



© CC Коллектив авторов, 2021
УДК 577.150.1 : 591.145.2 + 598.115.33.019.941
DOI: 10.24884/1607-4181-2021-28-4-22-28

Л. В. Галебская, Л. В. Васина*, М. А. Галкин, Ю. В. Тарасова

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

ФОСФОЛИПАЗА A_2 ЯДА ГАДЮКОВЫХ. БИОХИМИЧЕСКИЕ МИШЕНИ ДЛЯ ДЕЙСТВИЯ БЕЛКА В КРОВЯНОМ РУСЛЕ ЧЕЛОВЕКА. ЧАСТЬ 1 (обзор литературы)

Поступила в редакцию 21.01.2022 г.; принята к печати 25.02.2022 г.

Резюме

Неослабевающий в течение десятилетий интерес научного сообщества к змеиным ядам обусловлен двумя причинами. Во-первых, от укусов змей ежегодно умирает большое количество людей. Во-вторых, многочисленные компоненты змеиных ядов находят все большее применение в медицине и терапии целого ряда заболеваний.

Фосфолипазы A_2 змеиных ядов являются одними из наиболее агрессивных токсических белков, часто играя основную роль в иммобилизации и умерщвлении жертвы змеиного укуса. Эти ферменты катализируют реакцию гидролиза глицерофосфолипидов до жирных кислот и лизоглицерофосфолипидов. Однако разнообразие эффектов фосфолипаз не ограничивается только каталитическим действием. В обзоре (часть 1) рассмотрены особенности строения и свойства фосфолипаз яда змей семейства гадюковых.

Ключевые слова: фосфолипаза A_2 , яд гадюковых

Для цитирования: Галебская Л. В., Васина Л. В., Галкин М. А., Тарасова Ю. В. Фосфолипаза A_2 яда гадюковых. Биохимические мишени для действия белка в кровяном русле человека. Часть 1 (обзор литературы). *Ученые записки СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова*. 2021;28(4):22–28. DOI: 10.24884/1607-4181-2021-28-4-22-28.

* **Автор для связи:** Любовь Васильевна Васина, ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И. П. Павлова Минздрава России, 197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8. E-mail: lubov.vasina@gmail.com.

Lyudviga V. Galebskaya, Lyubov V. Vasina*, Mikhail A. Galkin, Yuliya V. Tarasova

Pavlov University, Saint Petersburg, Russia

VIPERIDAE SNAKE VENOM PHOSPHOLIPASE A_2 . BIOCHEMICAL TARGETS FOR THE ACTION OF PROTEIN IN THE HUMAN BLOOD CIRCULATORY SYSTEM. PART 1 (review of literature)

Received 21.01.2022; accepted 25.02.2022

Summary

Snake venoms have been fervently studied for decades for two reasons: 1) high death rate due to snake bites; 2) numerous components of snake venoms prove useful in medicine and treatment of diverse pathologies.

Snake venom phospholipases A_2 are among the most aggressive proteins often playing the main role in immobilization and killing of snakebite victims. These enzymes catalyze the hydrolysis of glycerophospholipids to produce lysoglycerophospholipids and free fatty acids. But the diversity of phospholipase A_2 effects is not limited to their catalytic action. In this review (Part 1), we describe the features of the structure and properties of Viperidae snake venom phospholipase A_2 .

Keywords: phospholipase A_2 , Viperidae venom

For citation: Galebskaya L. V., Vasina L. V., Galkin M. A., Tarasova Yu. V. Viperidae snake venom phospholipase A_2 . Biochemical targets for the action of protein in the human blood circulatory system. Part 1 (review of literature). *The Scientific Notes of Pavlov University*. 2021;28(4):22–28. (In Russ.). DOI: 10.24884/1607-4181-2021-28-4-22-28.

* **Corresponding author:** Lyubov V. Vasina, Pavlov University, 6-8, L'va Tolstogo str., Saint Petersburg, 197022, Russia. E-mail: lubov.vasina@gmail.com.

ВВЕДЕНИЕ

Змеиный яд представляет собой секрет ядовитых желез — аналогов паразитовидных желез других позвоночных. Еще в 1843 г. биолог Шарль Люсьен Бонапарт установил белковую природу яда гадюки *Vipera ursinii*. В настоящее время идентифицирована большая часть органических и неорганических компонентов многих змеиных ядов и установлено, что на долю веществ белково-пептидной природы приходится около 90 % сухого веса яда. Как показали исследования протеома ядов 85 видов змей семейства гадюковых (*Viperidae*), основную массу ядов составляли представители трех групп белков (все они являются ферментами): 1) фосфолипаза A_2 ; 2) сериновые протеиназы; 3) металлопротеиназы [1]. На долю этих трех групп белков приходилось от 50 до 93 % всех белковых молекул яда.

Термин «гадюковые» имеет два значения. Первое — это название семейства *Viperidae* надсемейства высших змей. Второе — это название одного из подсемейств семейства гадюковых — *Viperinae*. Всего семейство *Viperidae* включает в себя три подсемейства: 1) *Viperinae* (випериды, или истинные гадюки; 101 вид); 2) *Crotalinae* (кроталиды, или гремучие змеи; 239 видов); 3) *Azemiopinae* (два вида).

Фосфолипаза A_2 (ФЛА $_2$) является важнейшим «биохимическим оружием» не только гадюковых, но и других высших змей, а также некоторых ядовитых животных других классов (осы, пчелы, скорпионы, конусные улитки). В последнее десятилетие появилось большое число работ, описывающих протеом змеиных ядов. Содержание фосфолипазы A_2 в ядах змей подсемейства *Viperinae* (данные по 20 видам) варьировало от 5 до 64 %, а подсемейства *Crotalinae* (данные по 53 видам) — от 0,5 до 91 % [1–4]. Протеом яда одного из двух видов подсемейства *Azemiopinae* (*Azemiopinae feae*) содержал 3–4 % фосфолипазы A_2 по отношению к общему белку экскрета [5]. Со стороны как виперид, так и кроталид наблюдается значительная межродовая и межвидовая вариабельность в количестве фосфолипазы A_2 [6]. Максимальное содержание фермента было описано для представителя виперид (истинных гадюк) *Vipera nikolskii* (65 %) [7] и для представителя кроталид (гремучих змей) *Crotalus durissus cascavella* (90,9 %) [8]. У конкретного вида змей концентрация фермента изменялась не очень значительно в зависимости от активности и возраста [9].

