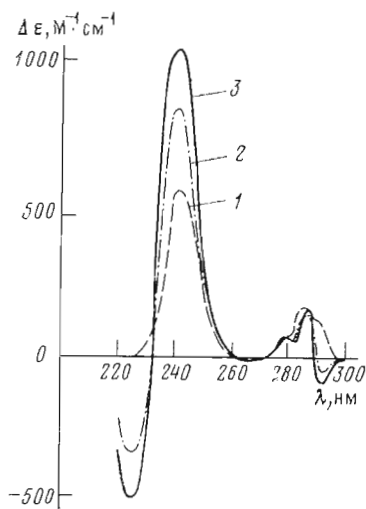


Рис. 4. Разностные УФ-спектры фосфолипазы (pH 7,8) при соотношении концентраций $CaCl_2$ и фермента, равном 1 (1); 25 (2) и 100 (3)

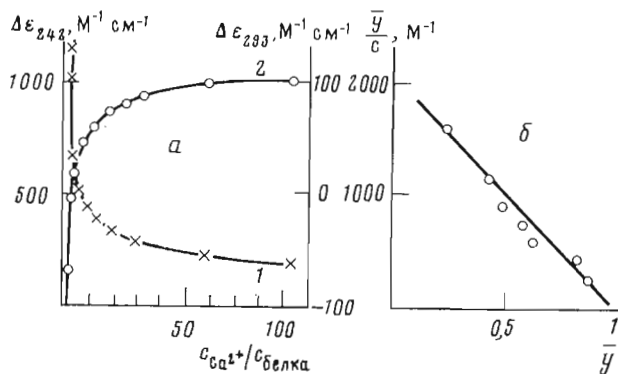


Рис. 5. Определение числа мест связывания фосфолипазы A_2 с CaCl_2 (рН 7,8). *a* - зависимость $\Delta \epsilon_{293}$ (1) и $\Delta \epsilon_{242}$ (2) от концентрации CaCl_2 ; *b* - график Скетчарда, построенный из данных рис. 5а, где \bar{y} - степень связывания ионов Ca^{2+} , c - концентрация несвязанных ионов кальция

ции группы с рК 6,6, можно предположить, что группа с рК 6,6 находится вблизи остатков (остатка) триптофана и ее взаимодействие с ионами Ca^{2+} переводит эти остатки в более полярное окружение. Если эта группа находится в протонированном состоянии (рН 4,5–6,0) и не взаимодействует с Ca^{2+} , то при добавлении соли остатки триптофана и тирозина переходят только в гидрофобное окружение.

Аналогичный характер пертурбации ароматических остатков молекулы фермента обнаружен в разностных УФ-спектрах, полученных из сравнения спектров растворов белка при низких и повышенных концентрациях, когда фосфолипаза A_2 находится в основном в мономерном и димерном состоянии соответственно (рис. 7, 3). Исследования степени агрегации в зависимости от рН среды, концентрации белка и ионов Ca^{2+} показали [25], что в растворе существует равновесие мономер-димерных форм, сдвинутое в щелочной среде и в присутствии Ca^{2+} в сторону димера. Этими данными можно объяснить инициируемый даже незначительным количеством ионов кальция переход остатков триптофана и тирозина в более гидрофобное окружение, проявляемый в разностных УФ-спектрах. Таким образом, ионы кальция при связывании с ферментом выполняют две функции: взаимодействуют с активными группами аминокислотных остатков, формирующих Ca^{2+} -связывающий центр, и способствуют образованию димерной формы фосфолипазы A_2 . Как установлено рентгеноструктурными исследованиями панкреатической фосфолипазы [18], область Ca^{2+} -связывающего участка находится в непосредственной близости от аминокислотных остатков, формирующих гидролитический центр фермента.

При добавлении ионов кальция к ферменту при рН 8,8 в разностном УФ-спектре (рис. 7, 1) наблюдаются положительная полоса при 300 нм, полоса при 287 нм, широкая отрицательная полоса при 275 нм и значительно увеличенная по интенсивности по сравнению с рН 7,8 полоса при 244 нм (рис. 4). Такое изменение спектра можно объяснить появлением при рН 8,8 ионизированной формы остатка тирозина, участие которого в связывании Ca^{2+} подтверждается изучением спектральных характеристик фермента, модифицированного тетранитрометаном. Как было показано [2], тетранитрометан одновременно модифицирует два остатка тирозина в 3-м и 27-м положениях полипептидной цепи без изменения вторичной структуры фосфолипазы A_2 (рис. 8, 2). Хотя получить производное фермента, модифицированное по одному остатку тирозина, не удалось, фосфолипаза A_2 , нитрованная преимущественно по остатку тирозина-27, дает при добавлении CaCl_2 разностный спектр с полосой 430 нм, характерной для зарядовой пертурбации нитротирозина (рис. 9, 2), тогда как образец, содержащий в основном $\text{Tyr}^3(\text{NO}_2)$, обладает спектром, аналогичным спектру нативного фермента. Важно, что добавление лизолецитина (аналога

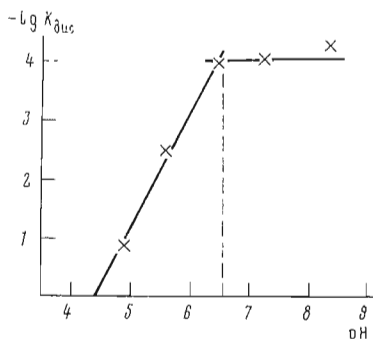


Рис. 6

Рис. 6. Зависимость константы диссоциации комплекса фосфолипаза A_2 – Ca^{2+} от pH

