



УДК 577.153.04

ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РОЛИ АМИНОКИСЛОТНЫХ
ОСТАТКОВ ФОСФОЛИПАЗЫ A_2 МЕТОДАМИ
ХИМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ

Айанян А. Е., Сурина Е. И., Мирошников А. И.

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

Гевод В. С., Ксенжек О. С.

Химико-технологический институт, Днепропетровск

Исследовано влияние химической модификации α -аминогруппы N-концевого остатка аспарагина, остатков тирозина и триптофана на ферментативные и антигенные свойства молекулы фосфолипазы A_2 из яда кобры. Показана роль отдельных аминокислот в процессе взаимодействия фермента с монослоями фосфолипидов.

Использование фосфолипаз A_2 в качестве инструментов исследования процессов передачи нервного возбуждения, а также для изучения функциональной роли мембранных белков предполагает детальное выяснение тонких механизмов взаимодействия этих ферментов с организованной поверхностью мембранной системы, выяснение роли отдельных аминокислотных остатков, участвующих в такого типа взаимодействиях [1, 2]. Выяснение функциональной роли отдельных аминокислот необходимо и для иммунохимического анализа.

Ранее было найдено, что в фосфолипазе A_2 из яда кобры *Naja naja oxiana* помимо остатка гистидина-47, входящего в активный центр фермента [3], определенную функциональную роль играют остаток аргинина-16 [4] и карбоксильная группа локализованного остатка аспарагиновой кислоты [5, 6]. Для проявления специфического действия важна также α -аминогруппа N-концевого остатка аспарагина, поскольку полное ацилирование белковой молекулы уксусным ангидридом или N-оксисукцинимидом приводит к потере ферментативной активности, в то время как блокирование только ϵ -аминогруппы остатков лизина не сказывается на способности фермента к гидролизу фосфолипидов [7].

Цель настоящей работы — продолжение исследований функциональной роли α -аминогруппы фосфолипазы A_2 , остатков тирозина и триптофана с помощью специфических химических реагентов, а также изучение влияния химической модификации на взаимодействие фермента с антигенами и с организованной поверхностью субстрата.

Химическая модификация α -аминогруппы N-концевого остатка. Для селективной модификации α -аминогруппы в фосфолипазе A_2 из яда кобры была использована реакция переаминирования, не затрагивающая ϵ -аминогруппы остатков лизина и функциональные группы других аминокислот [8]. Эта реакция позволяет не только специфически блокировать N-концевую аминогруппу, но и получить аналог белковой молекулы, укороченный на один аминокислотный остаток.

Обычно блокирование α -аминогруппы в белках глиоксидатом натрия в присутствии ионов меди при pH 5,5 проходит за 30 мин, в присутствии ионов никеля при pH 7 — за 1 ч [9]. Так как модификация при pH 5,5 в нашем случае практически не идет (рис. 1), мы проводили реакцию при pH 6,5—6,7 в присутствии ионов меди (при pH 7 в присутствии ионов никеля результат тот же). Мы показали, что при низких концентрациях белка (ниже $5 \cdot 10^{-5}$ М, фермент преимущественно в мономерном состоянии) реакция протекает быстрее, чем при более высоких концентрациях.

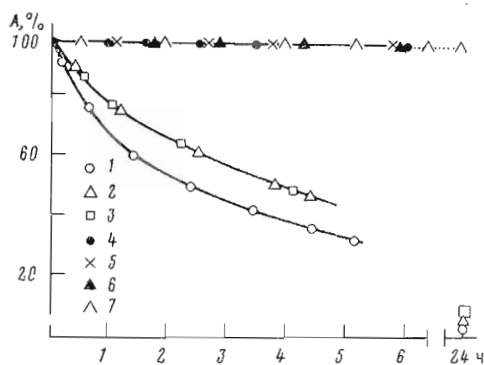


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость фосфолипазной активности от условий реакции переаминирования: в присутствии 8 мМ Cu^{2+} , pH 6,5, в Na-ацетатном буфере (1); то же с добавкой 0,01 М CaCl_2 (2); 0,01 М SrCl_2 (3) или лизолецитина (2 мг/мл) (4), лизолецитина + 0,01 М CaCl_2 (5), лизолецитина + SrCl_2 (6); тот же буфер, содержащий 8 мМ Cu^{2+} , при pH 5,5 (7)

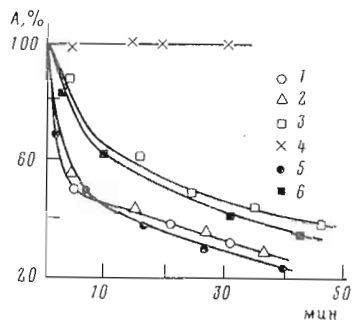


Рис. 2

Рис. 2. Инактивация фосфолипазы A_2 тетранитрометаном (10-кратный избыток) в 0,05 М трис-НСI-буфере, pH 8 (1); то же с добавкой CaCl_2 (2), SrCl_2 (3); то же в присутствии лизолецитина (4) с добавкой CaCl_2 (5) или SrCl_2 (6). Концентрация CaCl_2 — 0,01 М, SrCl_2 — 0,01 М, лизолецитина — 2 мг/мл

Из этого следует, что N-концевая часть молекулы фосфолипазы, возможно, участвует в процессе димеризации. При добавлении ионов Ca^{2+} (кофактор фермента) или ионов Sr^{2+} (ингибитор) ход реакции не изменяется, в то время как аналог субстрата — лизолецитин практически полностью защищает фермент от инактивации (рис. 1).

Полноту реакции модификации оценивали как качественно (определение N-концевой аминокислоты дансильным методом), так и количественно — определением карбоксильной группы с помощью 2,4-динитрофенилгидразина [9].

Через 6 ч реакции степень модификации составила 60% при сохранении ~20% активности (рис. 1). Эти данные свидетельствуют о пониженной реакционной способности α -аминогруппы, обусловленной, возможно, образованием ею водородной связи с какой-либо отрицательно заряженной группой белка. Увеличение времени реакции до 24 ч приводит к полностью модифицированному и инактивированному аналогу.

Модифицированный образец (6 ч реакции) отделяли от немодифицированного белка ионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе. Полученный препарат гомогенен по данным диск-электрофореза в полиакриламидном геле при pH 4,5; его аминокислотный анализ показывает лишь некоторое уменьшение содержания остатков Asx по сравнению с нативным образцом.

Для отщепления модифицированного N-концевого аминокислотного остатка был использован *o*-фенилэдиамин [8]. По завершении реакции (18 ч) молекулу фосфолипазы A_2 , укороченную на один аминокислотный остаток, выделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-25. Индивидуальный, по данным диск-электрофореза и аминокислотному анализу (включая определение N-концевого Leu), аналог фосфолипазы A_2 не обладал ферментативной активностью.