СТРОЕНИЕ ФОСФОЛИПАЗЫ A_2 ЯДА ГАДЮКОВЫХ

Обширное белковое суперсемейство фосфолипаз A_2 состоит из шести типов ферментов, 15 групп и многочисленных подгрупп [10]. ФЛА $_2$ змеиных ядов относятся к типу малых секреторных ФЛА $_2$ (сФЛА $_2$). Ферменты этой группы, как правило, являются одноцепочечными белками, состоящими

из 115–125 аминокислотных остатков с массой 13–15 кДа [11]. По своей первичной структуре сФЛА $_2$ гадюк Нового света обладают высокой степенью гомологии с панкреатической ФЛА $_2$ человека, которая состоит из 125 аминокислотных остатков (молекулярная масса — 14 кДа), поперечно связанных семью дисульфидными связями. Панкреатическая ФЛА $_2$ других млекопитающих минимально отличается от фермента человека, как по количеству аминокислотных звеньев (124 или 123), так и по единичным заменам в 26-м, 28-м либо 32-м положениях [12].

Основным отличием сФЛА $_2$ змей является отсутствие у них зимогенной формы, т. е. дополнительного N-концевого гептапептида, отщепляемого от пищеварительных сФЛА $_2$ при переходе их в активную форму. В настоящее время выделены и охарактеризованы несколько сотен сФЛА $_2$ [13]. Определены первичные последовательности около 300 этих ферментов, что представлено в базе: http://sdmc.lit.org.sg/Templar/DB/snaketoxin_PLA2/index.html.

В классификации сФЛА $_2$ панкреатические ферменты млекопитающих относят к группе 1b. Секреторные ФЛА $_2$ яда семейства аспидовых (*Elapidae*) и морских змей (*Hydrophinae*) — к группе 1a. У млекопитающих в группу 2 входит сФЛА $_2$ синовиальной жидкости [14]. К этой же группе относятся и сФЛА $_2$ яда большинства гадюковых. Ферменты группы 2 по структуре близки к группе 1a, но обладают небольшой дополнительной C-концевой последовательностью и отличаются по организации дисульфидных связей. Группа 2 сФЛА $_2$ змей разделяется на подгруппу 2a с остатком аспартата в 49-м положении и подгруппу 2b, в которой Асп49 заменен на Лиз49. Такая замена приводит к утрате способности фермента связывать ионы кальция [15, 16] и, как следствие этого, к потере каталитической активности [17]. Подгруппа 2b встречается исключительно в яде гадюковых [18].

Различные сФЛА $_2$ близки не только по первичной структуре, но и по трехмерной организации. Кристаллографические исследования большого количества изоформ сФЛА $_2$ группы 2 [19–25], к которой относятся ферменты яда гадюковых, показали наличие трех основных участков α -спирали: N-концевая спираль Н1 (остатки 2–12), спираль Н2 (остатки 40–55) и спираль Н3 (остатки 90–108). Антипараллельные Н2 и Н3 своей гидрофобной частью погружены в сердцевину белка, а гидрофильной экспонированы на его поверхности. Имеются также две дополнительные короткие α -спирали и короткие двухнитевые β -складчатые структуры, описываемые как β -крылья. Две функционально значимые петли образуют Ca^{2+} -связывающий участок (остатки 25–35) с консервативной последовательностью ХСГХГГ и гибкую внешнюю петлю (14–23).

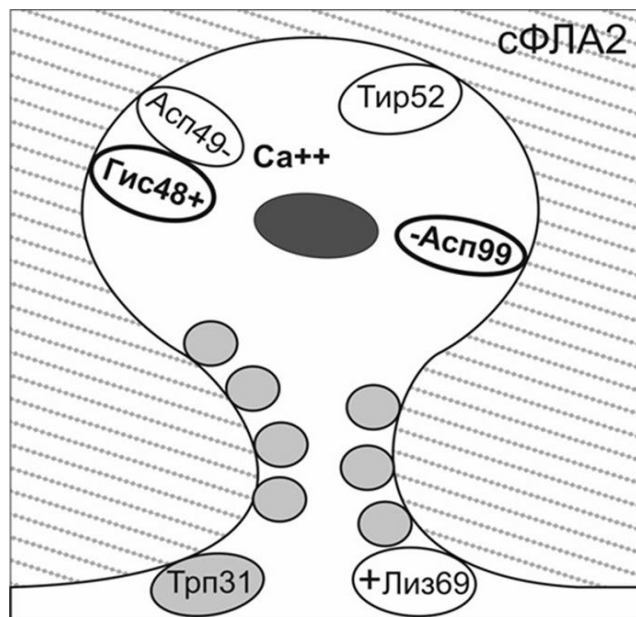


Схема строения активной поверхности секреторной фосфолипазы A_2 яда гадюковых: серые кружки обозначают боковые цепи гидрофобных аминокислот (Лей2, Фен5, Мет8, Иле9, Ала102, Фен106); затемненные овалы – диполь воды [35]

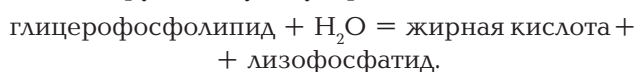
Schematic structure of the active surface of *Viperidae* snake venom secretory phospholipase A_2 : gray circles indicate the side chains of hydrophobic amino acids (Leu2, Phe5, Met8, Ile9, Ala102, Phe106); darkened ovals – water dipole [35]

Мутагенез в ходе эволюции гадюковых привел к формированию множества молекулярных форм сФЛА₂ даже в пределах одного вида. Исследование 127 изоферментов сФЛА₂ яда змей показало, что частота замен поверхностных аминокислотных остатков была в 2,6–3,5 раза выше, чем остатков, погруженных в сердцевину молекул [26]. Результатом этого эволюционно направленного мутагенеза стало расширение спектра мишеней для этих белков.