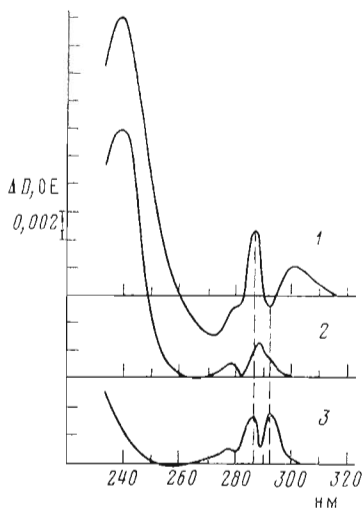


Рис. 7

Рис. 7. Разностные УФ-спектры фосфолипазы A_2 ($1,5 \cdot 10^{-5}$ M) в присутствии $CaCl_2$ ($1,5 \cdot 10^{-3}$ M) при pH 8,8 (1) и 5,6 (2). Кривая 3 – разностный спектр растворов фосфолипазы (pH 7,8) с концентрациями $4,64 \cdot 10^{-5}$ (длина оптического пути l 1 см) и $4,64 \cdot 10^{-6}$ (l 10 см)

субстрата) к нитрованной фосфолипазе A_2 не приводит к появлению в спектре полос нитротирозина, что указывает на отсутствие пертурбации этих остатков при связывании фермента с субстратом. Из анализа этих спектров видно, что остаток тирозина-27 находится вблизи Ca^{2+} -связывающего центра и является одним из лигандов иона металла в образовавшемся комплексе.

Положительная полоса при 242 нм в разностном УФ-спектре комплекса фермента с ионами кальция (рис. 4, 7) не может быть отнесена к полосе ионизированного остатка тирозина, поскольку она сохраняется даже при pH 4,5, т. е. в условиях протонированной формы этого остатка. Увеличение ее интенсивности при pH 8,8 и небольшое смещение до 244 нм можно объяснить вкладом от полосы ионизированного остатка тирозина. Полоса при 242 нм была также обнаружена при аналогичном исследовании панкреатической фосфолипазы A_2 [26] и фермента из яда змеи *V. gabonica* [27]. Предполагается, что эта полоса относится к функционально важному остатку гистидина, входящему в активный центр фермента. Действительно, модификация единственного остатка гистидина-47 в фосфолипазе A_2 из яда среднеазиатской кобры *n*-бромфенацилбромидом [25] приводит, не нарушая вторичную структуру белка (см. спектр КД на рис. 8, 3), к исчезновению полосы при 242 нм в УФ-спектре, сохраняющем при этом полосы ароматических остатков (рис. 9, 1). Возможно, эта необычная для остатка гистидина полоса появляется благодаря зарядовому эффекту или близости какой-либо полярной группы, например фенольной группы остатка тирозина или карбоксильной группы аспарагиновой или глутаминовой кислот.

При добавлении ионов Sr^{2+} или Ba^{2+} в разностном УФ-спектре (рис. 10) появляются отрицательные полосы остатков триптофана (293, 284 и 227 нм), тирозина (288, 284 и 227 нм) и положительная полоса при 242 нм, имеющая приблизительно в 6 раз меньшую интенсивность по сравнению со спектром в присутствии ионов Ca^{2+} . Сравнение спектров (рис. 10 и 4) показывает, что в обоих случаях пертурбации подвергаются остатки триптофана, тирозина и гистидина, хотя пертурбация остатков триптофана и тирозина имеет противоположный характер. «Голубой» сдвиг полос остатков триптофана и тирозина при добавлении ионов Sr^{2+} и Ba^{2+} согласуется с переходом их в более полярное окружение, что означает

отсутствие сдвига мономер-димерного равновесия фермента в сторону образования димеров. Можно полагать, что ионы этих металлов, являясь конкурентными ингибиторами, присоединяются к ферменту в Ca^{2+} -связывающем центре или взаимодействуют с некоторыми аминокислотными остатками, входящими в этот центр, но не выполняют главную функцию ионов Ca^{2+} — не способствуют димеризации фермента.

Как уже отмечалось, разностные УФ-спектры фосфолипазы A_2 и ее комплекса с ионами кальция зависят от pH среды. На рис. 11а и б показаны кривые спектров фермента и его комплекса с Ca^{2+} при различных значениях pH. В обоих случаях присутствует полоса при 242 нм, отнесенная нами к остатку гистидина. По зависимости поглощения при 242 нм от pH определены рК ионизируемых групп (рис. 12). Для апофермента значения рК составляют 7,8 и 5,2, а для комплекса с ионами кальция — 7,8; 6,7 и 5,2. Поскольку в апоферменте интенсивность полосы при 242 нм зависит от ионизации двух групп, а в комплексе фермента с Ca^{2+} дополняется зависимостью от третьей группы с рК 6,7, можно полагать, что присоединение иона кальция к ферменту приводит к сближению групп, имеющих рК 7,8 и 5,2 и группы с рК 6,7.

Изучение зависимости спектров флуоресценции фосфолипазы A_2 от pH подтверждает и дополняет данные, полученные при анализе разностных УФ-спектров. Известно [28], что флуоресценция белков, содержащих остатки ароматических аминокислот, в основном определяется флуоресценцией триптофана. Кривая зависимости максимума флуоресценции нативной фосфолипазы от pH (рис. 13, 1) свидетельствует, что группа с рК 6,7 находится вблизи остатков триптофана. Кроме того, обнаруживается близость к триптофану еще одной группы (с рК 3,5), очевидно карбоксильной.

