



УДК 577.15.04

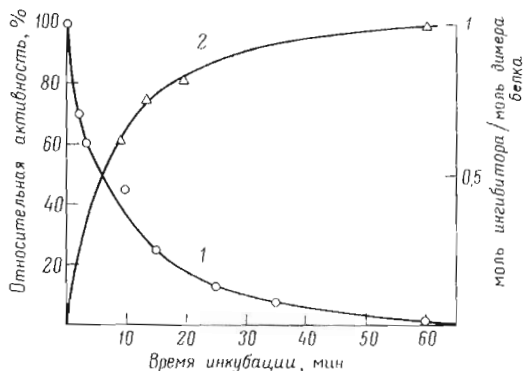
КАРБОКСИЛЬНАЯ ГРУППА В АКТИВНОМ ЦЕНТРЕ  
ФОСФОЛИПАЗЫ  $A_2$  ИЗ ЯДА КОБРЫ *NAJA NAJA OCHIANA**Желковский А. М., Ансалон У. Р., Дьяков В. Л.,  
Гиноджан Л. М., Мирошников А. И., Антонов В. К.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва*

Результаты рентгеноструктурного исследования панкреатической фосфолипазы  $A_2$  позволили предположить [1], что в активном центре этого фермента функционируют три каталитически активные группы: Asp-55, которой приписывается роль нуклеофила, His-56, стабилизирующая ориентацию карбонила расщепляемой эфирной связи субстрата, и Tyr-35, выступающая, по предположению авторов работы [1], в качестве донора протона. Важная роль имидазольной группы остатка гистидина в катализе была подтверждена модификацией панкреатической фосфолипазы  $A_2$  *n*-бромфенацилбромидом [2]. Аналогичные данные были получены [3] для фосфолипазы  $A_2$  из яда среднеазиатской кобры.

В настоящей работе мы показали, что в активном центре фосфолипазы  $A_2$  из змеиного яда функционирует карбоксильная группа, принадлежащая, по-видимому, остатку аспарагиновой кислоты. С целью обнаружения в ферменте функционально важной карбоксильной группы был использован диазореагент, *N*-диазоацетил-*N'*-(2,4-динитрофенил)-этилендиамин (I), который, как известно, в присутствии ионов меди алкилирует карбоксильную группу активного центра пепсина и ряда других кислых протеиназ [4]. Модификацию фосфолипазы  $A_2$  из яда кобры проводили следующим образом: к 1 мл раствора фермента \* с концентрацией 1 мг/мл в 0,05 М ацетатном буфере (pH 5,7) добавляли 0,5 мг  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  и через 10—15 мин вносили 1 мг ингибитора (I) в 0,1 мл ацетона. Смесь выдерживали 1,5 ч при 20°, периодически отбирая аликвоты по 0,1 мл. Активность фермента определяли титриметрически (pH-стат ТТТ-60, Radiometer, Дания) с использованием в качестве субстрата 1,2-дibuтироил-*sn*-глицерофосфорилхолина (II) (pH 8;  $10^{-3}$  М  $CaCl_2$ ) [5]. По завершении реакции смесь подвергали гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-25. Белок элюировали 0,05 М раствором уксусной кислоты и лиофилизировали.

Модификация фермента приводит к практически полной потере каталитической активности и к включению в фермент ~1 моль ингибитора на 1 моль димера белка (рисунок), что контролировалось по изменению оп-

\* Выделение фермента и характеристики его гомогенности см. в статье У. Р. Ансалона, О. Г. Шамборант, А. И. Мирошникова, которая будет опубликована в очередном номере этого журнала.



