

ХИМИЧНИ МОДИФИКАЦИИ НА ФОСФОЛИПАЗА А₂ ОТ *VIPERA AMMODYTES*: ЕФЕКТ ВЪРХУ КАТАЛИТИЧНИТЕ СВОЙСТВА

Георги Т. Дановски*, Радослав А. Александров, Магдалена П. Пенчева,
Светла Д. Петрова

Лаборатория по ензимология, Катедра Биохимия, Биологически факултет,
Софийски университет „Св. Климент Охридски“
бул. Драган Цанков № 8, 1164 гр. София, България

* e-mail: georgi_danovski@abv.bg

ABSTRACT

Snake venoms include a number of different biologically active molecules which possess diverse pharmacological effects, such as neurotoxicity, myotoxicity, cardiotoxicity, thrombocyte aggregation, haemolysis, anti-coagulation etc. The main and most toxic component, extracted from the venom of the Bulgarian subspecies *Vipera ammodytes meridionalis*, is the neurotoxin Vipoxin, a heterodimeric protein complex. It consists of two subunits – the highly toxic His⁴⁸ sPLA₂, which is a secretory phosphatidate-*sn*-2 acylhydrolase, Phospholipase A₂, EC 3.1.1.4) and an enzymatically inactive subunit, which is non-toxic. The PLA₂ mediates the Ca²⁺-dependent hydrolysis of the *sn*-2 ester bond in the phosphoglyceride molecule, which results in the forming of free fatty acids and lysophospholipids. In order to determine the connection between the enzyme's structure and its catalytic activity, several amino-acids were modified (His, Lys, Trp) which are considered essential to its catalytic mechanism. The influence of these modifications was evaluated through a comparative measurement of the activity of an unmodified enzyme and the modified forms.

Въведение

Змийските отрови представляват съвкупност от различни биологично активни молекули, притежаващи редица фармакологични ефекти, сред които невротоксичност, миотоксичност, кардиотоксичност, тромбоцитна агрегация, хемолиза, антикоагулация и др. Основният и най-токсичен компонент, изолиран от отровата на българската пепелянка (*Vipera ammodytes meridionalis*), е невротоксинът випоксин, представляващ хетеродимерен белтъчен комплекс. В неговата структура влизат две субединици: силно токсичната His⁴⁸ sPLA₂ (секреторна фосфатидат *sn*-2 ацилхидролаза, фосфолипаза А₂, EC 3.1.1.4) и ензимно неактивна и нетоксична субединица. Между двете субединици съществува силно изразена структурна хомология. Изградени са от 122 аминокиселинни остатъка и съдържат 14 Cys остатъка, образуващи 7 дисулфидни моста. При двете субединици се наблюдава 62% съвпадение на аминокиселинната секвенция (Mancheva, Aleksiev, Kleinshmidt, & Braunitzer, 1986).

Фосфолипазите от клас II A, към които принадлежи и отровата от пепелянка, катализира Ca²⁺-зависимата хидролиза на *sn*-2 естерната връзка в молекулата на фосфоглицеридите. Продукти на реакцията са мастни киселини и лизофосфолипиди. Те проявяват своята каталитична активност на границата между липидна и водна фаза, като асоциирането на ензима към граничната повърхност се осъществява чрез хидрофобни взаимодействия (с участието на Trp¹⁹). Калциевият йон (Ca²⁺–свързващата бримка включва Asp⁴⁹ и Gly³⁰) участва в позиционирането на субстратната молекула в активния център и в стабилизирането на преходното тетраедрично състояние. Реакцията на хидролиза протича чрез активиране и правилно ориентиране на молекула H₂O (с участието на His⁴⁸) в близост до карбонилния въглероден атом на мастната киселина, естерифицирана на *sn*-2 позиция. Директно участие в катализата има диадата His⁴⁸ – Asp⁹⁹, която поляризира Н-О връзката в

молекулата на водата, създавайки силен нуклеофил и осигурявайки Н-атом за напускащия лизофосфолипид. Tyr⁵² и Tyr⁷³ имат значение за поддържане на структурата на каталитичния център чрез формиране на водородни връзки чрез хидроксилните си групи с Asp⁹⁹. По време на реакцията, въглеродородни опашки на мастните киселини се намират в хидрофобен канал изграден от хидрофобни аминокиселини (Trp¹⁹ и Lys⁶⁹/Tyr⁶⁹) (Scott, White, Otwinowski, Yuan, Gelb, & Siegler, 1991).

Цел

Установяване на връзка между структурата на PLA₂ от пепелянка и нейната каталитична функция чрез химична модификация на каталитично компетентни аминокиселинни остатъци, ключови в механизма на катализа.