Из аминокислотной последовательности фосфолипазы A_2 из яда кобры *N. n. oxiana* известно, что она содержит два остатка триптофана: в 18-м и 61-м положениях полипептидной цепи. Модификация остатка триптофана-61 *o*-нитрофенилсульфенилхлоридом (Nps-хлоридом) не нарушает вторичной структуры белковой молекулы (спектр КД на рис. 8, 7) и сохраняет ее ферментативную активность, тогда как модификация этим реагентом остатка триптофана-18, хотя и не влияет на вторичную структуру фермента, резко снижает его способность к гидролизу субстрата. При изучении модельного соединения Н-Трр(Nps)-ОН было предварительно установлено, что введение в индольное кольцо *o*-нитрофенилсульфенильной группы полностью «тушит» триптофановую флуоресценцию. Таким образом, зависимость флуоресценции от pH фосфолипазы A_2 , модифицированной по остатку триптофана-61, должна быть обусловлена окружением остатка триптофана-18. Кривые зависимости флуоресценции от pH модифицированной по остатку триптофана-61 и нативной фосфолипазы оказались идентичными, что позволило установить близость остатка триптофана-18 к функциональным группам с рК 6,7 и 3,5, а также заключить, что флуоресценция фермента определяется в основном этим же остатком. Из этого следует, что индольное ядро триптофана-61 либо имеет небольшой квантовый выход (заметим, что рядом с ним находится сильный «тушитель» флуоресценции — цистеин-60), либо не имеет вблизи ионизируемых групп.

Добавление ионов кальция к ферменту изменяет кривую зависимости интенсивности флуоресценции от pH (рис. 13, 2). Видно, что на флуоресценцию влияет ионизация группы с рК 5,2, а группа с рК 6,7 удалена от остатков триптофана. Проявление в спектре группы с рК 5,2 нельзя объяснить уменьшением рК 6,7 до 5,2, происходящим за счет связывания ферментом ионов кальция, поскольку данные разностных УФ-спектров указывают на присутствие группы с рК 5,2 апофермента. При анализе разностных УФ-спектров было также установлено, что остаток триптофана при образовании комплекса фермент — Ca^{2+} переходит в более полярное окружение, что, очевидно, ослабляет влияющие группы с рК 6,7 на триптофановую флуоресценцию. Обнаруженные рК ионизируемых групп могут относиться к карбоксильным группам (3,5 и 5,2), к имидазольной

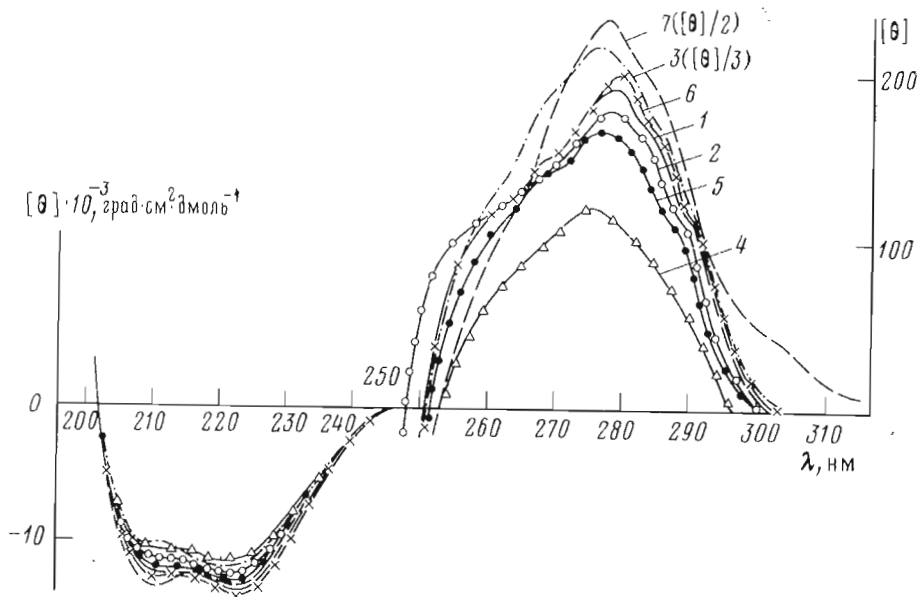


Рис. 8. Спектры КД фосфолипазы A_2 нативной (1), нитрованной (2), модифицированной по His^{47} (3), блокированной по $\alpha\text{-NH}_2$ -группе Asn^1 (4), укороченной на Asn^1 (5), гидроксамового производного фосфолипазы (6), фосфолипазы, модифицированной по Trp^{61} (7)

