



УДК 577.112.4

МОДИФИКАЦИЯ И ДЕБЛОКИРОВАНИЕ АМИНОГРУПП
ПАРВАЛЬБУМИНА III ЩУКИ

Медведкин В. И., Митин Ю. В.

Институт белка Академии наук СССР, Пушкино Московской обл.

Парвальбумин III щуки блокировали по ϵ -аминогруппам остатков лизина с помощью различных защитных групп с целью оценить их пригодность для полусинтетических экспериментов. Требования, предъявляющиеся к защитной группе: мягкие условия модификации белка, полнота блокирования ϵ -аминогрупп белка, стабильность защитной группы при расщеплении белка на фрагменты, деблокирование ϵ -аминогрупп в условиях, исключающих необратимую денатурацию белка. Из изученных защитных групп перечисленным требованиям отвечают Вос- и Acim-группы. После модификации по ϵ -аминогруппам и последующего деблокирования белок сохраняет способность связывать кальций. Ацетимидированный парвальбумин не отличается по способности связывать кальций от немодифицированного белка.

Полусинтез — сравнительно недавно разработанный метод химии пептидов и белков, являющийся хорошей альтернативой полному химическому синтезу белков и их фрагментов [1, 2]. Самая распространенная схема полусинтетических экспериментов включает в себя полную модификацию всех аминогрупп белка, расщепление его на фрагменты, присоединение к высвободившейся в результате расщепления α -аминогруппе белкового фрагмента производного аминокислоты или пептида. Такое сочетание методов пептидной и белковой химии позволяет удлинять белковые фрагменты с N-конца на 1—10 аминокислотных остатков и тем самым получать новые объекты для дальнейших исследований.

Успешное осуществление полусинтетических экспериментов во многом определяется выбором защитной группы для полной модификации ϵ -аминогрупп белка. Защитная группа должна отвечать следующим требованиям: мягкие условия модификации, полнота блокирования ϵ -аминогрупп белка, стабильность защитной группы при расщеплении белка на фрагменты, деблокирование ϵ -аминогрупп в условиях, исключающих необратимую денатурацию исследуемого белка.

В настоящей работе приведены результаты исследований по модификации ϵ -аминогрупп остатков лизина парвальбумина III щуки различными реагентами с целью оценить возможность использования вводимых с их помощью разных защитных групп в полусинтетических экспериментах.

Парвальбумин III щуки — небольшой кальцийсвязывающий белок, состоящий из 108 аминокислотных остатков [3, 4]. Молекула белка не имеет остатков цистеина, триптофана, тирозина и содержит два удобных для селективного расщепления остатка, Met³⁸ и Arg⁷⁵, и 18 остатков лизина. N-Конец белка ацетилирован.

Парвальбумин III щуки модифицировали по ϵ -аминогруппам остатков Lys, вводя *n*-нитробензилоксикарбонильную, *o*-хлорбензилоксикарбонильную, α, α -диметил-3,5-диметоксикарбонильную и *трет*-бутилоксикарбонильную группы с помощью соответствующих алкилоксикарбонилсульфонидов [5], а 2-метилсульфонилэтилоксикарбонильную группу с помощью N-оксисулфинимидного производного [6]. Ацетимидильную груп-

Сокращения: DMF — N,N-диметилформамид, TFA — трифторуксусная кислота, Вос — *трет*-бутилоксикарбонил-, Acim — ацетимидил-, Z(NO₂) — *n*-нитробензилоксикарбонил-, Z(Cl) — *o*-хлорбензилоксикарбонил-, Ddz — α, α -диметил-3,5-диметоксикарбонил-, Nps — *o*-нитрофенилсульфенил-, Msc — 2-метилсульфонилэтилоксикарбонил-.

Модификация и деблокирование парвальбумина III щуки

Защитная группа	Полнота модификации	Полнота деблокирования	Условия деблокирования
Z(NO ₂)-	+	-	Безводный HF, 1 ч H ₂ /Pd, 10 ч
Z(Cl)-	+	-	Безводный HF, 1 ч H ₂ /Pd, 10 ч
Ddz-	-	+	TFA, 40 мин
Woc-	+	+	TFA, 40 мин
Msc-	-	-	а) DMF - метанол - 4 М NaOH, 7 : 2,5 : 0,5; 10 мин б) Метанол - 0,05 М NH ₄ HCO ₃ - 4 М NaOH, 1 : 1 : 0,5; рН 11,5; 10 ч
Acim-	+	+	1 М метилами, рН ≥ 12; 72 ч
Nps-	-	+	TFA, 40 мин

пу вводили в белок по методикам [7, 8], а *o*-литрофенилсульфенильную — с помощью Nps-хлорида (см. «Экспериментальную часть»).