Модификация остатков тирозина. Роль остатков тирозина в проявлении фосфолипазами каталитических свойств неясна, хотя накопилось немало данных, указывающих на их функциональную значимость [6, 10]. При обработке фосфолипазы A_2 из яда кобры 5—10-кратным избытком тетранитрометана ферментативная активность по отношению к мицеллярному субстрату уменьшается вдвое уже за несколько минут (рис. 2). Ионы Ca^{2+} и Sr^{2+} не влияют на реакцию модификации, в то время как аналог субстрата в концентрации 1—3 мг/мл в течение 30 мин защищает фермент от инактивации.

Известно, что при нитровании белков тетранитрометаном образуются

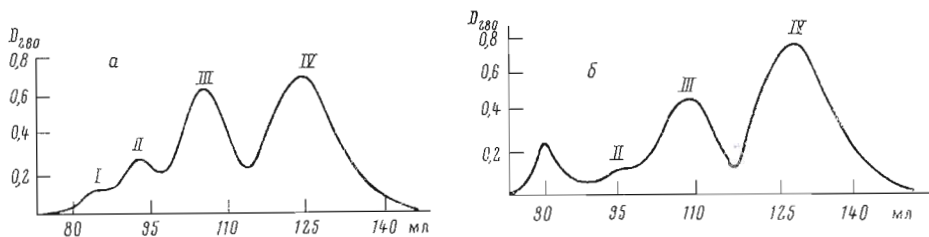


Рис. 3. Гель-фильтрация продуктов модификации фосфолипазы A_2 (15–20 мг) тетра-нитрометаном в отсутствие (а) и в присутствии (б) 3 мг/мл лизолецитина на колонке (1,5×90 см) с сефадексом G-75 (сверхтонкий), уравновешенным 0,1 М NH_4HCO_3 , рН 8. I – тетрамер, II – тример, III – димер, IV – мономер макромолекулы фосфолипазы A_2

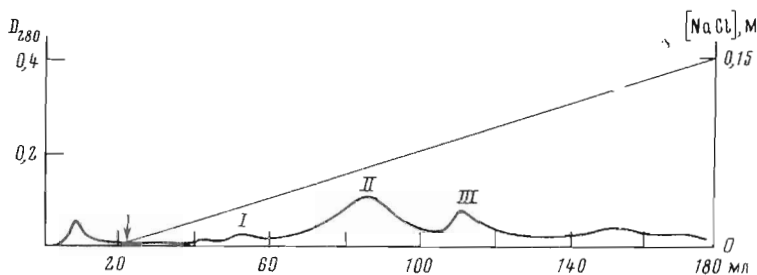


Рис. 4. Деление на QAE-сефадексе А-25 нитротирозинсодержащих продуктов (5 мг) (фр. IV, рис. 3) на колонке (1×6 см) в 0,05 М трис-НСl-буфере с градиентом концентрации NaCl

олигомеры — макромолекулы, которые можно разделить с помощью гель-фильтрации. Как видно из рис. 3, такого типа химическая модификация фосфолипазы из яда кобры приводит к образованию ~50% ковалентно сшитых олигомеров. Лизолецитин (рис. 3б) существенно снижает количество полимерных форм. Следует отметить, что олигомеры модифицированной фосфолипазы не обладают ферментативной активностью (димер, содержащий 1,5 остатка 3-нитротирозина на 1 моль белка, проявляет 2% активности). Для дальнейших исследований использовали мономерную форму фосфолипазы A_2 (~1,5 остатка $Tyr(NO_2)$ /моль белка) (пик IV, рис. 3а). Разделение этих продуктов модификации осуществляли ионообменной хроматографией на QAE-сефадексе А-25 (рис. 4). В первой фракции был найден исходный фермент, во второй и третьей — производные, содержащие 1,38 и 1,67 остатка 3-нитротирозина на молекулу белка. Полученные производные гомогенны по данным гель-электрофореза, аминокислотного анализа и определению N-концевой аминокислоты. По данным аминокислотного анализа, при модификации не были затронуты остатки триптофана и метионина. Ферментативная активность полученных производных по отношению к дипальмитоиллецитину весьма низка.

Для локализации модифицированного остатка тирозина в полипептидной цепи модифицированный образец (пик IV, рис. 3а) ацетилировали уксусным ангидридом и после восстановления дисульфидных связей и карбоксиметилирования подвергали гидролизу трипсином. N-Концевой аминокислотный анализ показал, что молекула белка расщеплена по всем остаткам аргинина. При разделении пептидов триптического гидролиза гель-фильтрацией на сефадексе G-50 (рис. 5) было найдено, что специфическое поглощение остатков 3-нитротирозина (при 428 нм) наблюдается во фракциях 4 и 7. Во фракции 4 находится смесь пептидов с N-концевыми аминокислотами лейцином и серином, а во фракции 7 — индивидуальный гексадекапептид, соответствующий N-концевому пептиду фосфолипазы [11]. После его гидролиза хмотрипсином гель-фильтрацией на биогеле Р-2 был выделен трипептид $Asn^1-Leu-Tyr^3$ с модифицированным остатком тирозина. Аналогично после гидролиза хмотрипсином фракции 4 удалось

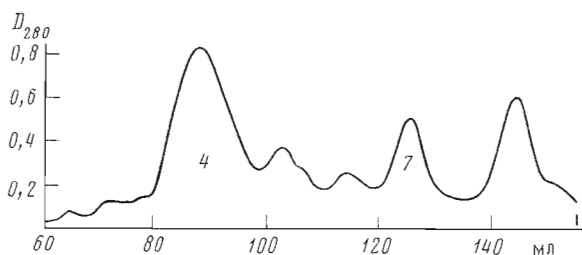


Рис. 5. Деление продуктов ограниченного триптического гидролиза нитротирозинсодержащего мономера (рис. 3, лик IV) на колонке (0,7×150 см) с сефадексом G-50 (сверхтонкий) в 0,1 М NH_4HCO_3 , pH 8,5. Отмечены фракции, содержащие нитротирозиновые остатки

выделить модифицированный трипептид $\text{Gly}^{25}\text{-Cys-Tyr}^{27}$ со следовым содержанием пептида $\text{Ala}^{22}\text{-Asn-Tyr}^{24}$ [11].

Остатки 3-нитротирозина в модифицированной фосфолипазе A_2 из яда кобры могут быть легко превращены в остатки 3-аминотирозина восстановлением гидросульфитом натрия [12]. Превращение происходит очень быстро и сопровождается исчезновением характерной желтой окраски. Реакция протекает в мягких условиях без восстановления дисульфидных связей и других побочных реакций. Ферментативная активность при такого рода модификации не восстанавливается.