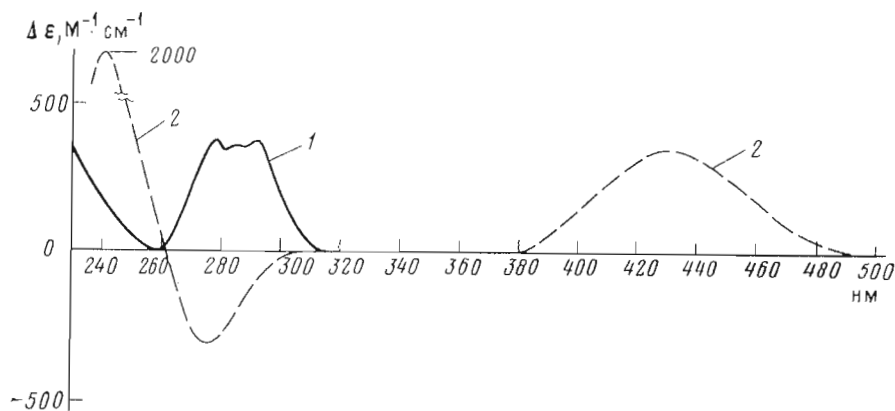


Рис. 9. Разностные спектры поглощения фосфолипазы A_2 , модифицированной по остатку His^{47} (1) и обработанной тетранитрометаном с преимущественной модификацией остатка Trp^{27} (2), при добавлении CaCl_2 ($\text{pH } 8,0$, $c_{\text{CaCl}_2}/c_{\text{Ф}} 200$)

группе гистидина-47 (5,2; 6,7 и 7,8) или к свободной аминогруппе (6,7 и 7,8).

Спектральные исследования фосфолипазы A_2 , модифицированной по α -аминогруппе (переамилирование *o*-фенилендиамином [1]) остатка Asn^1 , по карбоксильной группе Asp^{38} (см. «Экспериментальную часть»), а также остатку His^{47} (*n*-бромфенацилбромидом) позволили отнести значения обнаруженных рЖ к определенным аминокислотным остаткам и выяснить их роль в связывании иона кальция.

Блокирование α -аминогруппы фосфолипазы A_2 не приводит к нарушению вторичной структуры молекулы белка, о чем свидетельствует отсутствие изменений в спектре КД этого производного в области 190–240 нм (рис. 8, 4), однако в области 250–300 нм наблюдаются полосы ароматических остатков со значительно уменьшенной эллиптичностью (\sim в 2 раза по сравнению с нативной). Это указывает на конформационную перестройку молекулы фермента, которая не затрагивает вторичную структуру. Из зависимости интенсивности флуоресценции блокированной

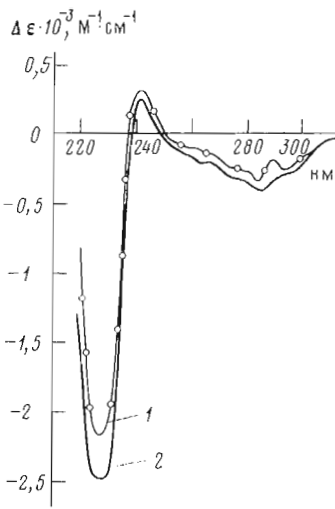


Рис. 10

Рис. 10. Разностные спектры поглощения фосфолипазы в присутствии BaCl_2 (1), SrSO_4 (2). $c_{\text{соли}}/c_{\text{Ф}}$ 200

Рис. 11. Разностные спектры поглощения фосфолипазы A_2 (а) и ее комплекса с CaCl_2 (б) при сравнении растворов рН 8,5 с растворами рН 8,0 (1), 7,5 (2), 4,0 (3). $c_{\text{Ф}} 1,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $c_{\text{CaCl}_2}/c_{\text{Ф}} 200$

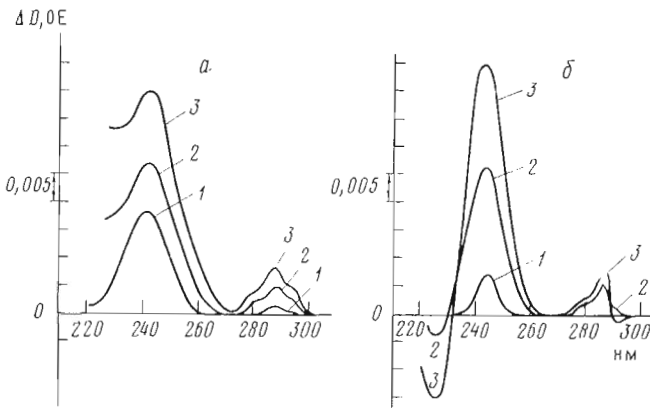


Рис. 11

по α -аминогруппе фосфолипазы A_2 от рН (рис. 13, б) также видно, что окружение остатков триптофана в этом производном существенно отличается от состояния их в нативном ферменте, при этом исчезает влияние ионизации группы с pK 6,7. Взаимодействие модифицированной по α -аминогруппе фосфолипазы A_2 с ионами кальция приводит к появлению разностного УФ-спектра (рис. 14, 1), характеризующего сильное нарушение строения Ca^{2+} -связывающего центра. Необходимо отметить, что модификация только α -аминогруппы молекулы белка влияет на ее конформацию и строение Ca^{2+} -связывающего центра, поскольку ацилирование только ϵ -аминогрупп остатков лизина не изменяет спектра КД и разностного УФ-спектра, получающегося при добавлении CaCl_2 .