Большинство белковых и пептидных компонентов яда змей присутствуют в нем в мономерной форме. Однако некоторые из сФЛА₂ после секреции в яд образуют комплексы в форме гомодимеров [27], гетеродимеров [28] или более крупных агрегатов [29]. Довольно редко встречаются гликозилированные сФЛА₂, как, например, две кислые Асп49-фосфолипазы яда *Cerastes cerastes* (СС-PLA2-1 и СС-PLA2-2), которые содержали соответственно 2,5 и 0,5 % (по весу) углеводных компонентов [30].

ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ СВОЙСТВА СФЛА₂ ГАДЮКОВЫХ

Подобно всем формам ФЛА₂ (фосфатидат-2-ацилгидролаза; КФ 3.1.1.4), секреторная ФЛА₂ катализирует следующую реакцию:



Высококонсервативный каталитический центр фермента образован остатками **Гис48**, Асп49,

Тир52 и **Асп99** [31–34]. Жирным шрифтом выделена каталитическая диада, характерная для всех ФЛА₂, а также аспартатных протеиназ. Молекула воды, соединенная водородными связями с Гис48, принимает непосредственное участие в катализируемой реакции. Боковая цепь Асп49 необходима для удержания иона кальция [16].

На рисунке приведена схема строения активной поверхности сФЛА₂ яда гадюковых.

Каталитический центр находится в углублении, расположенном на дне канала, выстланного боковыми цепями гидрофобных аминокислот. У входа в канал располагаются остатки триптофана (Трп31) и лизина (Лиз69). Предполагаемый ход катализа [32, 33] инициируется комплексом Гис48/Асп99/ Ca^{2+} . Ион кальция, адсорбированный на Асп49, поляризует карбонильный кислород в положении sn-2 глицерофосфолипида, координируя его с внутренней молекулой воды. Боковая цепь Гис48 за счет своих щелочных свойств усиливает нуклеофильность внутренней молекулы воды, атакующей карбонильную группу сложноэфирной связи субстрата. Образуется промежуточный тетраэдрический комплекс, разрушение которого, сопровождающееся протонированием Гис48 за счет лизофосфатида, является лимитирующей стадией катализируемой реакции [36].

Центральная роль Гис48 в ФЛА₂ катализируемых реакциях доказана в экспериментах по химической модификации этого аминокислотного остатка также путем сайт-направленного мутагенеза. Так, алкилирование Гис48 фосфолипаз A_2 *p*-бромфенилсульфонидом (*p*-bromophenacyl-bromide) либо метилирование с помощью [13С] метил-*p*-нитробензолсульфоната ([13С]methyl *p*-nitrobenzenesulfonate) приводило к полной потере их ферментативной активности [32, 37–39]. Направленный мутагенез панкреатической сФЛА₂ свиньи (замены Н48К, Н48Q и Н48N) приводил к потере ферментативной активности в случае лизина при замене гистидина на глутамин и аспарагин [40]. Природная мутация D49К, встречающаяся среди сФЛА₂ ядовитых желез змей, проявляется в отсутствии у них каталитических свойств [41]. Эти белки, в отличие от активных Асп49-ФЛА₂, часто называют некаталитическими ФЛА₂-подобными токсинами, или Лиз49-ФЛА₂. Кислая некаталитическая субъединица випоксина из яда змей рода *Vipera ammodytes*, несмотря на высокую степень гомологии с каталитической субъединицей, имеет замену Асп49 на Глн49 [42]. Миотоксический компонент яда *Vipera ammodytes ammodytes* амодитоксин L с заменой D49S, т. е. Сер49 ФЛА₂, подобно Лиз49-ФЛА₂, не обладал ферментативной активностью [43].

По строению каталитического центра и механизму катализа сФЛА₂ из яда змей не отличаются от других ФЛА₂. Адсорбционный же центр этих ферментов характеризуется значительными

размерами и большим разнообразием, однако обладает общим с другими ФЛА₂ механизмом межповерхностного (interfacial) взаимодействия с субстратом [44]. Предпочтительными субстратами сФЛА₂ являются фосфатидилолины и фосфатидилэтаноламины, причем не в свободном виде, а в составе агрегатов, т. е. биологических мембран, липопротеинов, мицелл или липосом [45, 46]. Взаимодействие адсорбционного центра сФЛА₂ с субстратной поверхностью агрегированных липидов приводит к значительному (на порядки) повышению ферментативной активности, что обозначают термином «межповерхностная активация» [47, 48]. В ходе адсорбции субстрата к активной поверхности сФЛА₂ важная роль принадлежит ионному взаимодействию между остатком (или остатками) лизина фермента и фосфатными остатками субстрата [36, 49]. В случае сФЛА₂ яда гадюковых — это Лиз69 (рисунок). Из числа гидрофобных боковых цепей центральное место в адсорбции субстратов активной поверхностью ФЛА₂ принадлежит Грп31 [50].

Особенности строения и свойств наиболее изученных сФЛА₂ яда гадюковых и их разнообразные эффекты на клетки крови и белки плазмы крови человека будут рассмотрены во второй части настоящего обзора.

Конфликт интересов

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest

Соответствие нормам этики

Авторы подтверждают, что соблюдены права людей, принимавших участие в исследовании, включая получение информированного согласия в тех случаях, когда оно необходимо, и правила обращения с животными в случаях их использования в работе. Подробная информация содержится в Правилах для авторов.

Compliance with ethical principles

The authors confirm that they respect the rights of the people participated in the study, including obtaining informed consent when it is necessary, and the rules of treatment of animals when they are used in the study. Author Guidelines contains the detailed information.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Tasoulis T., Isbister G. K.* A Review and Database of Snake Venom Proteomes // *Toxins* (Basel). – 2017. – Vol. 9, № 9. – P. 290. Doi: 10.3390/toxins9090290.
2. *Chen P. C., Huang M. N., Chang J. F. et al.* Snake venom proteome and immuno-profiling of the hundred-pace viper, *Deinagkistrodon acutus*, in Taiwan // *Acta Trop.* – 2019. – Vol. 189. – P. 137–144. Doi: 10.1016/j.actatropica.2018.09.017.
3. *Segura Á., Herrera M., Reta Mares F. et al.* Proteomic, toxicological and immunogenic characterization of Mexican west-coast rattlesnake (*Crotalus basiliscus*) venom and its immunological relatedness with the venom of Central American rattlesnake (*Crotalus simus*) // *J. Proteom.* – 2017. – Vol. 158. – P. 62–72. Doi: 10.1016/j.jprot.2017.02.015.