Таким образом, в результате обработки фосфолипазы A_2 тетранитрометаном модификации подвергаются преимущественно остатки тирозина-3 и -27, что указывает на сравнительную их доступность по отношению к остальным восьми, замаскированным в белковой глобуле.

Модификация остатков триптофана. При изучении фосфолипазы A_2 из яда *Bitis gabonica* было высказано предположение, что модификация остатка триптофана-28, приводящая к потере ферментативной активности, связана с нарушением структуры субстратсвязывающего участка [13]. Для выяснения функциональной роли остатков триптофана в фосфолипазе A_2 из яда *N. n. oxiana* в настоящей работе был использован *o*-нитрофенилсульфенилхлорид (Nps-хлорид) — наиболее специфический реагент для модификации индольного кольца триптофана [14].

При добавлении к раствору белка в 30% уксусной кислоте 2-кратного мольного избытка Nps-хлорида за 1,5 ч происходит модификация только одного остатка триптофана на молекулу фосфолипазы A_2 , причем фермент сохраняет практически полную способность к гидролизу субстрата в мицеллярной форме. Модификация двух остатков триптофана Nps-хлоридом достигается в 50% уксусной кислоте в присутствии 5 М мочевины за 2 ч. Остаточная ферментативная активность при этом не превышала 8% первоначальной. Для локализации модифицируемого остатка триптофана в образце модифицированной фосфолипазы с сохраненной ферментативной активностью изучали продукты полного триптического гидролиза препарата после восстановления в нем дисульфидных связей и карбоксиметилирования.

На рис. 6 представлен профиль элюирования полученной смеси пептидов. Во фракции, поглощающей при 365 нм, был идентифицирован пептид, по N-концевой аминокислоте и аминокислотному составу (Cys(Cm) 0,79(1), Ser 0,97(1), Pro 0,87(1), Gly 1,01(1), Ile 0,99(1), Tyr 0,96(1), Phe 0,92(1), Lys 0,89(1), Trp(Nps) 1(1)) соответствующий нонапептиду последовательности 57—65 полипептидной цепи фосфолипазы A_2 из яда кобры [11]. Этот результат однозначно указывает на то, что в мягких условиях *o*-нитрофенилсульфенилхлоридом модифицируется исключительно остаток триптофана в 61-м положении полипептидной цепи.

Таким образом, показано, что остаток триптофана-61 находится на поверхности молекулы и не играет существенной роли для проявления фосфолипазой ферментативной активности. Остаток триптофана-18 труднодоступен для действия реагента, но потеря молекулой при модифика-

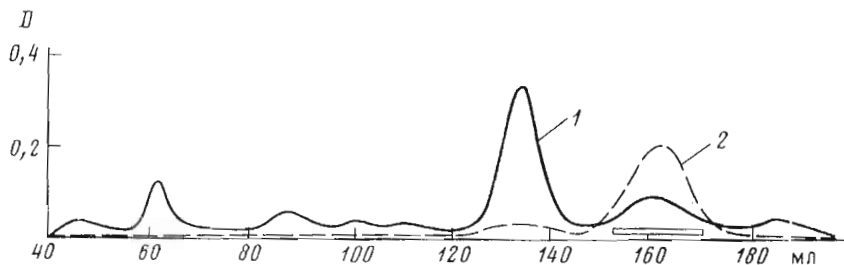


Рис. 6. Деление триптического гидролизата (супернатант) образца фосфолипазы, модифицированной Nps-хлоридом (1 моль Nps-Tгр/моль белка, 100% активность фермента) на колонке (0,7×150 см) с сефадексом G-50 (сверхтонкий) в 0,05 М аммоний-бикарбонатном буфере, pH 8, со скоростью 3 мл/ч. Контроль по поглощению при 280 (1) и 365 нм (2). Отмечена выделяемая фракция

ции Nps-хлоридом ферментативных свойств связана с нарушением функции именно этого остатка триптофана.

Влияние химической модификации на антигенные свойства фосфолипазы A₂. Поскольку при химической модификации фосфолипазы A₂ из яда кобры спектры КД производных мало отличаются от спектров КД нативного фермента [15], для выявления локальных конформационных изменений мы использовали иммунохимический метод анализа. Ранее нами было показано [7], что модификация ε-аминогрупп остатков лизина фосфолипазы A₂ определенным образом сказывается на антигенной активности белка: она не изменяется при гуанидильровании и снижается в зависимости от природы блокирующей группы, причем конформация молекулы белка в растворе практически не изменяется. Роль других аминокислотных остатков этого фермента в проявлении им антигенных свойств не исследовалась.

В данной работе мы показали, что введение *o*-нитрофенилсульфенильных групп в шидольное ядро остатков триптофана-18 и -61 молекулы фосфолипазы не вносят существенных изменений в иммунохимические свойства белка. Аналогичные результаты получены и при изучении аналога фосфолипазы A₂, модифицированного *p*-бромфенацилбромидом по остатку гистидина-47 [3]. Нитрование остатка тирозина-27 также не изменяет структуру антигенной детерминанты, поскольку происходит полное связывание модифицированного аналога с антителами, полученными к нативному ферменту. Модификация же остатка тирозина-3 снижает способность аналога к связыванию с антителами уже в существенной степени (рис. 7). Наибольшие изменения антигенной активности фосфолипазы A₂ происходят при химической модификации N-концевого фрагмента (рис. 8). Блокирование α-аминогруппы или удаление остатка аспарагина-1 приводит к снижению способности белка к связыванию с антителами.

Ранее было показано, что модификация α-аминогруппы влечет за собой изменение конформации молекулы, а отщепление N-концевого остатка аспарагина, равно как и октапептида Asn¹-Met⁸, бромцианом [7] существенно для пространственной организации фосфолипазы [15]. Как можно видеть из рис. 8, для антигенной активности модифицированных аналогов наблюдается несколько иная зависимость. Способность связываться с антителами у фермента с заблокированной α-аминогруппой (кривая 2) несколько выше, чем у образцов с отщепленным N-концевым остатком аспарагина (кривая 4) или N-концевым октапептидом (кривая 3, рис. 8). Это говорит о том, что понижение антигенной активности происходит не за счет конформационных перестроек белковой молекулы в целом, а вследствие локального изменения структуры фрагмента, отвечающего за связывание с антителами.