Из полученных данных следует, что α -аминогруппа N-концевого остатка аспарагина необходима для поддержания нативной конформации белковой молекулы. Поскольку блокирование α -аминогруппы не нарушает ее вторичную структуру, а только меняет пространственное окружение остатков ароматических кислот, можно предположить, что конформационная перестройка молекул затрагивает состояние мономер-димерного равновесия, а именно: блокирование α -аминогруппы препятствует образованию димерной формы. Действительно, в фосфолипазе A_2 , укороченной на один аминокислотный остаток [2], наличие свободной α -аминогруппы N-концевого остатка практически полностью восстанавливает вид спектра КД в области 240–300 нм (рис. 8, 5) и разностный УФ-спектр (рис. 14, 2). Зависимости же интенсивности флуоресценции от рН для нативной и уко-

Рис. 12. Зависимость ΔD_{262} от pH по данным рис. 11

Рис. 13. Зависимость интенсивности флуоресценции от pH для нативной фосфолипазы A_2 (1), ее комплекса с $CaCl_2$ (2), фосфолипазы A_2 , укороченной на Asn^1 (3), ее гидроксамого производного (4), фосфолипазы A_2 , модифицированной по His^{47} (5) и блокированной по α -аминогруппе Asn^1 (6)

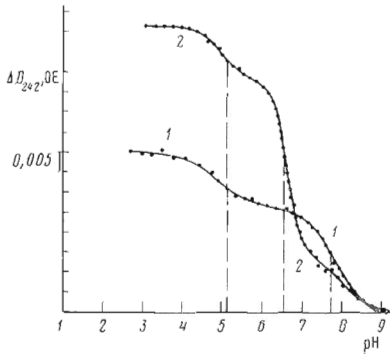


Рис. 12

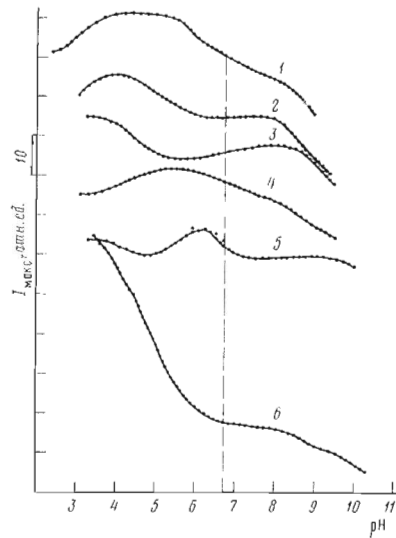


Рис. 13

роченной на один аминокислотный остаток фосфолипаз A_2 значительно различаются. Из рис. 13, 3 видно, что группа с pK 6,7 в модифицированном аналоге находится в другом окружении, а группа с pK 3,5 удалена от остатков триптофана. Можно предположить, что α -аминогруппа N-концевого остатка фосфолипазы A_2 поддерживает ее нативную конформацию, образуя внутримолекулярную водородную связь с какой-либо из карбоксильных групп. Удаление α -аминогруппы на расстояние одного аминокислотного остатка может привести к разрушению этой связи, что частично изменяет строение Ca^{2+} -связывающего центра. Предположение об отношении pK 7,8 к α -аминогруппе оказалось неверным, поскольку разностный УФ-спектр зависит при блокировании α -аминогруппы от группы с pK 7,8 и 5,2, в то же время исчезновение влияния ионизации группы с pK 6,7 в этих спектрах и спектрах флуоресценции позволяет отнести последнее значение pK к N-концевому остатку аспарагина.

Модификация карбоксильной группы аспарагиновой кислоты-38 фосфолипазы A_2 N-диазоацетил-N-(2,4-динитрофенил)этилендиамином с последующей обработкой гидроксилмином приводит к возникновению остатка гидроксамогой кислоты ($-CO-NH-OH$), что, несомненно, должно увеличить первоначальное значение pK карбоксильной группы. При такого типа модификации спектр КД (рис. 8, 6) идентичен спектру нативного фермента, а разностный УФ-спектр при взаимодействии с Ca^{2+} (рис. 14, 3) совпадает с аналогичным спектром производного фермента, укороченного на один аминокислотный остаток, что указывает на сходство строения Ca^{2+} -связывающего центра этих двух производных. Из сравнения зависимостей интенсивности флуоресценции от pH модифицированного по карбоксильной группе производного и нативного фермента (рис. 13, 1 и 4) видно, что модификация остатка Asp^{38} приводит к появлению группы с pK 4,3 вместо 3,5, из чего следует, что β -карбоксильная группа динитрофенольной кислоты имеет в нативной фосфолипазе A_2 pK 3,5, которое при химической модификации увеличивается до 4,3. Все эти данные, а также тот факт, что в фосфолипазе A_2 , укороченной на одну аминокислоту, отсутствует влияние ионизации группы с pK 3,5, свидетельствует о том, что в молекуле фосфолипазы A_2 N-концевая α -аминогруппа остатка аспарагина-1 взаимодействует с карбоксильной группой аспарагиновой кислоты-38.

Как отмечалось выше, модификация остатка гистидина-47 приводит к сильному нарушению Ca^{2+} -связывающего центра, обнаруженному по

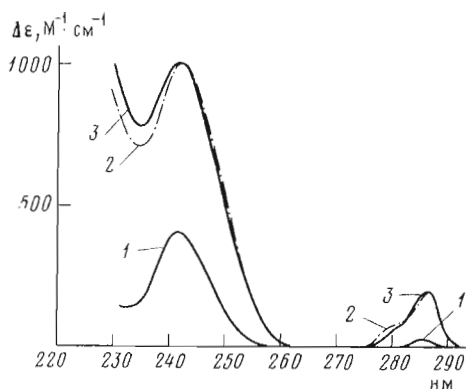


Рис. 14. Разностные спектры поглощения фосфолипазы A_2 , блокированной по α -аминогруппе (1), укороченной на Asn^1 (2), и ее гидроксамоного производного (3) в присутствии $CaCl_2$ ($c_{CaCl_2}/c_{Ф}$ 200)