4. *Durban J., Sanz L., Trevisan-Silva D. et al.* Integrated Venomics and Venom Gland Transcriptome Analysis of Juvenile and Adult Mexican Rattlesnakes *Crotalus simus*, *C. tzabcan*, and *C. culminatus* Revealed miRNA-modulated Ontogenetic Shifts // *J. Proteome Res.* – 2017. – Vol. 16. – P. 3370–3390. Doi: 10.1021/acs.jproteome.7b00414.

5. *Tsai I. H., Wang Y. M., Huang K. F.* Structures of *Aze-miops feae* venom phospholipases and cys-rich-secretory protein and implications for taxonomy and toxinology // *Toxicon.* – 2016. – Vol. 114. – P. 31–39. Doi: 10.1016/j.toxicon.2016.02.014.

6. *Lomonte B., Diaz C., Chaves F. et al.* Comparative characterization of Viperidae snake venoms from Perú reveals two compositional patterns of phospholipase A2 expression // *Toxicon: X.* 7. – 2020. – Vol. 100044. Doi: 10.1016/j.tox.2020.100044.

7. *Kovalchuk S. I., Ziganshin R. H., Starkov V. G. et al.* Quantitative Proteomic Analysis of Venoms from Russian Vipers of Pelias Group: Phospholipases A2 are the Main Venom Components // *Toxins.* – 2016. – Vol. 8, № 4. – P. 105. Doi: 10.3390/toxins8040105.

8. *Boldrini-França J., Corrêa-Netto C., Silva M. M. S. et al.* Snake venomics and antivenomics of *Crotalus durissus* subspecies from Brazil: Assessment of geographic variation and its implication on snakebite management // *J. Proteom.* – 2010. – Vol. 73. – P. 1758–1776. Doi: 10.1016/j.jprot.2010.06.001.

9. *Gao J. F., Wang J., He Y. et al.* Proteomic and biochemical analyses of short-tailed pit viper (*Gloydius brevicaudus*) venom: Age-related variation and composition–activity correlation // *J. Proteom.* – 2014. – Vol. 105. – P. 307–322. Doi: 10.1016/j.jprot.2014.01.019.

10. *Schaloske R. H., Dennis E. A.* The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system // *Biochim. Biophys. Acta: Molecular and Cell Biology of Lipids.* – 2006. – Vol. 1761. – P. 1246–1259. Doi: 10.1016/j.bbailip.2006.07.011.

11. *Burke J. E., Dennis E. A.* Phospholipase A2 structure/function, mechanism and signaling // *J. Lipid Res.* – 2008. – Vol. 50. – P. S237–S242. Doi: 10.1194/jlr.R800033-JLR200.

12. The complete primary structure of phospholipase A2 from human pancreas / H. M. Verheij, J. Westerman, B. Sternby, G. H. De Haas // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1983. – Vol. 747, № 1–2. – P. 93–99. Doi: 10.1016/0167-4838(83)90126-7.

13. *Tan P. T. J., Khan M. A., Brusic V.* Bioinformatics for venom and toxin sciences // *Brief. Bioinform.* – 2003. – Vol. 4. – P. 53–62. Doi: 10.1093/bib/4.1.53.

14. Secreted phospholipase A2 revisited / M. Murakami, Y. Taketomi, H. Sato, K. Yamamoto // *J. Biochem.* – 2011. – Vol. 150, № 3. – P. 233–255. Doi: 10.1093/jb/mvr088.

15. Three-dimensional structure and disulfide bond connections in bovine pancreatic phospholipase A2 / B. W. Dijkstra, J. Drenth, K. H. Kalk, P. J. Vandermaelen // *J. Mol. Biol.* – 1978. – Vol. 124, № 1. – P. 53–60. Doi: 10.1016/0022-2836(78)90146-8.

16. The role of Asp-49 and other conserved amino acids in phospholipases A2 and their importance for enzymatic activity / C. J. van den Bergh, A. J. Slotboom H. M. G. H. Verheij, de Haas // *J. Cell Biochem.* – 1989. – Vol. 39, № 4. – P. 379–390. Doi: 10.1002/jcb.240390404.

17. *Fleer E. A., Verheij H. M., de Haas G. H.* Modification of carboxylate groups in bovine pancreatic phospholipase A2. Identification of aspartate-49 as Ca²⁺-binding ligand // *Eur. J. Biochem.* – 1981. – Vol. 113, № 2. – P. 283–288. Doi: 10.1111/j.1432-1033.1981.tb05064.x.

18. *Harris J. B., Scott-Davey T.* Secreted phospholipases A2 of snake venoms: effects on the peripheral neuromuscular system with comments on the role of phospholipases A2 in disorders of the CNS and their uses in industry // *Toxins*