Этот вывод подтверждают результаты, полученные и при исследовании антигенных свойств аналога фермента, модифицированного пиридоксальфосфатом. В данной работе мы показали, что препарат, полученный по методике [7], содержит остаток пиридоксальфосфата на ε-аминогруппе

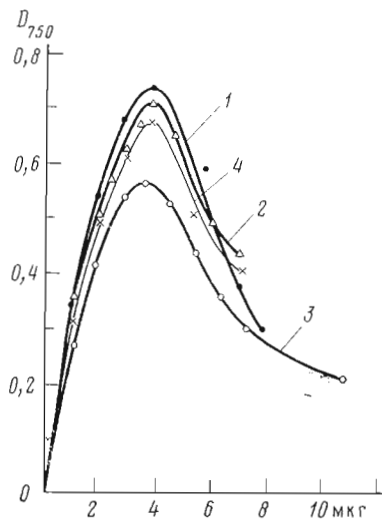


Рис. 7

Рис. 7. Кривые количественной преципитации образцов фосфолипазы: нативной (1), модифицированной тетранитрометаном со степенью модификации тирозина 1,38 (2) и 1,67 (3), модифицированной 2,4-пентадионом по остатку Arg¹⁶ (4)

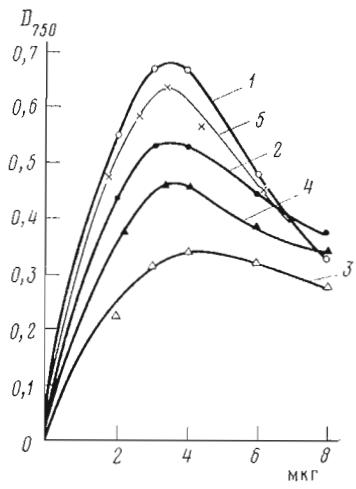


Рис. 8

Рис. 8. Кривые количественной преципитации образцов фосфолипазы: нативной (1), переаминированной (2), без восьмичленного N-концевого пептида (3), без N-концевого остатка Asn¹ (4), модифицированной пиридоксальфосфатом по остатку Lys⁶ (5)

Рис. 9. Изобары взаимодействия нативной (1), переаминированной (2), модифицированной по His⁴⁷ (3), полностью ацелированной (4) и полностью ацилированной эпантовым ангидридом (5) фосфолипазы с лецитиновыми монослоями при 15 дин/см. Концентрация белка в субфазе — $1,25 \cdot 10^{-4}$ мг/мл, t 37° С. а — изобары изменения площади, б — изобары изменения граничного потенциала. S — площадь монослоя, отвесенная к ширине кюветы, равной 1 см; τ — время протекания процесса, ΔΦ — поверхностный потенциал

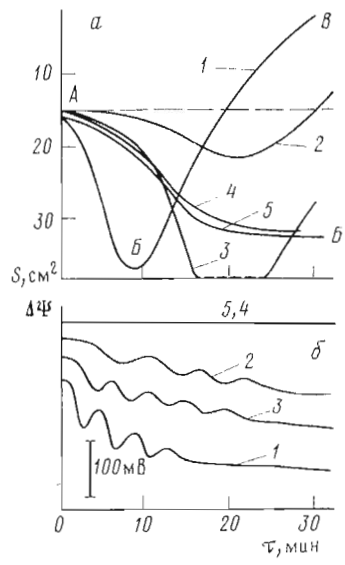


Рис. 9

лизина-6 (см. «Экспериментальную часть»). Оказалось, что этот достаточно объемный заместитель на остатке лизина-6, не влияющий на конформацию молекулы фермента [15], тем не менее приводит к изменению структуры антигенного участка фосфолипазы A₂ (кривая 5, рис. 8). Снижение антигенной активности фосфолипазы A₂ наблюдается также и при модификации ее 2,4-пентадионом по остатку аргинина-16, входящему в анционсвязывающий центр фермента (рис. 7, 4).

Приведенные данные свидетельствуют о том, что по крайней мере шесть N-концевых аминокислотных остатков в молекуле фосфолипазы A₂ из яда кобры составляют структуру одной из антигенных детерминант.

Не исключено, что функциональная роль N-концевого фрагмента молекулы фосфолипазы A₂ проявляется не только на уровне связывания с антителами, но и при взаимодействии белковой молекулы с организованной поверхностью субстрата.

Взаимодействие аналогов фермента с монослоями фосфолипидов. Ранее было показано [16], что взаимодействие фосфолипазы A₂ с организованной поверхностью субстрата проходит в две стадии. На первой из них (АБ, рис. 9а) площадь монослоя фосфолипидов расширяется из-за

Значения констант скоростей встраивания (k_1) и констант скоростей гидролиза (k_2) лецитиновых монослоев при действии нативной фосфолипазы и ее модифицированных производных

Модифицированный остаток [литература]	Активность по отношению к мицеллярному субстрату, %	$k_1 \cdot 10, c^{-1}$	$k_2 \cdot 10^3, c^{-1}$
Нативная фосфолипаза	100	13,6	4,8
α -NH ₂ и ϵ -NH ₂ -группы (энантилирование) *	0	6	0
α -NH ₂ и ϵ -NH ₂ -группы (ацетилирование) [7]	0	6	0
Arg ¹⁶ [4]	20	10,2	4,5
Tyr ³ *	10	8	3,4
His ⁴⁷ [3]	1	5,6	1,4
Lys ⁶ [7]	20	7,2	3,7
Trp ¹⁸ , Trp ⁶¹ *	1	4,6	1,6
Asp ³⁸ [5]	5-7	3,4	—
Asn ¹ (перееаминирование) *	2	2,4	2,4
Укорочение на остаток Asn ¹ *	2	2,6	2,7

* Данные настоящего сообщения.

накопления в нем белка и образования липид-белковых комплексов, а на второй сокращается вследствие растворения продуктов гидролиза в субфазе (БВ, рис. 9а).

При изучении влияния химической модификации фосфолипазы A₂ на взаимодействие с фосфолипидными монослоями помимо перечисленных аналогов мы использовали также полностью ацетилированную фосфолипазу A₂ [7], гидрофобный аналог фермента, полученный обработкой фосфолипазы A₂ энантовым ангидридом, а также продукты модификации фосфолипазы A₂ по остаткам Arg¹⁶, Lys⁶, His⁴⁷ [3, 4].

Из рис. 9 видно, что полностью ацилированные производные фосфолипазы лишены ферментативной активности: при введении этих соединений в субфазу граничный потенциал монослоев (рис. 9б) остается на прежнем уровне, а на изобарах площадей (рис. 9а) реализуется только первая стадия (АБ) — образование комплекса (изобары 4, 5).