разностным УФ-спектрам. Эти нарушения не связаны с изменением вторичной структуры фермента (см. рис. 8, 3). На кривой зависимости интенсивности флуоресценции от pH видно влияние ионизации двух групп с рК 6,7 и 5,45 (рис. 13, 5). Сохранение неизменной группы с рК 6,7 однозначно указывает, что имидазольная группа остатка His^{47} не имеет в нативной фосфолипазе A_2 рК 6,7. Появление группы с рК 5,45 можно объяснить близостью к остаткам гистидина и триптофана карбоксильной группы, которая в нативной молекуле удалена от остатков триптофана. Следует напомнить, что интенсивность полосы 242 нм разностного УФ-спектра апофермента зависит от ионизации двух групп с рК 7,8 и 5,2. Было установлено, что появление этой полосы в разностном УФ-спектре связано с присутствием в молекуле фермента остатка гистидина-47. Изучение блокированной по α -аминогруппе фосфолипазы A_2 показало, что рК 7,8 не относится к аминогруппе. На основании этих данных можно полагать, что рК 7,8 имеет имидазольная группа остатка гистидина-47, вблизи которой находится карбоксильная группа с рК 5,2. Нельзя исключить возможность образования водородной связи между этими группами, как было установлено для остатков His^{48} и Asp^{99} панкреатической фосфолипазы A_2 с помощью рентгеноструктурного анализа [29].

Таким образом, исследованиями нативной и модифицированных по различным группам фосфолипаз A_2 из яда кобры установлено, что фермент образует устойчивый комплекс с ионами кальция в молярном отношении 1 : 1, значение константы диссоциации которого зависит от степени ионизации α -аминогруппы N-концевого аминокислотного остатка. Образование комплекса способствует процессу димеризации белковой молекулы. Определены рК некоторых активных групп и установлены отдельные контакты между ними в молекуле апофермента и в комплексе фермента с кальцием. На основании полученных данных построена модель молекулы фосфолипазы A_2 , в которой происходит связывание фермента с ионом кальция (рис. 15). Согласно предложенной модели, в апоферменте α -аминогруппа остатка Asn^1 (рК 6,7) находится вблизи карбоксильной группы остатка Asp^{38} (рК 3,5) и Trp^{18} . Остаток His^{47} (рК 7,8) расположен рядом с карбоксильной группой (рК 5,2) остатка дикарбоновой кислоты и, возможно, образует с ней водородную связь. На образование этой водородной связи указывает также достаточно высокое значение рК 7,8 остатка His^{47} . Добавление ионов кальция приводит к сближению α -аминогруппы Asn^1 с карбоксильной группой с рК 5,2 и имидазольным кольцом His^{47} , причем одновременно остаток Trp^{18} становится более удаленным от α -аминогруппы N-концевого остатка. Одним из лигандов иона кальция в его комплексе с ферментом является остаток Tyr^{27} .

В заключение следует отметить, что функциональные группы аминокислотных остатков, обнаруженные вблизи Ca^{2+} -связывающего центра, могут выполнять определенную роль как в процессе связывания фермента с субстратом, так и в процессе каталитического гидролиза. α -Аминогруппа остатка Asn^1 может помимо функции стабилизатора нативной конформации фосфолипазы A_2 выполнять роль «фиксатора» специфического связы-

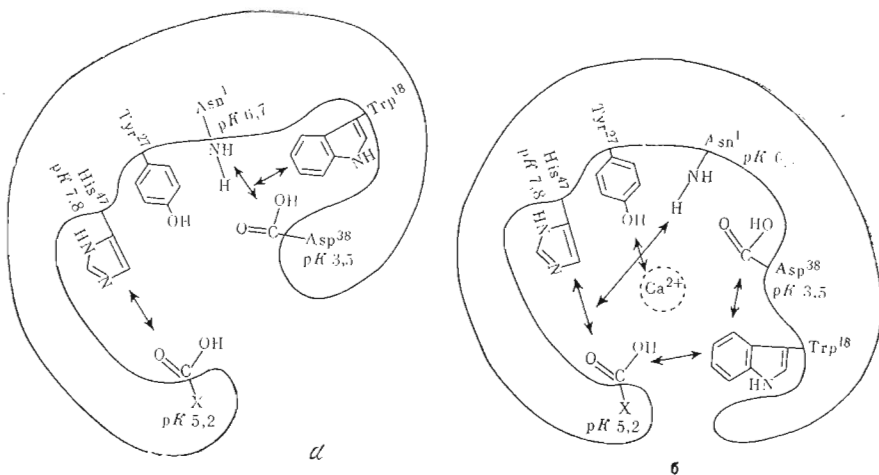


Рис. 15. Модель, иллюстрирующая установленные в настоящей работе контакты (указаны стрелками) между отдельными остатками в апоферменте (а) и в комплексе с Ca^{2+} (б)

вания субстрата в активном центре фермента. Остаток His¹⁷ посредством внутримолекулярной водородной связи взаимодействует с остатком аспарагиновой кислоты, образуя своеобразную систему для нуклеофильной атаки карбонильной группы субстрата, что характерно для некоторых сериновых гидролаз. Не исключено, что ионы кальция, связанные с функционально важными аминокислотными остатками, входящими в активный центр фермента, способствуют сдвигу равновесия на завершающей стадии реакции путем избирательного связывания освободившегося остатка жирной кислоты.