- (Basel). – 2013. – Vol. 5, № 12. – P. 2533–2571. Doi: 10.3390/toxins5122533.
19. Three-dimensional structure of a presynaptic neurotoxic phospholipase A2 from *Daboia russelli pulchella* at 2.4 Å resolution / V. Chandra, P. Kaur, A. Srinivasan, T. P. Singh // *J. Mol. Biol.* – 2000. – Vol. 296. – P. 1117–1126. Doi: 10.1006/jmbi.2000.3537.
20. Chandra V., Kaur P., Jasti J. et al. Regulation of catalytic function by molecular association: structure of phospholipase A2 from *Daboia russelli pulchella* (DPLA2) at 1.9 Å resolution // *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* – 2001. – Vol. 57. – P. 1793–1798. Doi: 10.1107/S0907444901014524.
21. Perbandt M., Wilson J. C., Eschenburg S. et al. Crystal structure of vipoxin at 2.0 Å: an example of regulation of a toxic function generated by molecular evolution // *FEBS Lett.* – 1997. – Vol. 412. – P. 573–577. Doi: 10.1016/S0014-5793(97)00853-3.
22. Tang L., Zhou Y. C., Lin Z. J. Crystal structure of agkistrodotoxin, a phospholipase A2-type presynaptic neurotoxin from *Agkistrodon halys pallas* // *J. Mol. Biol.* – 1998. – Vol. 282. – P. 1–11. Doi: 10.1006/jmbi.1998.1987.
23. Gu L., Zhang H., Song S. et al. Structure of an acidic phospholipase A2 from the venom of *Deinagkistrodon acutus* // *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* – 2002. – Vol. 58. – P. 104–110. Doi: 10.1107/S0907444901018170.
24. Xu S., Gu L., Jiang T. et al. Structures of cadmium-binding acidic phospholipase A2 from the venom of *Agkistrodon halys pallas* at 1.9 Å resolution // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2003. – Vol. 300. – P. 271–277. Doi: 10.1016/S0006-291X(02)02833-4.
25. Banumathi S., Rajashankar K. R., Notzel C. Structure of the neurotoxic complex vipoxin at 1.4 Å resolution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* – 2003. – Vol. 57. – P. 1552–1559. Doi: 10.1107/S0907444901013543.
26. Kini R. M., Chan Y. M. Accelerated evolution and molecular surface of venom phospholipase A2 enzymes // *J. Mol. Evol.* – 1999. – Vol. 48, № 2. – P. 125–132. Doi: 10.1007/PL00006450.
27. Correa L. C., Marchi-Salvado D. P., Cintra A. C. et al. Crystal structure of a myotoxic Asp49-phospholipase A(2) with low catalytic activity: Insights into Ca(2+)-independent catalytic mechanism // *Biochim Biophys Acta.* – 2008. – Vol. 1784. – P. 591–599. Doi: 10.1016/j.bbapap.2008.01.007.
28. Petrova S. D., Atanasov V. N., Balashev K. Vipoxin and its components: structure-function relationship // *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* – 2012. – Vol. 87. – P. 117–153. Doi: 10.1016/B978-0-12-398312-1.00005-6.
29. Doley R., Kini R. M. Protein complexes in snake venom // *Cell Mol. Life Sci.* – 2009. – Vol. 66. – P. 2851–2871. Doi: 10.1007/s00018-009-0050-2.
30. Zouari-Kessentini R., Luis J., Karray A. Two purified and characterized phospholipases A2 from *Cerastes cerastes* venom, that inhibit cancerous cell adhesion and migration // *Toxicon.* – 2009. – Vol. 53. – P. 444–453. Doi: 10.1016/j.toxicon.2009.01.003.
31. Volwerk J. J., Pieterse W. A. de Haas G. H. Histidine at the active site of phospholipase A2 // *Biochemistry.* – 1974. – Vol. 13. – P. 1446–1454. Doi: 10.1021/bi00704a020.
32. Verheij H. M., Volwerk J. J., Jansen M. G. et al. Methylation of Histidine-48 in Pancreatic Phospholipase A2: Role of Histidine and Calcium Ion in the Catalytic Mechanism // *Biochemistry.* – 1980. – Vol. 19, № 4. – P. 743–750. Doi: 10.1021/bi00545a021.
33. Dijkstra B. W., Drenth J., Kalk K. H. Active site and catalytic mechanism of phospholipase A2 // *Nature.* – 1981. – Vol. 289, № 5798. – P. 604–606. Doi: 10.1038/289604a0.
34. Li Y., Tsai M. D. Phospholipase A2 engineering. The aspartate-histidine catalytic diad also plays an important structural role // *J. Am. Chem. Soc.* – 1993. – Vol. 115. – P. 8523–8526. Doi: 10.1021/ja00072a001.