Полученные результаты приведены в таблице. Для определения кальцийсвязывающей способности белка мы выбрали метод собственной флуоресценции остатков фенилаланина [9, 10]. В экспериментах по блокированию и деблокированию ε-аминогрупп парвальбумина принято, что белок связывает кальций, если константа связывания кальция белком имеет величину порядка 10⁶ М⁻¹, т. е. она соизмерима с константой связывания кальция интактного парвальбумина [10]. Прежде чем проводить эксперименты по обратимой модификации ε-аминогрупп парвальбумина, мы изучили стабильность белка в условиях, при которых осуществляют модификацию и деблокирование. Оказалось, что парвальбумин III щуки устойчив к воздействию высоких концентраций органических растворителей (DMF, диоксан, метанол, ацетон) и не выпадает в осадок в 50% растворах указанных растворителей (рН 7–8). Белок обратимо денатурирует при рН < 4 и рН > 11 [10]. Электрофорез в 10% полиакриламидном геле (ПААГ) при рН 8,8 не выявляет различий между белком, выдержанным 3 сут при рН 12 (1 М метиламин-HCl), и исходным парвальбумином. Инкубация белка в течение нескольких часов в безводных TFA и особенно HF приводит к его частичному разрушению (рис. 1), что было подтверждено данными электрофореза в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия (данные не приводятся).

Полноту блокирования аминогрупп определяли обработкой 0,2–0,5 мг модифицированного белка дансилхлоридом и анализом гидролизата модифицированного белка на полное отсутствие ε-дансиллизина с помощью тонкослойной хроматографии. Метод позволяет обнаружить < 0,01% свободных аминогрупп. Достаточным критерием полноты деблокирования белка в полусинтетических исследованиях является полное восстановление физико-химических свойств белка после деблокирования и очистки. В настоящей работе считается, что белок деблокирован, если его нельзя отличить от исходного белка по способности связывать ионы кальция, а также по данным ионообменной хроматографии и гель-электрофореза.

От Ddz- и Nps-защитных групп мы отказались, поскольку не удалось подобрать условия для полной модификации ими ε-аминогрупп белка. Защитные Z(NO₂)- и Z(Cl)-группы требуют для деблокирования длительного времени (гидрирование над палладием) или очень жестких условий (обработка безводным HF). Поэтому использование этих групп, на наш взгляд, нецелесообразно.

Эксперименты по модификации белка Woc-азидом и удалению Woc-групп с белка оказались более успешными. Модификация белка Woc-азидом протекает полностью. Деблокирование Woc₁₈-парвальбумина осуществляется за 30–60 мин (0° С) в безводной TFA. Дальнейшая инкубация белка в TFA приводит к появлению продуктов расщепления полипептидной цепи, о чем свидетельствуют результаты N-концевого анализа и электрофореза в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия (данные не приводятся). При меньшем времени деблокирования Woc-группа удаляется с белка не полностью (рис. 2). Woc₁₈-парвальбумин не связы-