Таким образом, выводы, полученные в настоящей работе, могут оказаться полезными при обсуждении молекулярного действия фосфолипаз A_2 .

Авторы выражают благодарность руководителю настоящей работы акад. Ю. А. Овчинникову за обсуждение результатов и критические замечания.

Экспериментальная часть

Фосфолипазу A_2 (изофермент ЕЗ) из яда среднеазиатской кобры *N. n. oxiana* выделяли по ранее описанной методике [30]. Модификация фермента по остаткам гистидина, тирозина, триптофана и N-концевого аспарагина описаны в работах [1, 25]. Модификацию остатка аспарагиновой кислоты осуществляли согласно [31]. Для локализации модифицированного диазореагентом остатка аспарагиновой кислоты образец подвергали гидролизу (4 ч, 37° С) трипсином (Worthington, США) после предварительного восстановления NaBH_4 и карбоксиметилирования [31]. Гидролизат разделяли на колодке (0,7×150 см) с сефадексом G-50, тонкий (Pharmacia, Швеция), в 0,1 М аммоний-бикарбонатном буфере (pH 8,9). Фрагмент, содержащий модифицированный остаток аспарагиновой кислоты, гидролизовали 8 ч при 37° С термолизином (Worthington, США) при соотношении белок — фермент 50 : 1 в 0,1 М бикарбонате аммония (pH 8,8). Аминокислотный анализ и определение N-концевого аминокислотного остатка выделенного фрагмента соответствует пептиду последовательности 37—42 фосфолипазы A_2 . Для точной локализации модифицированного остатка аспарагиновой кислоты выделенный после гель-хроматографии на биогле P-2 (BioRad, США) фрагмент 37—42 восстанавливали NaBH_4 в условиях, описанных в работе [31]. Определение N-концевых аминокислот после кислотного гидролиза восстановленного фрагмента свидетельствует о том, что химической модификации диазореагентом подвергается остаток Asp³⁸.

Оценка вероятности случайного возникновения консервативных зон 25—52 и 96—106 (нумерация остатков согласно рис. 1) в молекулах фос-

фолипаз A_2 из яда змей и поджелудочной железы млекопитающих была выполнена с помощью численного эксперимента с применением ЭВМ. Получали и сравнивали между собой большое число (по 200 пар) искусственных гомологичных аминокислотных последовательностей с тем же аминокислотным составом и числом различающихся остатков, что и природные фосфолипазы (рис. 1). Такие последовательности образуются при произвольной перестановке столбцов в таблице первичных последовательностей рис. 1. Подсчитывали частоту встречаемости консервативных зон соответствующей длины, в которых количество аминокислотных замен не превышает заданный уровень. При доказательстве высокой консервативности участка 96—106 расчет проводился описанным образом, но из аминокислотных последовательностей удаляли столбцы от 1-й до 52-й позиции. В обоих случаях частота встречаемости и, следовательно, вероятность случайного возникновения обнаруженных консервативных зон не превышает 0,005. Расчеты были выполнены с помощью программы, составленной на языке BASIC применительно к ЭВМ «Hewlett-Packard 9830A» (США).

Спектры КД регистрировали на дихрографе-III «Roussel-Jouan» (Франция) при толщине слоя 1 и 0,01 см и концентрации белка 10^{-5} М. Скорость скалирования 0,2 нм/с, чувствительность $2 \cdot 10^{-6}$. Калибровка прибора проведена раствором энандростерона в диоксане ($\Delta\epsilon_{304}$ 3,294). $[\theta]$ — эллиптичность среднего аминокислотного остатка (M 118).

Разностные спектры поглощения получены на спектрофотометре «Beckman Asta M-VI» (США) при шкале поглощения 0,05 и 0,1 и концентрации белка не более 10^{-5} М. Титрование раствором 0,1 М $CaCl_2$ проводили в кювете с образцом, а в кювету сравнения добавляли равные объемы буфера. Для получения разностных спектров белков в зависимости от pH среды растворов в кювете с образцом поддерживали при pH 8,5, а в кювету сравнения добавляли раствор 0,1 или 2 М HCl до нужного pH.

Спектры флуоресценции снимали на спектрофлуориметре «Hitachi MPF-III» (Япония) при $\lambda_{возб}$ 280 нм, чувствительности 3,0 и щелях возбуждения и испускания 5 и 10 нм соответственно при 25°С и концентрации фермента 10^{-6} М.

Контроль за pH осуществляли с помощью pH-метра «Beckman ASAR-I» (США) с микроэлектродом «Ingold 406-M6» (США).

Использовали буферные растворы трис-HCl, 0,01 и 0,05 М.

