



УДК 547.96 : 542.95

ПРИМЕНЕНИЕ N-КАРБОКСИАНГИДРИДОВ *o*-НИТРОФЕНИЛ-СУЛЬФЕНИЛАМИНОКИСЛОТ ДЛЯ ХИМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ*Мирошников А. И., Демьяшкин Е. Я., Куделин А. Б.,
Овчинников Ю. А.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

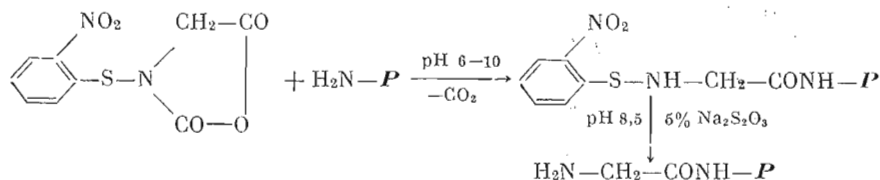
Предложен метод химической модификации белков N-карбоксиянгидами *o*-нитрофенилсульфениламино кислот. На примере нейротоксинов I и II из яда *Naja naja oxiana* показано, что с помощью этого метода, в зависимости от условий реакции, в белковую молекулу можно вводить определенное число аминокислотных остатков.

Простота получения и высокая реакционная способность N-карбоксиянгиридов α -аминокислот привели к широкому использованию этих реагентов как в синтетической пептидной химии, так и при химической модификации белков. Развитие техники пептидного синтеза на основе N-карбоксиянгиридов α -аминокислот способствовало получению ряда важных биологически активных соединений пептидно-белковой природы. Селективная реакция карбоксиянгиридов со свободными аминогруппами привлекательна и для химической модификации белков. Однако если для химического синтеза пептидов были найдены оптимальные условия введения только одного аминокислотного остатка (рН 10,2, эффективное перемешивание, контроль температуры) [1, 2], то при работе с белками эта реакция приводит к неконтролируемому созданию нескольких боковых полипептидных цепей с различным количеством аминокислот [3]. Возможность наращивания белковых цепей на определенное число аминокислотных остатков, существенно не изменяя параметров активной молекулы, позволяет решить ряд вопросов, связанных с изучением механизма действия, введением «репортерных» групп, а также атомов тяжелых металлов для рентгеноструктурных исследований.

С целью изучения возможности применения для химической модификации белков и пептидов N-карбоксиянгиридов α -аминокислот, неспособных к самопроизвольной полимеризации, мы использовали N-защищенные N-карбоксиянгириды аминокислот, содержащие N-алкильные или N-ацильные группы, которые могут быть удалены после реакции этих соединений с белками. N-карбоксиянгириды N-тримил- [4], N-бензил- и N-2,4-диметоксибензил- [5], N-тозиламино кислот [6] менее привлекательны, чем *o*-нитрофенилсульфенилпроизводные * [7, 8], так как Nps-группа может быть легко удалена в достаточно мягких условиях целым

* *o*-Нитрофенилсульфенил — Nps.

рядом реагентов [9—11]



где *P* — полипептидная цепь.

Использование карбоксиангидридов Nps-аминокислот, кроме того, позволяет контролировать степень модификации спектрофотометрическим определением числа присоединенных к белку Nps-аминокислот по образованию полосы поглощения в видимой области спектра при 384,5 нм. Это дает возможность с достаточно высокой точностью определять степень блокирования и деблокирования аминокрупп белка.