Производные фосфолипазы A₂, полученные модификацией по остатку His⁴⁷, после введения в субфазу накапливаются в монослое с образованием липид-белковых комплексов (участки АБ) и гидролизуют фосфолипиды, превращая последние в соединения, растворимые в субфазе (участки БВ, рис. 9, изобара 3). Изобары, отражающие действие на монослой производных фермента, модифицированных по остаткам Arg¹⁶, Tyr³, Lys⁶, Trp¹⁸, Trp⁶¹, подобны изобаре 3.

Ранее было показано, что перечисленные производные фосфолипазы (за исключением аналога, модифицированного по остатку Trp⁶¹) имеют существенно пониженную способность к гидролизу мицеллярного субстрата, тем не менее, как оказалось, расщепление ими фосфолипидов в монослое происходит весьма эффективно (см. таблицу). Согласно таблице, любая из изученных модификаций фосфолипазы A₂ приводит к снижению способности белковой молекулы образовывать комплекс с фосфолипидом, т. е. способности к взаимодействию с фосфолипидным монослоем. При этом уменьшается и скорость гидролиза, хотя прямой корреляции между константами скорости образования комплекса и скорости гидролиза не наблюдается.

Сравнивая между собой ферментативную активность фосфолипазы и ее аналогов в монослое, можно выделить три различающиеся между собой группы (таблица): 1) аналоги фермента, не обладающие ферментативной активностью по отношению к субстратам в монослое; 2) производные с пониженной способностью встраивания в фосфолипидные монослои и малой ферментативной активностью; 3) модификации, существенно снижающие способность белка встраиваться в монослой, но не приводящие к существенному ингибированию гидролиза.

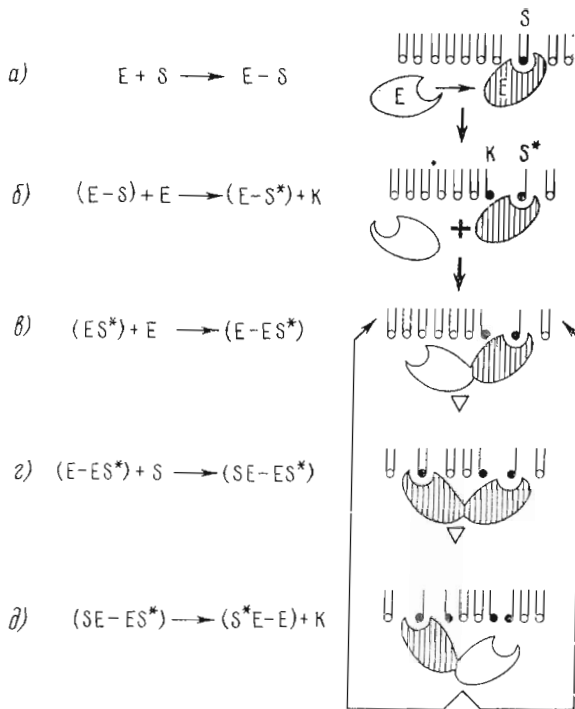


Рис. 10. Предполагаемая схема функционирования фосфолипазы A_2 при действии на организованные системы фосфолипидов (пояснения в тексте)

В первую группу попадают полностью ацилированные фосфолипазы, хотя аминокислотные остатки, входящие в каталитический центр молекулы фермента, при этом типе химической модификации не затрагивались. При этом, несмотря на модификацию N-концевой аминокислоты, сохраняется высокая способность белка проникать в фосфолипидный монослой. Это указывает на то, что связывание фермента с субстратом обусловлено не единственной аминокислотой и что ферментативная активность зависит от конформации белковой молекулы в целом.

Роль остатка Arg^{16} также существенна для связывания белковой молекулы с субстратом, поскольку гуанидиногруппа образует ионную пару с остатком фосфорной кислоты фосфолипида. Модификация остатка Arg^{16} ацетилацетоном вызывает ощутимое сужение константы встраивания, но не влияет существенно на константу гидролиза. Аналогичные результаты получены и при модификации остатка Lys^6 пиридоксальфосфатом. В реакцию вступает исключительно ϵ -аминогруппа Lys^6 , что, по-видимому, связано с предварительной фиксацией фосфатной группы реагента гуанидиногруппой остатка Arg^{16} , находящегося в непосредственной близости от модифицируемого остатка лизина. Этот тип модификации примерно в 2 раза снижает константу скорости встраивания и значительно уменьшает константу скорости гидролиза. Не исключено, что этот тип модификации фосфолипазы деформирует N-концевой фрагмент, ответственный за связывание белковой молекулы с организованной поверхностью субстрата. Аналогичные изменения в свойствах белка происходят и при нитровании остатка тирозина-3. Конформация белковой молекулы играет существенную роль в процессах взаимодействия фермента с субстратом и собственно гидролиза. Об этом свидетельствуют данные для образца фосфолипазы, модифицированной *o*-нитрофенилсульфенилхлоридом по двум остаткам триптофана, роль которых состоит, по-видимому, в поддержании оптимального пространственного расположения полипептидной цепи молекулы фермента.

Что касается остатка His^{47} , находящегося в каталитическом центре

фермента, то, как следует из кинетических измерений, модификация этого остатка *n*-бромфенацилбромидом приводит к наибольшему снижению константы скорости гидролиза и одновременно уменьшает величину константы встраивания белка с фосфолипидным монослоем.

К последней группе изученных производных фосфолипазы A_2 относятся аналоги с модифицированным N-концевым остатком аспарагина. Константы скоростей встраивания показывают, что каждый из аналогов с модифицированной N-концевой аминокислотой проявляет наименьшую способность проникать в липидный монослой, однако значения констант скоростей гидролиза при этом остаются высокими. Эти данные свидетельствуют о том, что α -аминогруппа N-концевого остатка аспарагина является ответственной за первичное связывание фосфолипазы с организованной системой субстрата. Возможно, что N-концевой участок белковой молекулы, взаимодействуя с полярным участком молекулы фосфолипида, обеспечивает оптимальную ориентацию полипептидной цепи белка относительно границы раздела фаз, способствуя связыванию белка с субстратом и второй молекулой фермента. Удаление N-концевой аминокислоты уменьшает эту способность, но существенно не сказывается на каталитической активности фермента в целом.