35. Renetseder R., Dijkstra B. W., Huizinga K. et al. Crystal structure of bovine pancreatic phospholipase A2 covalently inhibited by p-bromo-phenacyl-bromide // *J. Mol. Biol.* – 1988. – Vol. 200. – P. 181–188. Doi: 10.1016/0022-2836(88)90342-7.
36. Five coplanar anion binding sites on one face of phospholipase A2: relationship to interface binding / Y. H. Pan, T. M. Epstein, M. K. Jain, B. J. Bahson // *Biochemistry.* – 2001. – Vol. 40, № 3. – P. 609–617. Doi: 10.1021/bi002514g.
37. Structure of a snake venom phospholipase A2 modified by p-bromophenacyl-bromide / H. Zhao, L. Tang, X. Wang, Y. Zhou, Z. Lin // *Toxicon.* – 1998. – Vol. 36. – P. 875–886. Doi: 10.1016/S0041-0101(97)00169-4.
38. Yang C. C., King K. Chemical modification of the histidine residue in basic phospholipase A2 from the venom of *Naja nigricollis* // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1980. – Vol. 614. – P. 373–388. Doi: 10.1016/0005-2744(80)90227-2.
39. Toyama M. H., Soares A. M., Vieira C. A. et al. Amino Acid Sequence of Piratoxin-I, a Myotoxin from *Bothrops pirajai* Snake Venom, and Its Biological Activity After Alkylation with p-Bromophenacyl Bromide // *J. Protein Chem.* – 1998. – Vol. 17. – P. 713–718. Doi: 10.1007/BF02780974.
40. Janssen M. J., van de Wiel W. A. E. C., Beiboer S. H. W. et al. Catalytic role of the active site histidine of porcine pancreatic phospholipase A2 probed by the variants H48Q, H48N and H48K // *Protein Engineering.* – 1999. – Vol. 2, № 6. – P. 497–503. Doi: 10.1093/protein/12.6.497.
41. Maraganore J. M., Merutka G., Cho W. et al. A new class of phospholipases A2 with lysine on place of aspartate 49. Functional consequences for calcium and substrate binding // *J. Biol. Chem.* – 1984. – Vol. 259. – P. 13839–13843.
42. Sequence homology between phospholipase and its inhibitor in snake venom. The primary structure of phospholipase A2 of vipoxin from the venom of the Bulgarian viper (*Vipera ammodytes ammodytes*, Serpentes) / I. Mincheva, T. Kleinschmidt, B. Aleksiev, G. Braunitz // *Biol. Chem. Hoppe Seyler.* – 1987. – Vol. 368. – P. 343–352. Doi: 10.1515/bchm2.1984.365.2.885.
43. The primary structure of ammodytin L, a myotoxic phospholipase A2 homologue from *Vipera ammodytes* venom / I. Krizaj, A. L. Bieber, A. Ritonja, F. Gubensek // *Eur. J. Biochem.* – 1991. – Vol. 202, № 3. – P. 1165–1168. Doi: 10.1111/j.1432-1033.1991.tb16485.x.
44. Scott D. L., White S. P., Otwinowski Z. et al. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A2 // *Science.* – 1990. – Vol. 250. – P. 1541–1546. Doi: 10.1126/science.2274785.
45. Deems R. A., Eaton B. R., Dennis E. A. Kinetic analysis of phospholipase A2 activity toward mixed micelles and its implications for the study of lipolytic enzymes // *J. Biol. Chem.* – 1975. – Vol. 250, № 23. – P. 9013–9020.
46. Pattnaik N. M., Kézdy F., Scanu A. Kinetic study of the action of snake venom phospholipase A2 on human serum high density lipoprotein 3 // *J. Biol. Chem.* – 1976. – Vol. 251, № 7. – P. 1984–1990.
47. Ray S., Scott J. L., Tatulian S. A. Effects of lipid phase transition and membrane surface charge on the interfacial activation of phospholipase A2 // *Biochemistry.* – 2007. – Vol. 46. – P. 13089–13100. Doi: 10.1021/bi7015102.
48. Allosteric Effect of Amphiphile Binding to Phospholipase A(2) / B. Z. Yu, S. Bai, O. G. Berg, M. K. Jain // *Biochemistry.* – 2009. – Vol. 48. – P. 3219–3229. Doi: 10.1021/bi801245s.
49. Dua R., Wu S. K., Cho W. A. Structure-Function Study of Bovine Pancreatic Phospholipase A Using Polymerized Mixed Liposomes // *J. Biol. Chem.* – 1995. – Vol. 270. – P. 263–268. Doi: 10.1074/jbc.270.1.263.