Возможности использования этого метода мы продемонстрировали на примере нейротоксинов I и II из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana*, строение которых было недавно установлено в нашей лаборатории [12, 13]. Эти типичные нейротоксины с курареподобным эффектом,

Таблица 1

Модификация нейротоксина I N-карбоксиангидридом Nps-глицина

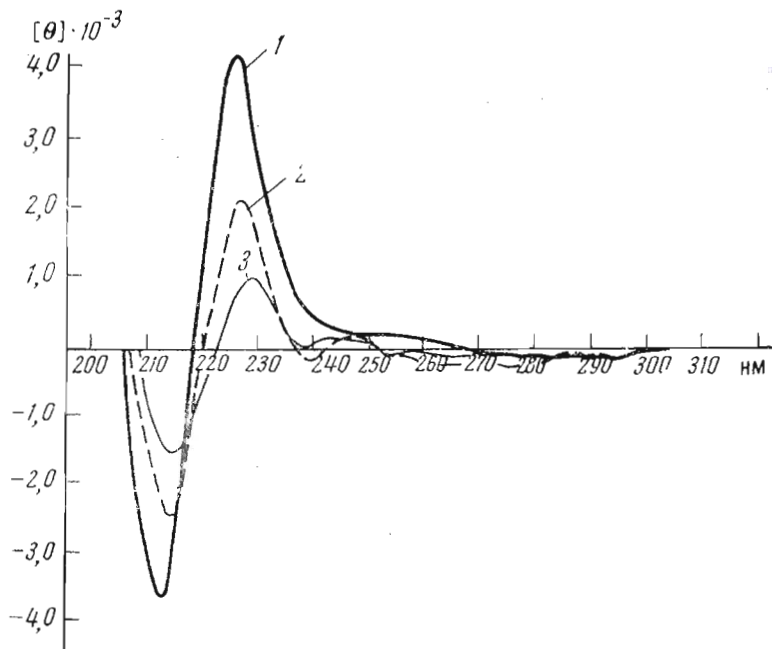
pH	ε _{384,5 нм}	Число остатков глицина, введенных в молекулу белка		N-концевая аминокислота
		спектрофотометрически	по аминокислотному анализу	
6,5	0	0	0 (4, 18)	Ile
6,5*	3 600	1	1 (5, 13)	Gly
7,3	3 500	1	1 (5, 20)	Ile
7,9	14 170	4	4 (8, 30)	Ile
8,2	21 300	6	6 (10, 20)	Ile
9,0	23 000	7	7 (11, 40)	Gly

* В присутствии 6M хлоргидрата гуанидина.

характерным для нейротоксинов яда кобр, содержат в одноцепочечной молекуле 73 и 61 аминокислотный остаток с 5 и 4 дисульфидными связями соответственно. Нейротоксин I имеет свободную α-аминогруппу (изолейцин) и шесть ε-аминогрупп остатков лизина. Для модификации этого белка в интервале pH от 6 до 10 был использован N-карбоксиангидрид Nps-глицина. Полученные данные (табл. 1) свидетельствуют об изменении доступности свободных аминокрупп в зависимости от pH.

В интервале pH от 6,8 до 7,5 модифицируется только одна ε-аминогруппа лизина, увеличение pH до 8,2 приводит к последующей модификации всех ε-аминогрупп, и только при pH 9 модифицируется α-аминогруппа белка. Это означает, что в широких пределах pH α-аминогруппа «маскирована» и не вступает в реакцию ацилирования. В денатурирующих условиях в присутствии 6M раствора хлоргидрата гуанидина при pH 6,5 удается селективно модифицировать только α-аминогруппу нейротоксина I.

Модификация нейротоксина II, содержащего 5 остатков лизина и N-концевую аминокислоту — лейцин, карбоксиангидридом Nps-глицина при pH 6,5 в 0,1 M натрий-сукцинатном буфере в присутствии 6 M хлоргидрата гуанидина приводит к замещению α-аминогруппы молекулы остатком Nps-глицина. Как и в случае нейротоксина I, повышение pH до 8 приводит к ацилированию всех ε-аминогрупп остатков лизина. При pH 9 молекула нейротоксина II разворачивается и все свободные аминокруппы



Кривые КД нейротоксина II и его аналогов (рН 7,2, 0,2 М натрий-боратный буфер; с 0,6). 1 — нейротоксин II и гексаглицилнейротоксин II, 2 — Nps-глицилнейротоксин II, 3 — гекса(Nps-глицил)-нейротоксин II

становятся доступными для модификации N-карбоксиянгидридом Nps-глицина (табл. 2).