На основании данных, приведенных в настоящей работе, а также ранее опубликованных [16], молекулярный механизм функционирования фосфолипазы A_2 при действии на организованные системы субстрата представляется следующим. Молекула фосфолипазы A_2 , взаимодействуя посредством N-концевого фрагмента полипептидной цепи с упорядоченно организованной системой фосфолипидов, приобретает оптимальную ориентацию относительно последней (рис. 10а). При этом остатки Arg¹⁶ и His¹⁷ также включаются в процесс связывания с субстратом и способствуют образованию первичного комплекса фермент-лецитин (E-S). После гидролиза молекулы субстрата продуктами распада комплекса оказываются жирная кислота (K) и комплекс фосфолипаза — лецитин (E-S^{*}). Этот комплекс, по-видимому, удерживается на границе раздела фаз вследствие экранирования полярной группы лизолецитина каталитической полостью фермента и сильного гидрофобного взаимодействия углеводородного остатка лизолецитина с углеводородными цепями молекул лецитина, находящихся в организованной системе фосфолипидов. Конформация фосфолипазы в комплексе отличается от конформации ее в объеме электролита. Связанная в комплексе с лизолецитином, молекула фермента (рис. 10б) присоединяет еще одну молекулу белка, образуя при этом активный димерный комплекс (E-ES^{*}) (рис. 10в). Ориентация молекул фермента в этом комплексе такова, что вторая белковая молекула с помощью N-концевого фрагмента оказывается способной также связываться с фосфолипидными молекулами в монослое. При этом образуется неустойчивый димерный комплекс (ES--ES^{*}) (рис. 10г), распадающийся затем с высвобождением молекулы лизолецитина (рис. 10д). Далее цикл процесса гидролиза повторяется с высокой скоростью (рис. 10 в-д).

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

Экспериментальная часть

Выделение фосфолипазы A_2 (изофермент ЕЗ) из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana* описано ранее [17]. Ферментативную активность определяли ацидометрическим методом, используя в качестве субстрата смешанные мицеллы яичного лецитина с детергентом «Triton X-100», а также водорастворимый синтетический субстрат дибутироиллецитин. Измерения проводили на автотитраторе ТТТ2 (Radiometer, Дания) при температуре гидролиза 37°. Яичный лецитин получен из куриных желтков по обычной методике [18], дибутироиллецитин синтезирован по методике [19]. Глюкозилат натрия и *o*-нитрофенилсульфенилхлорид синтезированы по ранее описанным методам [20, 21], энантовый апидрид син-

тезирована на основе соответствующей жирной кислоты, *o*-фенилендиамин свежий перекристаллизован из хлороформа. В качестве реагентов в работе использовали также тетранитрометан (Fluka, Швейцария), гидросульфит натрия (Serva, ФРГ), пиридоксальфосфат (Sigma, США), трипсиин, химотрипсиин (Worthington, США).

Для выделения фрагментов белка и при обессоливании использовали сефадексы G-15, G-25, G-25 (сверхтонкий), G-50 (сверхтонкий), QAE A-25 (Pharmacia, Швеция), биогель P-2 (Bio-Rad, Lab., США), анионообменную целлюлозу DE-52 (Whatman, Англия).

Аминокислотный анализ модифицированных белков и пептидов проводили на аминокислотном анализаторе D-500 (Durrum, США) после 24 ч гидролиза при 110° С с 5,7 н. HCl. N-Концевой аминокислотный анализ образцов проводили дансильрованием по известной методике [22]. 3-Нитротирозинсодержащие белки и пептиды впервые были подвергнуты деградации с помощью реагента DABITS* по описанной методике [23].

Переаминирование фосфолипазы A₂ (18 мг) осуществляли по методу [9]. Реакционная смесь (10 мл) содержала 0,1–0,8 мг/мл белка, 8 мМ CuCl₂ (в отдельном опыте при pH 7,0 вместо CuCl₂ использовали NiCl₂), 2 М ацетат натрия, 0,4 М уксусную кислоту (pH 6,5). (В отдельных аналитических опытах pH составляла 5,5 или 7,0 и добавлялись реагенты SrCl₂ или CaCl₂ и лизолецитин — см. рис. 1.) К смеси добавляли гликоксилат натрия до конечной концентрации 0,2 М. За ходом реакции следили спектрофотометрически (λ 370 нм) на спектрофотометре «Gilford» (США), определяя содержание кетогрупп по реакции с 2,4-динитрофенилгидразином [9]. Через 6 ч смесь обессоливали на сефадексе G-15 в 1% уксусной кислоте и хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой DE-52 в градиенте аммоний-бикарбонатного буфера (0,05→0,15 М). Фракции, дающие положительную реакцию с 2,4-динитрофенилгидразином, собирали и лиофилизовали. Выход 80%.

Отщепление кетоацильной группы. Переаминированный белок (1 мг/мл) инкубировали 12–18 ч в растворе, содержащем 2 М ацетат натрия, 2 М уксусную кислоту, 40 мМ *o*-фенилендиамин, при 37° С [8] и белок отделяли гелем-фильтрацией на колонке с сефадексом G-15 в 1% уксусной кислоте.

Индивидуальность модифицированных белков проверяли с помощью диск-электрофореза в 15% полиакриламидном геле при pH 4,5 [24].

Пигрование фосфолипазы A₂ (5 мг) проводили в 50 мМ трис-HCl-буфере (pH 8) при концентрации белка 1 мг/мл. Тетранитрометан добавляли в 10-кратном мольном избытке в виде 1% раствора в абс. спирте [25]. В отдельном опыте реакционная смесь содержала лизолецитин (3 мг/мл). Через 20 мин белок отделяли от избытка реагента на сефадексе G-25 в 0,05 М аммоний-ацетатном буфере, pH 7, и делили на колонке с сефадексом G-75 (сверхтонкий), уравновешенным аммоний-бикарбонатным буфером, pH 8 (рис. 3). Ионнообменную хроматографию фракции IV (рис. 3а) на QAE-сефадексе A-25 проводили в трис-HCl-буфере, pH 8, в линейном градиенте NaCl (рис. 4). Фракции II и III анализировали диск-электрофорезом в 7,5% полиакриламидном геле при pH 7,3 [26]. Количество модифицированных остатков тирозина в белке и пептидах (см. ниже) оценивали по данным аминокислотного анализа после 24-часового гидролиза 5,7 н. HCl.

Более точное число 3-нитротирозиновых остатков в белке (*n*) определяли исходя из поглощения белка при 275 и 428 нм при pH 8 по уравнению [27].

$$n = \frac{\varepsilon D_{428}}{4200 \cdot D_{275} - 2640 \cdot D_{128}}$$

где *n* — число Tug(NO₂), моль, ε — молярный коэффициент поглощения нативной фосфолипазы при 275 нм, ε₄₂₈ = 4200 — молярный коэффициент

* DABITS — 4-N,N-диметиламиноазобенбен-4'-изотиоцианат.

поглощения нитротирозинового остатка при 428 нм, D_{428} , D_{275} — наблюдаемые значения поглощения для модифицированного белка.