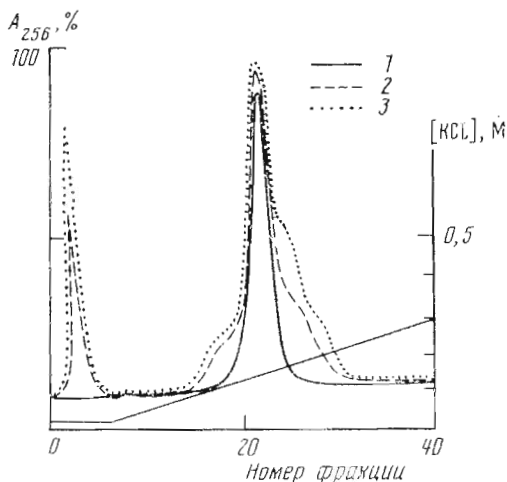


Рис. 1

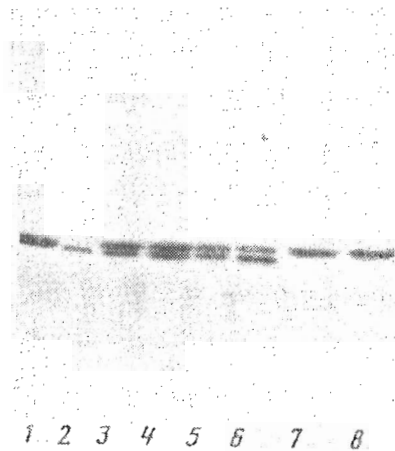


Рис. 2

Рис. 1. Ионобменная хроматография на DEAE-сефадексе А-25 (колонка 1×7 см) в линейном градиенте концентрации КСl в 0,015 трис-НСl (рН 7,3) парвальбумина III щуки (1), после обработки безводной ТГА парвальбумина II щуки (2) и его Вос-модифицированного по ε-аминогруппам производного (3)

Рис. 2. Электрофорез продуктов деблокирования Вос₁₈-парвальбумина в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия: исходный белок (1), Вос₁₈-парвальбумин (2), продукты деблокирования через 1, 5, 10, 15, 30 и 60 мин (3-8)

вает кальций. После деблокирования ε-аминогрупп кальцийсвязывающая способность белка восстанавливается ($K > 10^8 \text{ M}^{-1}$).

Поскольку Вос-группа неустойчива в условиях расщепления белка бромцианом по остатку Met³⁸ в 70% муравьиной кислоте, мы провели эксперименты по оценке пригодности для полусинтетических экспериментов щелочлабильных защитных Msc- и Acim-групп. Обе защитные группы используются в полусинтетических экспериментах [6, 8].

Ни в одном из экспериментов с использованием Msc-группы нам не удалось полностью модифицировать все аминокислотные группы белка (определение ε-аминогрупп лизина проводили дансильрованием при рН 7,5–8,0). Кроме того, эксперименты с белком, меченным [¹⁴C]Msc-группой, показали, что ее невозможно удалить полностью в рекомендованных ранее условиях (DMF — метанол — NaOH, 0,7 : 0,25 : 0,05 [6]). Попытка деблокировать модельное соединение Lys(Msc) в условиях работы [6] также была безуспешной. Заметная скорость снятия Msc-группы с Lys(Msc) достигается в водных растворах при рН ≥ 8,5, через 3 ч инкубации при рН 11,5 наблюдается полное деблокирование этого соединения ($T_{1/2} \approx 25 \text{ мин}$) (эксперимент не приведен). К сожалению, и в этих условиях добиться полного снятия Msc-группы с белка не удается.

Ацетимидирование является уникальным способом блокирования аминокислотных групп белка, поскольку положительный заряд на ацетимидированных остатках лизина сохраняется и поэтому в ряде случаев функциональная активность ацетимидированных белков полностью сохраняется [2]. При осуществлении полусинтетических экспериментов ацетимидильные группы чаще всего не удаляют и изучают физико-химические характеристики Acim-производных фрагментов белков [1, 2]. Вместе с тем, если такая необходимость все же возникает, Acim-группу можно снять 3,5 М метиламином или концентрированным NH₄OH с доведением рН до 11–12 с помощью соляной или уксусной кислоты [8, 11].

Модификацию парвальбумина III щуки метилацетимидатом проводили первоначально по методике [7]. При этом электрофорез в ПААГ при рН 8,8 показал наличие наряду с основным продуктом до 20% примесей, что сильно осложняло выделение Acim₁₈-парвальбумина (эксперимент не приведен). Валлэс и Харрис [8] показали, что образование побочных продуктов при ацетимидировании белков происходит в основном за-за

резкого снижения рН реакционной среды в момент добавления гидрохлорида метилацетимида к раствору белка и рекомендовали модифицировать белки метилацетимидом в 0,1 М натрий-боратном буфере при рН 10,5 в течение 40 мин, избегая даже непродолжительного понижения рН. Ацетимидирование парвальбумина III щуки по методике [8] дает хорошие результаты, количество побочных продуктов резко снижается.

Asi_m-парвальбумина III щуки полностью сохраняет способность связывать кальций ($K > 10^9 \text{ M}^{-1}$). Следовательно, при проведении полусинтетических экспериментов не обязательно удалять защитные группы ε-белка. Тем не менее мы провели эксперименты по снятию Asi_m-группы ε-белка 1 М метиламином при различных значениях рН. Полноту деблокирования контролировали с помощью гель-электрофореза, рН 8,8. Деблокирование проводили в течение 72 ч при 4°С. При рН 8—9 белок устойчив, а при рН 10—11 наблюдается частичное снятие защитных групп. Практически полного деблокирования ε-аминогрупп парвальбумина удастся добиться при рН ≥ 12 .