Использование свойства селективного ацилирования N-замещенных N-карбоксиянгидридов α-аминокислот в денатурирующих условиях при рН, близких к нейтральным, позволяет не только блокировать N-концевую аминокислоту белка, но и осуществлять синтез удлиненных аналогов,

Таблица 2

Модификация нейротоксина II N-карбоксиянгидридом Nps-глицина

рН	ε _{384,5 нм}	Число остатков глицина, введенных в молекулу белка		N-концевая аминокислота
		спектрофотометрически	по аминокислотному анализу	
6,5	0	0	0 (4,18)	Leu
6,5*	3 600	1	1 (5,13)	Gly
7,3	3 600	1	1 (5,20)	Leu
7,9	14 170	4	4 (8,30)	Leu
8,2	17 500	5	5 (9,20)	Leu
9,0	21 300	6	6 (10,20)	Gly

* В присутствии 6M хлоридрата гуанидина.

так как Nps-группа легко отщепляется при рН 8,5 в 5%-ном растворе тиосульфата натрия. Удаление защитной группы, по данным спектров КД (рисунок), не приводит к изменению нативной конформации белка. Предварительные биологические испытания аналогов нейротоксинов I и II, удлиненных по α-аминогруппе на один остаток глицина, показывают, что оба соединения имеют 40% токсичности природной молекулы в обоих случаях.

Нейротоксины, модифицированные по всем свободным ϵ -аминогруппам лизинов, практически не обладали биологической активностью.

Недавно выполненная работа [14] по иммунохимической характеристике нейротоксина из *Naja naja siamensis* (подобного нашему нейротоксину I) и его аналога, полученного обработкой N-карбоксиангидридом DL-аланина, показывает, что неконтролируемое введение большого числа остатков DL-аланина (~70 остатков в 3—4 полипептидных цепях) резко снижает его иммунохимическую реакцию с антителами (10—20% активности природной молекулы) и приводит к полной потере токсичности. С другой стороны, замена остатков лизина на остатки гомоаргинина, проведенная Карлссоном и сотр. [15] гуанидированием того же токсина из *Naja naja siamensis* O-метилизомочевинной, практически не сказывается ни на токсичности, ни на иммунохимической реакции. Подобные модификации, проведенные нами на нейротоксине I из яда *Naja naja oxiana*, дают аналогичные результаты.

По данным КД, конформационные состояния всех изученных аналогов нейротоксинов не отличаются от конформационных состояний нативных образцов.

Таким образом, с помощью метода модификации белка показано, что токсичность нейротоксинов I и II определяется в большой степени наличием свободных аминогрупп остатков лизина и концевой α -аминогруппы.