Материали и методи

Лиофилизирана проба от отровата на българската *Vipera ammodytes meridionalis* е предоставена от Тракийското херпетологично дружество (Стара Загора, България). Изолирането на випоксин е направено чрез препаративна колонна хроматография върху SP-Sephadex C-50 (Tchorbanov & Aleksiev, 1981).

Разделянето на двата компонента на випоксин се извършва чрез катион-обменна хроматография на колона Mono S, HR 5/5 за FPLC система (Pharmacia), уравниена с 0.05 M ацетатен буфер (pH 4,1), съдържащ 6M урея със скорост от 0.4 ml/min (Atanasov, Danchev, Mitewa, & Petrova, 2009). Пробата (5 mg) се нанася в стартов буфер и елуира с линеен градиент на NaCl (0 – 0,7M). Получените белтъчни фракции се диализират срещу 50 mM Tris-HCl с pH 8. Количеството белтък се определя по метода на Smith (Stoscheck, 1990). Проверка за чистота на получените белтъчни проби се извърши чрез SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

Активността на ензима е определяна чрез използването на синтетичен хромоген субстрат 4-нитро-3-(октаноилокси)бензоена киселина (NOBA), като се измерва абсорбцията при 450 nm на продукта на хидролизната реакция - 4-нитро-3-хидроксибензоена киселина при 37°C (Holzer & Mackessy, 1996). Определянето се провежда в 96 ямкови плаки в реакционна смес (краен обем от 250 µl), съдържаща 50 mM Tris – HCl (pH 8,0), 10 mM CaCl₂ и 100 mM NaCl и PLA₂ в крайна концентрация от 1,4 µM. Реакцията се стартира след добавянето на NOBA (крайна концентрация от 150 µM), след което на всеки 5 мин се проследява изменението на A₄₅₀. Една ензимна единица се дефинира като количеството ензим, което катализира разграждането на 1 µmol NOBA за 1 минута.

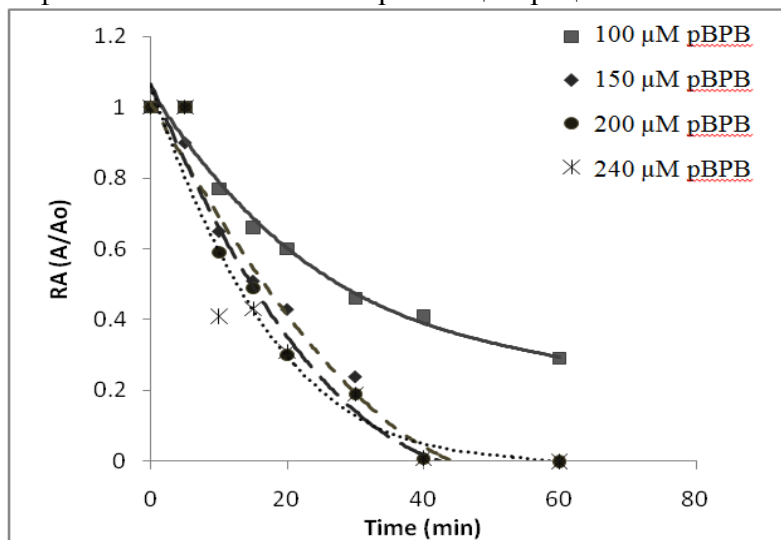
Строго специфичната химическа модификация на His остатъци във PLA₂ от випоксин се извършва чрез алкилиране с пара-бромовенацилбромид (pBPB) (Roberts, Deems, Mincey, & Dennis, 1977). За целта ензимът и модификаторът се инкубират в 50 mM Tris – HCl (pH 8,0), 10 mM CaCl₂ и 100 mM NaCl. Приложени са няколко различни концентрации на модификатора - от 100 µM до 240 µM. Всяка от пробите се инкубира в няколко повторения за интервал от време от 5 мин до 1 час. След изтичане на съответното инкубационно време се определя остатъчната ензимна активност (A/A₀, където A е активността при дадена концентрация на инактиватора, а A₀ е активността на ензима при същите условия в отсъствие на инактиватор и приемана за 1). За модифицирането на Lys остатъци на PLA₂ субединицата на випоксина с MPU (метилизурея) се прилага същата схема както с pBPB. (Kini, 1997)

Модифициране на Trp остатъци в PLA₂ субединицата на випоксина се извършва с NBS (N-бромсукцинимид) чрез спектрофотометрично проследяване на промяната на абсорбцията на ензима при 262, 280 и 292 nm. Инактиваторът се прибавя направо към кюветата с ензима на малки аликвоти (до 10 µl), разтворен в ацетатен буфер (pH 4,7) оптимален за

модифицирането. След всяко прибавяне на NBS, се измерва абсорбцията и се отделя аликвота (10 μl) за определяне на остатъчната ензимна активност при оптимални условия (Spande & Witkop).