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали сефадекс G-25, G-75, A-25 DEAE, C-25SP, а также DEAE-сефацел A-25 (Pharmacia, Швеция), [¹⁴C]фосген с уд. акт. 59 мкМ/ммоль (Amersham, Англия). Остальные реагенты отечественного производства.

Все органические растворители и жидкие органические реагенты использовали свежеперегнанными.

Буферные растворы готовили из соединений квалификации х.ч. и перед использованием фильтровали через мембранные фильтры Siproг № 6 (Чехословакия).

Алкилоксикарбонилэфиры получали по методике [5]. 2-Метилглютапол окисляли до 2-метилсульфонилэтанола и получали Msc-ONSu согласно [12]. Lys(Msc) синтезировали как описано в [12], а гидрохлорид метилацетимида — как в [7].

Выделение и очистку парвальбумина III из белых мышц щуки и аминокислотный анализ проводили по описанным методикам [13, 14]. Константы связывания кальция определяли методом феноламинной флуоресценции [10]. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически, принимая для парвальбумина $\epsilon_{259} = 1810 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Анализ N-концевых аминогрупп и полноту модификации ε-аминогрупп остатков лизина проводили с помощью дансилхлорида [15].

Электрофорез в градиентном полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия проводили по методу [16] с использованием реагентов производства Bio-Rad (США) (А); в 10% ПААГ при рН 8,8 — с использованием буферных систем согласно [16], за исключением того, что ни в электродный раствор, ни в буферы концентрирующего и разделяющего геля додецилсульфат натрия не добавляли (Б).

Титрование до заданного значения рН осуществляли на автотитраторе ТТТ-60 (Radiometer, Дания). Радиоактивность образцов определяли в диоксидном сцинтиляционном счетчике LC-100 (Beckman, США).

Модификация ε-аминогрупп парвальбумина алкилоксикарбонилэфирами *. 60 мг парвальбумина III щуки (5 мкмоль белка, 90 мкмоль аминогрупп) растворяли в 7 мл 50% раствора пиридина в воде. Добавляли 0,1 мл 0,1 М EGTA, 0,1 мл триэтиламина и 100 мг алкилоксикарбонилэфира. После перемешивания в течение 24 ч при 20°С реакционную смесь наносили на колонку (2,5×100 см) с сефадексом G-75, уравновешенным 0,05 М NH₄HCO₃, рН 8,0, и элюировали тем же буфером. Модифицированный белок выходил сразу же после свободного объема колонки. После лиофилизации получали 45—50 мг модифицированного белка.

Модификация ε-аминогрупп парвальбумина Nps-хлоридом. 48 мг парвальбумина III щуки (4 мкмоль белка, 72 мкмоль аминогрупп) растворяли в 5 мл смеси 0,15 М K₂CO₃ — ацетонитрил (1:1). Добавляли 0,1 мл 0,1 М EGTA и 100 мг Nps-Cl. После перемешивания в течение 12 ч полученную зеленовато-желтую суспензию центрифугировали при 7000g. Сульфатант наносили на колонку с сефадексом G-75 и хроматографировали, как описано выше. Получили 42 мг частично Nps-защитенного парвальбумина III щуки ярко-желтого цвета. Повторная обработка

* Методика является модификацией методики [5].

Nps-хлоридом по описанной методике не приводила к полной модификации ϵ -аминогрупп белка.

Деблокирование Z(NO₂)- и Z(Cl)-парвальбумина. а) Деблокирование безводным фтористым водородом. 10 мг модифицированного белка деблокировали в течение 30, 60 и 120 мин безводным фтористым водородом в присутствии 1% тиоанизола при 0° С. Фтористый водород упаривали, белок растворяли в 5 мл смеси 1 М NH₄HCO₃ — диоксан (1:1) и обессоливали на колонке (1,5×30 см) с сефадексом G-25 в 0,05 М NH₄HCO₃. После лиофилизации получали 3—5 мг белка. Электрофорез в ПААГ (условия А) показал, что полученный белок содержал до 20% продуктов расщепления пептидных связей, что подтвердилось также данными N-концевого анализа.