Число аминотирозиновых остатков определяли исходя из поглощения при 288 нм ($\epsilon_{288}=2800$).

Образец фракции IV (рис. 3) ацетилювали уксусным ангидридом и после восстановления дисульфидных связей и карбоксиметилирования [28] выдерживали 6 ч с трипсином (1 : 100) в 0,1 М аммоний-бикарбонатном буфере, pH 8,4. Гидролизат разделяли на колонке (0,7×150 см) с сефадексом G-50 (сверхтонкий) в 0,1 М аммоний-бикарбонатном буфере, pH 8 (рис. 5). Фракции 4 и 7, содержащие нитротирозиновые остатки (желтоокрашенные), после рехроматографии подвергали гидролизу химотрипсином (1 : 100) в течение 4 ч в 0,1 М аммоний-бикарбонатном буфере, pH 8,5, после чего гидролизат разделяли на колонке с биогеелем P-2 или с сефадексом G-15. Для калибровки колонок, а также для определения места появления окрашенного в оранжевый цвет пятна на полиакриламидной пластинке DAVITS-нитротирозина был использован чистый нитротирозин (Sigma, ФРГ).

Преращение нитротирозиновых остатков в аминотирозиновые проводили в 0,05 М трис-HCl-буфере, pH 8, при концентрации белка 1 мг/мл [12]. Через 1 мин после добавления сухого гидросульфита натрия бесцветный раствор обессоливали на сефадексе G-15 в 1% уксусной кислоте.

Модификация остатков триптофана 2-нитрофенилсульфенилхлоридом.

а) К раствору белка (5 мг/мл) в 30% уксусной кислоте, pH 3,5, при перемешивании добавляли раствор реагента в ледяной уксусной кислоте (4-кратный избыток) [14]. Через 1,5–2,5 ч модифицированный продукт подвергали гель-фильтрации на сефадексе G-25 в 1% уксусной кислоте и лиофилизовали. Степень модификации 1 моль/моль белка, активность 100%.

б) Белок выдерживали в 50% уксусной кислоте в присутствии 5 М мочевины с 40-кратным избытком реагента. Через 2 ч перемешивания избыток реагента удаляли на колонке с сефадексом G-25 в 1% уксусной кислоте. Степень модификации 2 моль/моль белка, активность ~8%.

Степень сульфитирования белка определяли спектрофотометрически при 365 нм исходя из значения $\epsilon_{365}=4000 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ (для Nps-триптофана) [14].

Образец фосфолипазы A_2 , модифицированной по методике «а» (5 мг), восстанавливали, карбоксиметилировали [28] и подвергали триптическому гидролизу в течение 6 ч при 37°С в 0,1 М бикарбонате натрия при соотношении фермент — субстрат 1 : 40. Окрашенный в желтый цвет супернатант отделяли от осадка, подвергали гель-фильтрации на сефадексе G-25 в 0,1 М аммоний-бикарбонатном буфере и полученные пептиды разделяли на колонке (0,7×150 см) с сефадексом G-50 (сверхтонкий) (рис. 6).

*Модификации фермента ацетилацетоном по остатку аргинина [4], *n*-бромфенацилбромидом по остатку гистидина [3, 29], пиридоксальфосфатом и уксусным ангидридом по ϵ -аминогруппам [7] проводили согласно описанным методикам.*

Для локализации остатка лизина, модифицированного пиридоксальфосфатом [7], 5 мг модифицированной фосфолипазы A_2 восстанавливали, карбоксиметилировали и подвергали триптическому гидролизу в течение 4 ч при 37°С в 0,1 М бикарбонате натрия при соотношении фермент — субстрат 1 : 100. Гидролизат разделяли на колонке (0,7×150 см) с сефадексом G-25 (сверхтонкий), уравновешенной 0,05 М бикарбонатом аммония (pH 8). Фракцию с максимумом поглощения при 330 нм далее разделяли на колонке с сефадексом G-15 в том же самом буфере. Определение N-концевой аминокислоты показало, что модифицированный остаток лизина находится в N-концевом декапептиде, содержащем два остатка лизина — в 6-м и 10-м положениях полипептидной цепи. Деградацией по Эдману в стандартных условиях было показано, что модифицированный остаток лизина находится в 6-м положении полипептидной цепи.

Ацилирование фермента энантичским ангидридом (C₆H₁₃CO)₂O проводили в свежеприготовленном 0,1 М фосфатном буфере с 20% *n*-пропанолом по методике [30, 31] с концентрацией белка 1–2 мг/мл в присутствии

5 М мочевины. Реагент (200-кратный избыток) добавляли порциями в течение 2 ч при 40° С (рН 8,5—9). Выдерживали 1 ч при той же температуре, добавляли раствор гидроксилamina до 0,5—1 М, через 45 мин реакционную смесь несколько раз экстрагировали гексаном и экстракт обессоливали на колонке с сефадексом G-25 в 0,1 М аммоний-бикарбонатном буфере. Лиофилизированный белок охарактеризовывали по дансильному анализу аминокислот и диск-электрофорезом в полпакриламидном геле.

Иммунизацию кроликов проводили путем введения под кожу в несколько точек 0,5 мл раствора фосфолипазы А₂ (концентрация 1 мг белка/мл 0,15 М NaCl) в смеси с адъювантом Фрейнда при соотношении 1:1. Инъекции повторяли каждые две недели. Кровь отбирали на 50-е сутки от начала иммунизации. Для работы использовали иммуноглобулиновую фракцию антисыворотки, выделенную осаждением в 1,75 М растворе сульфата аммония и последующей ионообменной хроматографией на DEAE-сефадексе при рН 5,0 [32].

Иммунопреципитация. Для определения иммунохимической активности фосфолипазы (нативной или модифицированной) использовали метод количественной преципитации [33]. К аликватам по 50 мкл иммуноглобулиновой фракции в центрифужных пробирках добавляли раствор фосфолипазы (10—50 мкл), нативной или модифицированной, и 0,1 М фосфатным буфером (рН 7,4) доводили объем до 0,4 мл. Реакционную смесь инкубировали 1 ч при 37° С и 20 ч при 4° С. Образовавшийся преципитат не менее трех раз промывали 0,15 М раствором NaCl. Количество белка в преципитате определяли по методу Лоури [34].

Методика формирования монослоев и измерения их параметров описана в работе [16]. Изобары взаимодействия модифицированных производных фосфолипазы с лецитиновыми монослоями сняты при фиксированном двумерном давлении, равном 16 дин/см, и концентрации белка в субфазе $1,25 \cdot 10^{-4}$ мг/мл (рис. 9). Кинетика встраивания белка в монослой и образование липид-белковых комплексов в первом приближении подчинена уравнению первого порядка с положительным показателем $dS/dt = k_1 \tau$, где k_1 — константа скорости встраивания белка в монослой, τ — время.