50. Gelb M. H., Cho W., Wilton D. C. Interfacial binding of secreted phospholipases A2: more than electrostatics and a major role for tryptophan // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 1999. – Vol. 9, № 4. – P. 428–432. Doi: 10.1016/S0959-440X(99)80059-1.

REFERENCES

1. Tasoulis T., Isbister G. K. A Review and Database of Snake Venom Proteomes // *Toxins (Basel)*. 2017;9(9):290. Doi: 10.3390/toxins9090290.
2. Chen P. C., Huang M. N., Chang J. F., Liu C. C., Chen C. K., Hsieh C. H. Snake venom proteome and immuno-profiling of the hundred-pace viper, *Deinagkistrodon acutus*, in Taiwan // *Acta Trop.* 2019;(189):137–144. Doi: 10.1016/j.actatropica.2018.09.017.
3. Segura Á., Herrera M., Reta Mares F., Jaime C., Sánchez A., Vargas M., Villalta M., Gómez A., Gutiérrez J. M., León G. Proteomic, toxicological and immunogenic characterization of Mexican west-coast rattlesnake (*Crotalus basiliscus*) venom and its immunological relatedness with the venom of Central American rattlesnake (*Crotalus simus*) // *J. Proteom.* 2017;(158):62–72. Doi: 10.1016/j.jprot.2017.02.015.
4. Durban J., Sanz L., Trevisan-Silva D., Neri-Castro E., Alagón A., Calvete J.J. Integrated Venomics and Venom Gland Transcriptome Analysis of Juvenile and Adult Mexican Rattlesnakes *Crotalus simus*, *C. tzabcan*, and *C. culminatus* Revealed miRNA-modulated Ontogenetic Shifts // *J. Proteome Res.* 2017;(16):3370–3390. Doi: 10.1021/acs.jproteome.7b00414
5. Tsai I. H., Wang Y. M., Huang K. F. Structures of *Azeiomiops feae* venom phospholipases and cys-rich-secretory protein and implications for taxonomy and toxinology // *Toxicon*. 2016;(114):31–39. Doi: 10.1016/j.toxicon.2016.02.014.
6. Lomonte B., Diaz C., Chaves F., Fernandez U., J., Ruiz-Campos M., Salas M., Zavaleta A., Calvete J., Sasa M. Comparative characterization of Viperidae snake venoms from Perú reveals two compositional patterns of phospholipase A2 expression // *Toxicon: X*. 7. 2020;100044. Doi: 10.1016/j.toxcx.2020.100044.
7. Kovalchuk S. I., Ziganshin R. H., Starkov V. G., Tsetlin V. I., Utkin Y. N. Quantitative Proteomic Analysis of Venoms from Russian Vipers of Pelias Group: Phospholipases A2 are the Main Venom Components // *Toxins*. 2016; 8(4):105. Doi: 10.3390/toxins8040105.
8. Boldrini-França J., Corrêa-Netto C., Silva M. M. S., Rodrigues R. S., De La Torre P., Pérez A., Soares A. M., Zingali R. B., Nogueira R. A., Rodrigues V. M. Snake venomomics and antivenomics of *Crotalus durissus* subspecies from Brazil: Assessment of geographic variation and its implication on snakebite management // *J. Proteom.* 2010;(73):1758–1776. Doi: 10.1016/j.jprot.2010.06.001.
9. Gao J. F., Wang J., He Y., Qu Y. F., Lin L. H., Ma X. M., Ji X. Proteomic and biochemical analyses of short-tailed pit viper (*Gloydius brevicaudus*) venom: Age-related variation and composition–activity correlation // *J. Proteom.* 2014;(105):307–322. Doi: 10.1016/j.jprot.2014.01.019.
10. Schaloske R. H., Dennis E. A. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system // *Biochim. Biophys. Acta; // Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2006;1761(11):1246–1259. Doi: 10.1016/j.bbali.2006.07.011
11. Burke J. E., Dennis E. A. Phospholipase A2 structure/function, mechanism and signaling // *J. Lipid Res.* 2008;(50):S237–S242. Doi: 10.1194/jlr.R800033-JLR200
12. Verheij H. M., Westerman J., Sternby B., De Haas G. H. The complete primary structure of phospholipase A2 from human pancreas // *Biochim. Biophys. Acta*. 1983;747(1–2):93–99. Doi: 10.1016/0167-4838(83)90126-7.
13. Tan P. T. J., Khan M. A., Brusica V. Bioinformatics for venom and toxin sciences // *Brief. Bioinform.* 2003;(4):53–62. Doi: 10.1093/bib/4.1.53.
14. Murakami M., Taketomi Y., Sato H., Yamamoto K. Secreted phospholipase A2 revisited // *J. Biochem.* 2011; 150(3):233–255. Doi: 10.1093/jb/mvr088.
15. Dijkstra B. W., Drenth J., Kalk K. H., Vandermaelen P. J. Three-dimensional structure and disulfide bond connections in bovine pancreatic phospholipase A2 // *J. Mol. Biol.* 1978;124 (1):53–60. Doi: 10.1016/0022-2836(78)90146-8.
16. van den Bergh C. J., Slotboom A. J., Verheij H. M., de Haas G. H. The role of Asp-49 and other conserved amino acids in phospholipases A2 and their importance for enzymatic activity // *J. Cell Biochem.* 1989;39(4):379–390. Doi: 10.1002/jcb.240390404.
17. Fleer E. A., Verheij H. M., de Haas G. H. Modification of carboxylate groups in bovine pancreatic phospholipase A2. Identification of aspartate-49 as Ca²⁺-binding ligand // *Eur. J. Biochem.* 1981;113(2):283–288. Doi: 10.1111/j.1432-1033.1981.tb05064.x.
18. Harris J. B., Scott-Davey T. Secreted phospholipases A2 of snake venoms: effects on the peripheral neuromuscular system with comments on the role of phospholipases A2 in disorders of the CNS and their uses in industry // *Toxins (Basel)*. 2013;5(12):2533–2571. Doi: 10.3390/toxins5122533.
19. Chandra V., Kaur P., Srinivasan A., Singh T. P. Three-dimensional structure of a presynaptic neurotoxic phospholipase A2 from *Daboia russelli pulchella* at 2.4 Å resolution // *J. Mol. Biol.* 2000;(296):1117–1126. Doi: 10.1006/jmbi.2000.3537.
20. Chandra V., Kaur P., Jasti J., Betzel C., Singh T. P. Regulation of catalytic function by molecular association: structure of phospholipase A2 from *Daboia russelli pulchella* (DPLA2) at 1.9 Å resolution // *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 2001;(57):1793–1798. Doi: 10.1107/S0907444901014524
21. Perbandt M., Wilson J. C., Eschenburg S., Mancheva I., Aleksiev B., Genov N., Willingmann P., Weber W., Singh T. P., Betzel C. Crystal structure of vipoxin at 2.0 Å: an example of regulation of a toxic function generated by molecular evolution // *FEBS Lett.* 1997;(412):573–577. Doi: 10.1016/S0014-5793(97)00853-3.
22. Tang L., Zhou Y. C., Lin Z. J. Crystal structure of agkistrodotoxin, a phospholipase A2-type presynaptic neurotoxin from *Agkistrodon halys pallas* // *J. Mol. Biol.* 1998;(282):1–11. Doi: 10.1006/jmbi.1998.1987.
23. Gu L., Zhang H., Song S., Zhou Y., Lin Z. Structure of an acidic phospholipase A2 from the venom of *Deinagkistrodon acutus* // *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 2002;(58):104–110. Doi: 10.1107/s0907444901018170.
24. Xu S., Gu L., Jiang T., Zhou Y., Lin Z. Structures of cadmium-binding acidic phospholipase A2 from the venom of *Agkistrodon halys pallas* at 1.9 Å resolution // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003;(300):271–277. Doi: 10.1016/S0006-291X(02)02833-4.
25. Banumathi S., Rajashankar K. R., Notzel C., Aleksiev B., Singh T. P., Genov N., Betzel C. Structure of the neurotoxic complex vipoxin at 1.4 Å resolution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2003;(57):1552–1559. Doi: 10.1107/s0907444901013543.
26. Kini R. M., Chan Y. M. Accelerated evolution and molecular surface of venom phospholipase A2 enzymes // *J. Mol. Evol.* 1999;48(2):125–132. Doi: 10.1007/pl00006450.
27. Correa L. C., Marchi-Salvado D. P., Cintra A. C., Sampaio S. V., Soares A. M., Fontes M. R. Crystal structure of a myotoxic Asp49-phospholipase A(2) with low catalytic activity: Insights into Ca(2+)-independent catalytic mechanism // *Biochim Biophys Acta*. 2008;(1784):591–599. Doi: 10.1016/j.bbapap.2008.01.007.