ЛИТЕРАТУРА

1. Айялян А. Е., Сурина Е. А., Мирошников А. И., Гевод В. С., Ксенжек О. Биоорг. химия 1982, т. 8, № 3, с. 364—376.
2. Овчинников Ю. А., Мирошников А. И., Назимов И. В., Ансалон У. Р., Солдатова Л. Н. Биоорг. химия, 1979, т. 5, № 6, с. 805—813.
3. Ансалон У. Р., Айялян А. Е., Мещерякова Е. А., Сурина Е. А., Мирошников А. И., Готильф И. М., Магазаник Л. Г. Биоорг. химия, 1980, т. 6, № 7, с. 1068—1077.
4. Henrikson R. L., Krueger E. T., Keim P. S. J. Biol. Chem., 1977, v. 252, № 14, p. 4913—4921.
5. IUPAC — IUB Commission on Biochemical Nomenclature. A oneletter notation for amino acid sequences. — Eur. J. Biochem., 1968, v. 5, № 2, p. 151—153.
6. Horwitz I., Strickland E. H., Billups C. J. Amer. Chem. Soc., 1969, v. 91, № 1, p. 184—190.
7. Horwitz I., Strickland E. H., Billups C. J. Amer. Chem. Soc., 1970, v. 92, № 7, p. 2119—2129.
8. Strickland E. H., Wilchek M., Horwitz I., Billups C. J. Biol. Chem., 1970, v. 245, № 16, p. 4168—4177.
9. Bewley T. A. Biochemistry, 1977, v. 16, № 2, p. 209—215.
10. Bewley T. A. Biochemistry, 1977, v. 16, № 20, p. 4408—4414.
11. Viljoen C. C., Visser L., Botes D. P. Biochim. et biophys. acta, 1976, v. 438, № 2, p. 424—436.
12. Jirgensons B., de Haas G. H. Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 494, № 2, p. 285—292.
13. Chen I.-H., Jang J. T., Chau K. H. Biochemistry, 1974, v. 13, № 17, p. 3350—3359.
14. Chou P. I., Fasman G. D. Biochemistry, 1974, v. 13, № 2, p. 211—222.
15. Chou I.-H., Fasman G. D. Biochemistry, 1974, v. 13, № 2, p. 222—244.
16. Wu T. T., Szu S. S., Jernigan R. L., Bilofsky H., Kabat E. Biopolymers, 1978, v. 17, № 2, p. 555—572.
17. Argos P., Hanei M., Garavito R. M. FEBS Lett., 1978, v. 93, p. 19—24.

18. *Dijkstra B. W., Drenth J., Kalk K. H., Vandermermaelen P. J. J.* Mol. Biol., 1978, v. 124, № 1, p. 53-60.
19. *Ансалон У. Р., Мирошников А. И.* Биоорг. химия, 1980, т. 6, № 5, с. 773-779.
20. *Schulz G. E., Schirmer R. H.* In: Principles of protein structure. Spring-Verlag, 1979, p. 224-226.
21. *Hol W. G. J., van Duijnen P. T., Berendsen H. J. C.* Nature, 1978, v. 273, p. 443-446.
22. *Jeng T. W., Fraenkel-Conrat H.* FEBS Lett., 1978, v. 87, № 2, p. 291-296.
23. *Haberman E., Breithaupt H.* Toxicon, 1978, v. 16, № 1, p. 19-30.
24. *Tchorbanov B., Grichin E., Aleksiev B., Ovchinnikov Yu.* Toxicon, 1978, v. 16, № 1, p. 37-44.
25. *Ансалон У. Р., Мецеракова Е. А., Галстухов В. П., Шамборант О. Г., Ивановская Е. Г., Назимов И. В., Ефремов Е. С., Мирошников А. И.* Тезисы советско-американского симпозиума по химии и физике белка. Рига, 1976, с. 107-108.
26. *Pieterse W. A., Volwerk J. J., de Haas G. H.* Biochemistry, 1974, v. 13, № 7, p. 1439-1445.
27. *Viljoen C. C., Botes D. P., Schabert J. C.* Toxicon, 1975, v. 13, № 2, p. 343-351.
28. *Weber G.* Biochem. J., 1960, v. 75(1), p. 345-352.
29. *Dijkstra B. W., Kalk K. H., Drenth J. J.* Mol. Biol., 1981, v. 147, № 1, p. 97-123.
30. *Ансалон У. Р., Шамборант О. Г., Мирошников А. И.* Биоорг. химия, 1977, т. 3, № 11, с. 1553-1559.
31. *Желковский А. М., Гиподман Л. М., Антонов В. К.* Биоорг. химия, 1978, т. 4, № 12, с. 1665-1672.

Поступила в редакцию
30.X.1981

ON THE STRUCTURE OF Ca²⁺ BINDING CENTER IN PHOSPHOLIPASE A₂ FROM THE VENOM OF CENTRAL ASIAN COBRA *NAJA NAJA OXYLANA*

MESHCHERYAKOVA E. A., AIANYAN A. E., KOSTETSKY P. V., MIROSHNIKOV A. I.

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

CD, difference UV and fluorescence spectroscopy were used to estimate the effects of modifications at α -amino group, or at His⁴⁷, Asp³⁸, Tyr³ and Tyr²⁷, Trp¹⁸ and Trp⁶¹ residues of the cobra venom phospholipase A₂ on its conformation and Ca²⁺ binding. It was found that Ca²⁺ binding exerts no influence on the phospholipase A₂ secondary structure, has a 1:1 stoichiometry and depends on the ionization of N-terminal amino group (pK 6,7) nearest in the apo-enzyme with Asp³⁸ carboxyl (pK 3,5). CD studies revealed the stabilizing role of Asn¹ α -amino group in maintaining the enzyme native conformation. Difference UV-spectra disclosed near the Ca²⁺ binding center the His⁴⁷ (pK 7,8) and a carboxylic group (pK 5,2). These two groups are approached by N-terminal amino group upon Ca²⁺-enzyme complexation. Studies on a nitrated derivative of the enzyme revealed that Tyr²⁷ is one of the Ca²⁺ ligands. A model for the Ca²⁺ binding site in phospholipase A₂ was proposed basing on the obtained results.