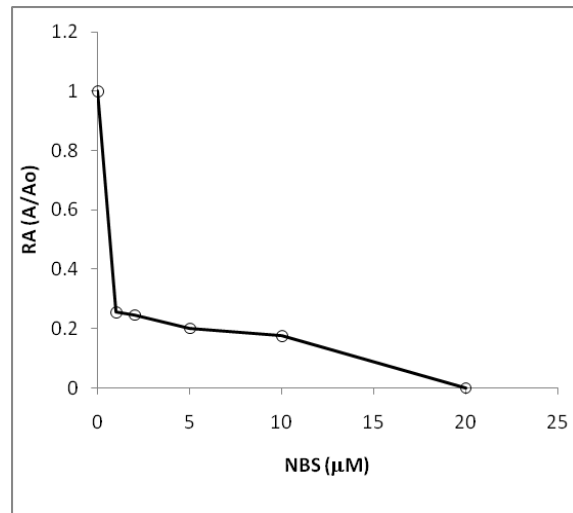
Резултати

При концентрации на pBPB по-високи от 100 μM се наблюдава бързо инактивиране на хомогенната фосфолипаза A_2 , като при концентрации от 250 μM има тотално инактивиране в реакционната среда съдържаща субстрат в 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM CaCl_2 и 100 mM NaCl, които са оптималните условия за протичане на ензимната реакция (фиг. 1). Това показва, че His остатъци са каталитично важни и дори в присъствие на 150 μM субстрат (в реакционната смес) pBPB инактивира ензима. Това обяснява и по-високата степен на инактивиране при концентрации по-високи от 100 μM - pBPB е в излишък и спрямо субстрата. Тук може да се спекулира с конкуренцията между субстрата и инактиватора за активния център на ензима, но вероятно се модифицират експонирани хистидинови остатъци, които не са важни за ензимната активност. Кинетичните изследвания при четири избрани концентрации показват, че 50% инактивиране настъпва за около 20 минути при 200 μM pBPB. След 60 минути инкубиране на ензима и инактиватора се наблюдава тотално елиминиране на фосфолипазната активност при концентрации по-високи от 100 μM .



фигура 1: Остатъчна ензимна активност на PLA_2 след модифициране с pBPB.

Модифицирането на ензима с NBS е изключително бързо и още на първата минута от прибавянето на реагента се детектира силно редуциране на ензимната активност до 25% (Фиг.2). Това показва, че много важен за ензимната активност Trp остатък се модифицира от 1 μM NBS, което е концентрация много по-ниска от тази на PLA_2 в реакционната среда (17 μM). При еквимоларни концентрации на NBS и PLA_2 се запават само 8% от активността, доказващо че триптофановите остатъци са критични за каталитичната функция на ензима чрез поддържане на структурата на каталитичния център и свързването на субстрата.



фигура 2: Инактивиране на PLA₂ от випоксин с NBS.

Модифицирането на Lys остатъци на PLA₂ субединицата на випоксина с MIU не показва висока степен на инхибиране на ензима, което потвърди схващането, че Lys остатъци не участват пряко в катализата, но са изключително важни за осъществяване на фармакологичните функции на невротоксина.

Изводи

1. Хистиридиновите остатъци са необходими за катализата на PLA₂, като ацилирането им води до пълна загуба на ензимна активност.
2. Триптофановите остатъци поддържат структурата на каталичния център и свързването на субстрата. Модифицирането им води до пълна загуба на каталитична активност.
3. Лизиновите остатъци не участват пряко в каталитичната реакция.

Acknowledgement:

This work was supported by the Bulgarian National Fund of Scientific Research (Grant DO-02-83/2008).

Използвана литература

1. Atanasov, V., Danchev, D., Mitewa, M., & Petrova, S. (2009). *Biochemistry*, 74, 339-345.
2. Holzer, M., & Mackessy, S. (1996). *Toxicon*, 34(10), 1149-1155.
3. Kini, R. M. (1997). *Venom phospholipase A2 enzymes: structure, function and mechanism*. Wiley.
4. Laemmli, U. (1970). *Nature*, 227, 680-685.
5. Mancheva, I., Aleksiev, B., Kleinshmidt, T., & Braunitzer, G. (1986). *Chem. Pept. Prot.*, 3, 167-196.
6. Roberts, M., Deems, R., Mincey, T., & Dennis, E. (1977). *J. Biol. Chem.*, 252(7), 2405-2411.
7. Scott, D., White, S., Otwinowski, Z., Yuan, W., Gelb, M., & Siegler, P. (1991). *Science*, 254(5034), 1007-1010.
8. Spande, T., & Witkop, B. (n.d.). *Meth. Enzym.*, 11, 498-506.
9. Stoscheck, C. (1990). *Meth. Enzym.*, 182, 50-69.
10. Tchorbanov, B., & Aleksiev, B. (1981). *J. Appl. Biochem.*, 3, 558-561.