28. Petrova S. D., Atanasov V. N., Balashev K. Vipoxin and its components: structure-function relationship // *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 2012;(87):117–153. Doi: 10.1016/B978-0-12-398312-1.00005-6.
29. Doley R., Kini R. M. Protein complexes in snake venom // *Cell Mol. Life Sci.* 2009;(66):2851–2871. Doi: 10.1007/s00018-009-0050-2.
30. Zouari-Kessentini R., Luis J., Karray A. Two purified and characterized phospholipases A2 from *Cerastes cerastes* venom, that inhibit cancerous cell adhesion and migration // *Toxicol.* 2009;(53):444–453. Doi: 10.1016/j.toxicol.2009.01.003.
31. Volwerk J. J., Pieterse W. A. de Haas G. H. Histidine at the active site of phospholipase A2. *Biochemistry.* 1974;(13):1446–1454. Doi: 10.1021/bi00704a020.
32. Verheij H. M., Volwerk J. J., Jansen M. G., Puyk W. C., Dijkstra B. W., Drenth J., Haas G. H. Methylation of Histidine-48 in Pancreatic Phospholipase A2: Role of Histidine and Calcium Ion in the Catalytic Mechanism // *Biochemistry.* 1980;19(4):743–750. Doi: 10.1021/bi00545a021.
33. Dijkstra B.W., Drenth J., Kalk K. H. Active site and catalytic mechanism of phospholipase A2 // *Nature.* 1981; 289(5798):604–606. Doi: 10.1038/289604a0.
34. Li Y., Tsai M. D. Phospholipase A2 engineering. The aspartate-histidine catalytic diad also plays an important structural role // *J. Am. Chem. Soc.* 1993;(115):8523–8526. Doi: 10.1021/ja00072a001.
35. Renetseder R., Dijkstra B. W., Huizinga K., Kalk K. H., Drenth J. Crystal structure of bovine pancreatic phospholipase A2 covalently inhibited by p-bromo-phenacyl-bromide // *J. Mol. Biol.* 1988;(200):181–188. Doi: 10.1016/0022-2836(88)90342-7.
36. Pan Y. H., Epstein T. M., Jain M. K., Bahnson B. J. Five coplanar anion binding sites on one face of phospholipase A2: relationship to interface binding // *Biochemistry.* 2001; 40(3):609–617. Doi: 10.1021/bi002514g.
37. Zhao H., Tang L., Wang X., Zhou Y., Lin Z. Structure of a snake venom phospholipase A2 modified by p-bromophenacyl-bromide // *Toxicol.* 1998;(36):875–886. Doi: 10.1016/S0041-0101(97)00169-4.
38. Yang C. C., King K. Chemical modification of the histidine residue in basic phospholipase A2 from the venom of *Naja nigricollis* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1980;(614):373–388. Doi: 10.1016/0005-2744(80)90227-2.
39. Toyama M. H., Soares A. M., Vieira C. A., Novello J. C., Oliveira B., Giglio J. R., Marangoni S. Amino Acid Sequence of Piratoxin-I, a Myotoxin from *Bothrops pirajai* Snake Venom, and Its Biological Activity After Alkylation with p-Bromophenacyl Bromide // *J. Protein Chem.* 1998;(17):713–718. Doi: 10.1007/BF02780974.
40. Janssen M. J., van de Wiel W. A. E. C., Beibor S. H. W., van Kampen M. D., Verheij H. M., Slotboom A. J., Egmond M. R. Catalytic role of the active site histidine of porcine pancreatic phospholipase A2 probed by the variants H48Q, H48N and H48K // *Protein Engineering.* 1999;12(6):497–503. Doi: 10.1093/protein/12.6.497.
41. Maraganore J. M., Merutka G., Cho W., Welches W., Kézdy F. J., Heinrikson R. L. A new class of phospholipases A2 with lysine on place of aspartate 49. Functional consequences for calcium and substrate binding // *J. Biol. Chem.* 1984;(259):13839–13843.
42. Mincheva I., Kleinschmidt T., Aleksiev B., Braunitze G. Sequence homology between phospholipase and its inhibitor in snake venom. The primary structure of phospholipase A2 of vipoxin from the venom of the Bulgarian viper (*Vipera ammodytes ammodytes*, Serpentes) // *Biol. Chem. Hoppe Seyler.* 1987;(368):343–352. Doi: 10.1515/bchm2.1984.365.2.885.
43. Krizaj I., Bieber A. L., Ritonja A., Gubensek F. The primary structure of ammodytin L, a myotoxic phospholipase A2 homologue from *Vipera ammodytes* venom // *Eur. J. Biochem.* 1991;202(3):1165–1168. Doi: 10.1111/j.1432-1033.1991.tb16485.x.
44. Scott D. L., White S. P., Otwinowski Z., Yuan W., Gelb M. H., Sigler P. B. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A2 // *Science.* 1990;(250):1541–1546. Doi: 10.1126/science.2274785.
45. Deems R. A., Eaton B. R., Dennis E. A. Kinetic analysis of phospholipase A2 activity toward mixed micelles and its implications for the study of lipolytic enzymes // *J. Biol. Chem.* 1975;250(23):9013–9020.
46. Pattnaik N. M., Kézdy F., Scanu A. Kinetic study of the action of snake venom phospholipase A2 on human serum high density lipoprotein 3 // *J. Biol. Chem.* 1976;251(7):1984–1990.
47. Ray S., Scott J. L., Tatulian S. A. Effects of lipid phase transition and membrane surface charge on the interfacial activation of phospholipase A2 // *Biochemistry.* 2007;(46):13089–13100. Doi: 10.1021/bi7015102.
48. Yu B. Z., Bai S., Berg O. G., Jain M. K. Allosteric Effect of Amphiphile Binding to Phospholipase A(2). *Biochemistry.* 2009;(48):3219–3229. Doi: 10.1021/bi801245s.
49. Dua R., Wu S. K., Cho W. A. Structure-Function Study of Bovine Pancreatic Phospholipase A Using Polymerized Mixed Liposomes // *J. Biol. Chem.* 1995;(270):263–268. Doi: 10.1074/jbc.270.1.263.
50. Gelb M. H., Cho W., Wilton D. C. Interfacial binding of secreted phospholipases A2: more than electrostatics and a major role for tryptophan // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1999; 9(4):428–432. Doi: 10.1016/S0959-440X(99)80059-1.

Информация об авторах

Галебская Людвиг Вячеславовна, доктор медицинских наук, профессор кафедры биологической химии, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова (Санкт-Петербург, Россия), ORCID: 0000-0002-6688-5257; **Васина Любовь Васильевна**, доктор медицинских наук, зав. кафедрой биологической химии, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова (Санкт-Петербург, Россия), ORCID: 0000-0002-2647-6336; **Галкин Михаил Александрович**, кандидат биологических наук, доцент кафедры биологической химии, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова (Санкт-Петербург, Россия), ORCID: 0000-0001-6527-5580; **Тарасова Юлия Викторовна**, кандидат биологических наук, доцент кафедры биологической химии, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова (Санкт-Петербург, Россия), ORCID: 0000-0002-3251-0481.

Information about authors

Galebskaya Lyudviga V., Dr. of Sci. (Med.), Professor of the Department of Biological Chemistry, Pavlov University (Saint Petersburg, Russia), ORCID: 0000-0002-6688-5257; **Vasina Lyubov V.**, Dr. of Sci. (Med.), Head of the Department of Biological Chemistry, Pavlov University (Saint Petersburg, Russia), ORCID: 0000-0002-2647-6336; **Galkin Mikhail A.**, Cand. of Sci. (Biol.), Assistant Professor of the Department of Biological Chemistry, Pavlov University (Saint Petersburg, Russia), ORCID: 0000-0001-6527-5580; **Tarasova Yuliya V.**, Cand. of Sci. (Biol.), Assistant Professor of the Department of Biological Chemistry, Pavlov University (Saint Petersburg, Russia), ORCID: 0000-0002-3251-0481.