б) Гидрирование Z(NO₂)-парвальбумина и Z(Cl)-парвальбумина. 10 мг модифицированного белка гидрировали над палладием в 10 мл 0,05 М NH₄HCO₃, рН 8,0, в течение 10 ч. Полноту деблокирования ϵ -аминогрупп контролировали электрофоретически (условия Б). За 10 ч полного деблокирования не происходит.

Деблокирование Vos₁₅-парвальбумина. 10 мг модифицированного белка обрабатывали 0,5 мл безводной TFA при 0° С в течение 40 мин. Затем трифторуксусную кислоту упаривали в вакууме, реакционную смесь растворяли в 50 мл 0,05 М NH₄HCO₃, рН 8,0, и лиофилизовали. Деблокированный белок содержит примеси (электрофорез, условия Б), которые отделяли ионообменной хроматографией на колонке (1×7 см) с DEAE-сефадексом А-25, уравновешенным 0,015 М трис-HCl, рН 7,3. Белок элюировали с колонки в линейном градиенте концентрации 0—0,3 М KCl (рис. 1). После обессоливания основной фракции и лиофилизации получили 5 мг деблокированного парвальбумина III щуки, гомогенного по гель-электрофорезу (условия А, Б). Деблокирование и очистка Dd₂ и Nps₂-парвальбумина по приведенной методике дает деблокированный парвальбумин с такими же выходами.

Радиоактивный аналог 2-метилсульфонилэтилоксикарбонилсукцинимидата ([¹⁴C]Msc-ONSu) получали по методике, аналогичной [12]. 200 мг (2 ммоль) 2-метилсульфонилэтанола растворяли в 250 мкл тетрагидрофурана, добавляли в ампулу, содержащую 500 мкКи (59 мКи/ммоль) [¹⁴C]фосгена (замороженного в жидком азоте) и 200 мкл охлажденного до -10° С нерадиоактивного фосгена. После герметизации ампулу встряхивали 2 ч при 20° С. Затем содержимое ампулы упаривали досуха, трижды упаривали с 1 мл ацетонитрила, добавляли 230 мг (2 ммоль) N-оксисукцинимидата и триэтиламин до рН 8—9. Через 30 мин кристаллы гидрохлорида триэтиламина отделяли фильтрованием, раствор упаривали досуха, остаток растворяли в 1 мл DMF и использовали для модификации белка. Полученный по такой методике [¹⁴C]Msc-ONSu имеет удельную активность 200—230 мкКи/ммоль.

Модификация ϵ -аминогрупп парвальбумина [¹⁴C]Msc-ONSu. 120 мг парвальбумина III щуки (10 мкмоль белка, 180 мкмоль аминогрупп) растворяли в смеси 20 мл H₂O, 15 мл DMF и 0,5 мл триэтиламина, добавляли 0,2 мл 0,1 М EGTA и 2 ммоль [¹⁴C]Msc-ONSu в 1 мл DMF. Реакционную смесь перемешивали при 20° С в течение 2 ч. Полнота модификации не достигается. Добиться полной модификации аминогрупп белка не удается и последующей двукратной обработкой нерадиоактивным Msc-ONSu по приведенной методике. Очистку белка проводили на колонке (4,5×50 см) с сефадексом G-75 в 0,05 М NH₄HCO₃, рН 8,0. После лиофилизации белковой фракции получали 110 мг Msc_n-парвальбумина, имеющего радиоактивность 2800 имп/мин на 1 мг белка.

Деблокирование Msc-парвальбумина. а) Контрольный эксперимент. 10 мг Msc_n-белка (28 000 имп/мин) суспендировали в смеси 0,75 мл DMF, 0,25 мл метанола и 50 мкл воды. Добавляли 100 мкл уксусной кислоты и центрифугировали. Раствор над осадком не радиоактивен. Осадок растворяли в 1 мл 6 М мочевины и хроматографировали на колонке (1,5×30 см) с сефадексом G-25, уравновешенным 0,05 М NH₄HCO₃, рН 8,0. Собирали фракции по 1 мл, смешивали с 20 мл диоксанового

сцинтиллятора и измеряли уровень радиоактивности. Вся радиоактивность сосредоточена в пике белка (28 000 имп/мин), что указывает на отсутствие неспецифически сорбированного радиоактивного материала в исследуемом препарате белка.