Экспериментальная часть

Нейротоксины I и II выделили из яда кобры *Naja naja oxiana* по методике, описанной Туракуловым и сотр. [16]. N-карбоксиангидрид Nps-глицина синтезировали по методу Крихельдэрфа [6]. Для спектрофотометрического сравнения модифицированного токсина в качестве стандарта использовали амид Nps-глицина. Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре «Specord UV-Vis» (ГДР). Аминокислотный анализ проводили на автоматическом аминокислотном анализаторе Bio Cal BC 201 (Швеция, ЛКВ). Образцы гидролизovali 1 мл 6M HCl 24 ч при 105°. Химическую модификацию белка при pH 6,5 проводили в 0,2 M натрий-сукцинатном буфере, при 7,2 и выше — в 0,2 M натрий-боратном буфере. К раствору 1,6 мг (0,2 мкмоль) токсина в 1 мл 0,2 M натрий-боратного буфера (pH от 7,2 до 9) добавляли 20-кратный избыток N-карбоксиангидрида Nps-глицина в расчете на одну свободную аминогруппу. Модификацию проводили при устойчивом значении pH (автотитратор ТТТ-2, Radiometer) (Дания) при комнатной температуре. Через 2 ч реакционную смесь наносили на колонку (40 × 2,5 см) с сефадексом G-15, уравновешенную аммоний-ацетатным буфером при pH-модификации. Дополнительную очистку, а также подтверждение гомогенности проводили на колонке (20 × 0,5 см) с биорексом-70, уравновешенной 1·10⁻³ M аммоний-ацетатным буфером при pH 7,0. Элюирование проводили аммоний-ацетатным буфером с градиентом ионной силы от 1·10⁻³ до 0,2 M. Отщепление Nps-группы проводили в 0,2 M натрий-боратном буфере при pH 8,5 5%-ным раствором Na₂S₂O₃. Реакционную смесь перемешивали 2 ч, при комнатной температуре, дальнейшую очистку проводили аналогично очистке Nps-производному нейротоксина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hirschmann R., Schwam H., Strach R. G., Schoenewaldt E. F., Barmeyer H., Miller S. M., Conn J. B., Garsky V., Veber D. E., Denkwalter R. G. (1971) J. Amer. Chem. Soc., 93, 2746—2754.
2. Pfaeder P., Kuhnle E., Krahl B., Backmaunson A., Grauck G., Blecher H. (1973) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 354, 267—285.
3. Sela M., Arnorn R. (1972) in Methods in Enzymol., 25, pp. 553—558, Acad. Press, N. Y.

4. Block H., Cox M. E. (1963) in Peptides 1962, pp. 83—87, Pergamon Press, Oxford.
5. Halstrom H., Kovacs (1973) in Peptides 1972, pp. 173—179, North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
6. Zaoral M., Rudinger J. (1961) Collect. Czech. Chem. Commun., 26, 2316—2321.
7. Kricheldorf H. R. (1973) Angew. Chem., 85, 86—87.
8. Halstrom J., Brunfeld K., Kovacs K. (1974) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 355, 82—85.
9. Kessler W., Iselin B. (1966) Helv. chim. acta, 49, 1330—1337.
10. Ekstrom B., Sjöberg B. (1965) Acta chem. scand., 19, 1245—1249.
11. Brandenburg D. (1966) Tetrahedron Lett., 6201—6204.
12. Grishin E. V., Sukhikh A. P., Lukyanchuk N. N., Slobodyan L. N., Lipkin V. M., Ovchinnikov Yu. A., Sorokin V. M. (1973) FEBS Lett., 36, 77—78.
13. Grishin E. V., Sukhikh A. P., Slobodyan L. N., Ovchinnikov Yu. A., Sorokin V. M. (1974) FEBS Lett., 45, 118—121.
14. Aharonov A., Gurari D., Fuchs S. (1974) Europ. J. Biochem., 45, 297—303.
15. Karlsson E., Eaker D., Ponterius G. (1972) Biochim. et. biophys. acta, 257, 235—248.
16. Туракулов Я. X., Сахибов Д. Н., Сорокин В. М., Юкельсон Л. Я. (1969) Биохимия, 34, 1119—1122.

Поступила в редакцию
8.VII.1975

THE USE OF N-CARBOXYANHYDRIDES OF *o*-NITROPHENYLSULPHENYL AMINO ACIDS FOR CHEMICAL MODIFICATION OF PROTEINS

MIROSHNIKOV A. I., DEMJASHKIN E. Ya., KUDELIN A. B.,
OVCHINNIKOV Yu. A.

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

A method for chemical modification of proteins was developed which involves the use of N-carboxyanhydrides of *o*-nitrophenylsulphenyl (Nps) amino acids. It allows to introduce a different number of amino acid residues into protein molecule by changing the reaction conditions, which was exemplified with the neurotoxins I and II from *Naja naja oxiana* venom.