Изменение каталитической активности (1) и включение ингибитора (2) при модификации фосфолипазы  $A_2$  из яда *Naja naja oxiana* N-диазоацетил-N'-(2,4-динитрофенил)-этилендиамином. Условия — см. текст

тической плотности растворов белка при 280 и 360 нм ( $\epsilon_{360}$  20 500). Эти данные согласуются с предположением [3], согласно которому активной формой фермента является димер. В контрольных экспериментах было показано, что падение активности фермента в присутствии лишь ионов меди не наблюдается, а ингибитор (I) не взаимодействует с белком в отсутствие ионов меди. рН-оптимум ингибирования равен 5,5. Кажущаяся константа скорости первого порядка инактивации фосфолипазы  $A_2$  под действием ингибитора в рН-оптимуме,  $k_{\text{наж}}$ , равна 0,125 мин<sup>-1</sup>.

При инкубации очищенного гель-фильтрацией ингибированного белка в ацетатном буфере наблюдается медленное отщепление ингибитора и реактивация фермента. При оптимальном для реактивации значении рН 6 константа скорости реактивации составляет 0,02 мин<sup>-1</sup>.

Для доказательства образования эфирной связи между карбоксильной группой фермента и ингибитором модифицированный белок (1 мг/мл) обрабатывали 0,5 М гидроксиламином при рН 9. Через 24 ч наблюдалось полное отщепление ингибитора и включение эквимольного количества гидроксилламина в белок. Сходные результаты были получены при обработке модифицированного белка  $C^3H_3-ONH_2$ . Полученный в результате радиоактивный белок в настоящее время подвергается фрагментации с целью идентификации аминокислотного остатка, содержащего радиоактивную метку.

Таким образом, можно заключить, что в активном центре фосфолипазы  $A_2$  из яда среднеазиатской кобры (и по-видимому, в фосфолипазах  $A_2$  из других источников) имеется карбоксильная группа, играющая важную роль в катализе.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Drenth J., Enzing C. M., Kalk K. H., Vessies J. C. A. (1976) Nature, 264, 373—377.
2. Volwerk J. J., Pieterse W. A., De Haas G. H. (1974) Biochemistry, 13, 1439—1445.
3. Апсалон У. Р., Мещерякова Е. А., Галстухов В. П., Шамборант О. Г., Ивановская Е. Г., Назимов И. В., Ефремов Е. С., Мирошников А. И. (1976) Советско-американский симпозиум по химии и физике белка. Тезисы докладов, Рига, с. 107—108.
4. Stepanov V. M., Lobareva L. S., Mal'tsev N. I. (1968) Biochim. et biophys. acta, 151, 719—721.
5. Wells M. A. (1972) Biochemistry, 11, 1030—1041.

CARBOXYL GROUP IN THE ACTIVE SITE OF PHOSPHOLIPASE A<sub>2</sub>  
FROM *NAJA NAJA OXIANA* VENOM

ZHELKOVSKY A. M., APSALON U. R., DYAKOV V. L.,  
GINODMAN L. M., MIROSHINIKOV A. I., ANTONOV V. K.

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

Modification of the phospholipase A<sub>2</sub> from *Naja naja oxiana* venom by N-diazoacetyl-N'-(2,4-dinitrophenyl)-ethylenediamine in the presence of Ca<sup>2+</sup> ions leads to the parallel decrease in the catalytic activity and incorporation of one molecule of the inhibitor into the protein. The treatment of the modified protein with hydroxylamine or C<sup>3</sup>H<sub>3</sub>-ONH<sub>2</sub> results in the equimolar exchange of the inhibitor residue by these reagents without regeneration of the catalytic activity. It was concluded that the aspartic (or glutamic) acid residue essential for the catalysis is affected by modification.

---

Зав. редакцией В. И. Любимова

Адрес редакции: 117312, Москва, В-312, ул. Вавилова, дом 34, комн. 335

Телефон 135-97-27

Технический редактор Е. С. Кузьмишкина

---

Сдано в набор 20/VII-1977 г.	Т-15440	Подписано к печати 8/IX-1977 г.	Тираж 845 экз.
Зак. 2619	Формат бумаги 70×108 <sup>1</sup> / <sub>4</sub>	Усл. печ. л. 12,6	Бум. л. 4,5
			Уч.-изд. л. 13,1

---

2-я типография издательства «Наука». Москва, Шубинский пер., 10