б) *Деблокирование в смеси DMF — метанол — 4 М NaOH.* 10 мг Msc,-белка суспендировали в смеси 0,75 мл DMF и 0,25 мл метанола, добавляли 50 мкл 4 М NaOH (условное значение рН водно-органической смеси 11,5) и энергично перемешивали 15 с. Добавляли 100 мкл уксусной кислоты и центрифугировали. Суммарная радиоактивность раствора над осадком 2500—3000 имп/мин. Раствор хроматографировали как описано в контрольном эксперименте. Радиоактивность сосредоточена в низкомолекулярной фракции, белка в растворе нет.

Осадок белка растворяли в 1 мл 6 М мочевины, добавляли 50 мкл 4 М NaOH и перемешивали 10 мин. Хроматографировали как описано в контрольном эксперименте. Профиль радиоактивности фракций полностью совпадает с профилем элюции белка. Суммарная радиоактивность уменьшилась на 2500—3000 имп/мин (деблокирование на 10%).

в) *Деблокирование в смеси метанол — 0,05 М NH₄HCO₃ — 4 М NaOH.* 10 мг Msc,-белка растворили в 0,5 мл 0,05 М NH₄HCO₃, добавляли 0,5 мл метанола и 100 мкл 4 М NaOH (рН ~ 11,5). Через 10 ч белок обрабатывали и хроматографировали, как описано в контрольном эксперименте. Суммарная радиоактивность уменьшилась на 6000—7000 имп/мин (деблокирование на 30%).

ЛИТЕРАТУРА

1. Semisynthetic peptides and proteins/Eds Offord R. E., Di Bello C. L. N. Y.: Acad. Press. 1978. 399 p.
2. Offord R. E. Semisynthetic proteins. Chichester — N. Y.: John Wiley and Sons, 1980. 234 p.
3. Franken F., Joassin L., Gerday Ch. FEBS Lett., 1973, v. 35, № 1, p. 145—147.
4. Gerday Ch. Eur. J. Biochem., 1976, v. 70, № 1, p. 305—318.
5. Ledden D. J., Nix P. T., Warne P. K. Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 578, № 2, p. 401—412.
6. Boon P. J., Tesser G. I. Int. J. Peptide and Protein Res., 1985, v. 25, № 4, p. 510—516.
7. Hunter M. J., Ludwig M. L. Meth. Enzymol., 1972, v. 27, p. 585—596.
8. Wallace C. J., Harris D. E. Biochem. J., 1984, v. 217, № 3, p. 589—594.
9. Burstein E. A., Permyakov E. A., Emelyanenko V. I., Bushueva T. L., Pechère J. F. Biochim. et biophys. acta, 1975, v. 400, № 1, p. 1—16.
10. Permyakov E. A., Medvedkin V. N., Kalinichenko I. P., Burstein E. A. Arch. Biochem. and Biophys., 1983, v. 227, № 1, p. 9—20.
11. Du Bois G. C., Robinson E. A., Innman J. K., Perham R. N., Appella E. Biochem. J., 1981, v. 199, № 2, p. 335—340.
12. Tesser G. I., Bolvert-Geer S. Int. J. Peptide and Protein Res., 1975, v. 7, № 4, p. 295—305.
13. Bhushana Rao K. S. P., Gerday Ch. Compar. Biochem. and Physiol., 1973, v. 44B, № 5, p. 931—937.
14. Bhushana Rao K. S. P., Gerday Ch. Compar. Biochem. and Physiol., 1973, v. 44B, № 5, p. 1113—1125.
15. Gray W. R. Meth. Enzymol., 1972, v. 25, p. 121—138.
16. Laemmli U. K. Nature, 1970, v. 227, № 5259, p. 680—685.

Поступила в редакцию
3.IV.1986

MODIFICATION AND DEPROTECTION OF AMINO GROUPS OF THE PIKE PARVALBUMIN III

MEDVEDKIN V. N., MITIN Yu. V.

*Institute of Protein Research, Academy of Sciences of the USSR,
Pushchino, Moscow Region*

Parvalbumin III of pike (pI 5.0) was modified by various amino-protecting groups to investigate their usefulness in semisynthetic experiments. Protecting groups are to meet the following criteria: mild conditions of the protein modification, complete modification of ε-amino groups, deprotection of the amino groups should proceed under conditions precluding irreversible denaturation of the parvalbumin. The Boc- and Acim-groups were found suitable for these purposes. After the parvalbumin modification with these protecting groups followed by deprotection and purification, Ca²⁺-binding properties of parvalbumin are fully recovered. The Acim-modified parvalbumin binds Ca²⁺ ions in the same extent as the native protein.