Реакциям первого порядка удовлетворяет также ход изобар поверхностного потенциала монослоев, характеризующих процесс гидролиза. Поскольку эти изобары в большинстве случаев имеют характер затухающих колебаний на фоне следующей средней линии (рис. 9б), для более четкого выделения неосциллирующего компонента экспериментальные кривые перестраивали в координатах $\ln \int_0^{\tau} (\psi) dt + \tau$. В этих координатах функция

потенциала представляет собой промодулированную колебаниями прямую. Тангенс угла ее наклона относительно оси τ равен константе скорости гидролиза (k_2).

ЛИТЕРАТУРА

1. Karlsson E. In: Snake venoms / Ed. Lee C.-Y. Berlin — Heidelberg — New York: Springer Verlag, 1979, p. 159—212.
2. Rivas E. A., Le Maire M., Gulik-Krzywicki T. Biochim. et biophys. acta, 1981, v. 644, № 1, p. 127—133.
3. Ансалон У. Р., Мецзяркова Е. А., Галстухов В. П., Шамборант О. Г., Ивановская Е. Г., Назимов П. В., Ефремов Е. С., Мирошников А. И. Тезисы Советско-американского симпозиума по химии и физике белка. Рига, 1976, с. 107—108.
4. Ансалон У. Р., Мирошников А. И., Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 5, с. 773—779.
5. Желковский А. М., Дьяков В. Л., Гинодман Л. М., Антонов В. К. Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 12, с. 1665—1672.
6. Verheij H. M., Volwerk I. I., Jansen E. H. I. M., Puyk W. K., Dijkstra B. W., Drenth J., de Haas G. H. Biochemistry, 1980, v. 19, № 4, p. 743—750.
7. Ансалон У. Р., Айанян А. Е., Мецзяркова Е. А., Сурина Е. А., Мирошников А. И., Готгильф И. М., Магазаник А. Г. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 7, с. 1068—1077.
8. Dixon H. B. F., Fields R. In: Methods in enzymology. N. Y.: Acad. Press, 1972, v. 25 (B), p. 409—419.
9. Fields R., Dixon H. B. F. Biochem. J., 1971, v. 121, № 4, p. 587—589.
10. Drenth J., Enzing C. M., Kalk K. H., Vessies I. C. Nature, 1976, v. 264, № 5584, p. 373—377.
11. Овчинников Ю. А., Мирошников А. И., Назимов П. В., Ансалон У. Р., Солдатова Л. Н. Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 6, с. 210—216.

12. Sokolovsky M., Riordan I. M., Vallee B. L. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1967, v. 27, № 1, p. 20–25.
13. Viljoen C. C., Visser L., Botes D. P. *Biochim. et biophys. acta*, 1976, v. 438, № 2 p. 424–436.
14. Scoffone E., Fontana A., Rocchi R. *Biochemistry*, 1968, v. 7, № 3, p. 971–979.
15. Меццержакова Е. А., Айянян А. Е., Косецкий П. В., Мирошников А. И. *Биоорганическая химия*, 1982, т. 8, № 3, с. 349–363.
16. Ксенжек О. С., Гевод В. С., Мирошников А. И., Айянян А. Е. *Биоорганическая химия*, 1981, т. 7, № 11, с. 1680–1687.
17. Апсалон У. Р., Шамборант О. Г., Мирошников А. И., *Биоорганическая химия*, 1977, т. 3, № 11, с. 1553–1559.
18. Wells M. A., Hanahan D. I. In: *Methods in enzymology*. New York – London: Acad. Press, 1969, v. 14, p. 179–181.
19. Robles E. C., van Den Berg D. *Biochim. et biophys. acta*, 1969, v. 187, № 4, p. 520–526.
20. Мэррей А., Уильямс Д. Л. В кн.: *Синтезы органических соединений с изотопами углерода*. М.: Изд-во иностр. лит., 1961, с. 162.
21. *Синтезы органических препаратов (сборник)*. М.: Изд-во иностр. лит., 1949, т. 2, с. 560–561.
22. Gray W. R. In: *Methods in enzymology*. N. Y.: Acad. Press, 1972, v. 25(B), p. 333–334.
23. Chang I. Y., Brayer D., Wittman-Liebold B. *FEBS Lett.*, 1978, v. 93, № 2, p. 205–214.
24. Reisfield R. A., Lewis U., Williams D. *Nature*, 1962, v. 195, № 4838, p. 281–283.
25. Sokolovsky M., Riordan I. M., Vallee B. L. *Biochemistry*, 1966, v. 5, № 11, p. 3582–3589.
26. Маурер Г. Р. В кн.: *Диск-электрофорез. Теория и практика электрофореза в полиакриламидном геле*. М.: Мир, 1971, с. 56–60.
27. Goto K., Takahashi N., Murachi T. *J. Biochem.*, 1971, v. 70, № 1, p. 157–164.
28. Grestfield A. M., Moore S., Stein W. H. *J. Biol. Chem.*, 1963, v. 238, № 2, p. 622–627.
29. Magazanik L. G., Gotgilf I. M., Slavnova T. I., Miroshnikov A. I., Apsalon U. R. *Toxicology*, 1979, v. 17, № 5, p. 477–488.
30. Drinas D., Moores G. R., Lawrence A. I. *FEBS Lett.*, 1978, v. 86, № 1, p. 49–52.
31. Lawrence A., Moores G. R. *FEBS Lett.*, 1975, v. 49, № 3, p. 287–291.
32. Harboe N., Ingild A. *Scand. J. Immunol.*, 1973, v. 2, suppl. 1, p. 161.
33. Atassi M. Z., Saplin B. *J. Biochemistry*, 1968, v. 7, № 2, p. 689–698.
34. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. *Biol. Chem.*, 1951, v. 193, № 1, p. 265–275.

Поступила в редакцию
2.XI.1981

CHEMICAL MODIFICATION STUDY INTO FUNCTIONAL ROLE OF AMINO ACID RESIDUES IN PHOSPHOLIPASE A₂

AIANYAN A. E., SURINA E. I., MIROSHNIKOV A. I., GEVOD V. S.,
KSENZHEK O. S.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow;
Chemical-Technological Institute, Dnepropetrovsk*

The consequences of chemical modification of N-terminal asparagine α -amino group, or tyrosine and tryptophan residues of the cobra venom phospholipase A₂ were studied in respect of the enzymatic and antigenic properties of the molecule. The implication of certain amino acids in the enzyme interaction with phospholipid monolayers was demonstrated.