



УДК 577.112

ПОЛУЧЕНИЕ АНАЛОГА ФРАГМЕНТА 74—108
ПАРВАЛЬБУМИНА III ЩУКИ, СОДЕРЖАЩЕГО ОСТАТОК
АЛАНИНА В ПОЛОЖЕНИИ 74, И ЕГО АЦЕТИМИДИРОВАННОГО
ПРОИЗВОДНОГО

*Медведкин В. Н., Митин Ю. В., Пермяков Е. А.**

*Институт белка Академии наук СССР, Пушкино Московской обл.;
*Институт биологической физики Академии наук СССР, Пушкино
Московской обл.*

Взаимодействием водорастворимого 2-нитро-4-сульфофенилового эфира Вос-аланина с ϵ -Вос-фрагментом 75—108 парвальбумина III щуки получен Вос- Ala^{74} , ϵ -Вос-фрагмент 74—108 парвальбумина. После деблокирования и очистки Ala^{74} -фрагмент 74—108 связывает ионы кальция с константой $500 \pm 50 \text{ M}^{-1}$, что втрое меньше, чем константа связывания ионов кальция Arg^{74} -фрагментом 74—108. Ацетимидирование Ala^{74} -фрагмента 74—108 приводит к полной утрате способности связывать ионы кальция.

Ранее мы опубликовали результаты экспериментов по изучению влияния остатка Arg^{74} на формирование структуры С-концевого домена парвальбумина III щуки (EF-домена) [1]. Эффективная константа связывания кальция полусинтетическим Arg^{74} -фрагментом 74—108 составила $1670 \pm 50 \text{ M}^{-1}$, что почти на порядок выше константы связывания кальция фрагментом 75—108 парвальбумина.

Изменение константы связывания кальция в результате присоединения к N-концу фрагмента 75—108 остатка аргинина можно объяснить взаимодействием положительно заряженной гуанидиновой группировки остатка Arg^{74} с карбоксильной группой остатка Glu^{80} , подобно тому как это происходит в интактном парвальбумине карпа [2], или с карбоксильной группой остатка Asp^{78} .

В качестве альтернативного объяснения можно предположить, что сам факт увеличения длины EF-домена на один аминокислотный остаток независимо от природы этого остатка способен привести к наблюдаемому изменению свойств EF-домена. Выяснить, какое из этих объяснений справедливо, можно, используя полусинтетические методы пептидного синтеза.

Настоящая работа посвящена получению полусинтетического фрагмента 74—108 парвальбумина, содержащего вместо остатка Arg^{74} остаток Ala^{74} , и определению константы связывания кальция этим фрагментом.

Второй задачей является получение и изучение кальцийсвязывающих свойств ацетимидированного производного Ala^{74} -фрагмента 74—108.

Ацетимидирование — уникальный способ модификации аминогрупп белков, широко используемый в полусинтетических экспериментах. В большинстве случаев ацетимидирование не изменяет свойств белка, поскольку положительный заряд на остатках лизина сохраняется. Величина pK модифицированных аминогрупп при этом увеличивается, приближаясь к pK гуанидиновой группировки аргинина [3].

Из таблицы видно, что блокирование аминогрупп исходного белка метилацетимидатом практически не изменяет его способности связывать ионы кальция. В связи с этим представилось интересным получить ацети-

В работе приняты сокращения, рекомендованные комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC — IUB, а также: Acim — ацетимидовл-[$\text{CH}_2\text{C}(=\text{NH})$]; TEMED — N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин.

Константы связывания кальция парвальбумином III щуки, его фрагментами и их ацетимидированными производными при 20° С, рН 7,5

Белок. фрагмент	СД-участок $K_1 \cdot 10^{-8}, M^{-1}$	ЕФ-участок K_2, M^{-1}	Буферный раствор **
Парвальбумин III	3,4	$6,3 \cdot 10^8$	1
Асiм ₁₈ -парвальбумин III	3,5	$2,5 \cdot 10^9$	2
Фрагмент 75-108 *	—	217	1
Arg ⁷⁴ -фрагмент 74-108 2*	—	1670	1
Ala ⁷⁴ -фрагмент 74-108	—	500	2
Асiм-Ala ⁷⁴ , ε-Асiм ₁₈ -фрагмент 74-108	—	0	2

* Получен деблокированием ε-Вос₁₈-фрагмента 75-108 [1].

2* Получен как описано в работе [1].

** Состав буферных растворов: 1—0,05 М трис-НСI, 2—0,05 М Нерес-НСI.

мидированное производное Ala⁷⁴-фрагмента 74-108 парвальбумина, чтобы наряду с изучением вклада остатка Ala⁷⁴ в способность ЕФ-домена связывать ионы кальция выяснить, как изменятся кальцийсвязывающие свойства при сильном увеличении рК всех аминокрупп Ala⁷⁴-фрагмента 74-108.

Исходным производным ЕФ-домена, с которым проводились эксперименты, является ε-Вос₁₈-фрагмент 75-108 парвальбумина III щуки. Этот фрагмент получили расщеплением Вос₁₈-парвальбумина III щуки трипсином по остатку Arg⁷⁵ по методике, описанной в работе [1]. Он имеет 4 аминокруппы остатков лизина (Lys⁸², Lys⁸⁶, Lys⁹⁰ и Lys⁹³), блокированных Вос-группой, и доступную для N-ацилирования незащищенную α-аминогруппу.

Для ацилирования α-аминогруппы ε-Вос₁₈-фрагмента 75-108 мы использовали водорастворимый 2-нитро-4-сульфофениловый эфир Вос-аланина [4].

2-Нитро-4-сульфофениловые эфиры аминокислот сравнимы по N-ацилирующей способности с N-оксисукцинимидными эфирами, выгодно отличающейся от последних тем, что позволяют проводить реакцию N-ацилирования в водной среде, без добавления органического растворителя [4]. Как видно на примере производных Вос-лейцина (рис. 1), скорость гидролиза активированных эфиров N-защищенных аминокислот в 50% диоксане невелика по сравнению со скоростью образования пептидной связи в тех же условиях. В водной среде наблюдается аналогичное соотношение скоростей аминлиза и гидролиза [4].

Реакцию взаимодействия водорастворимого 2-нитро-4-сульфофенилового эфира Вос-аланина с ε-Вос₁₈-фрагментом 75-108 парвальбумина проводили в воде, поддерживая рН в интервале 8-9 с помощью ТЕМЕД. Критерием завершения реакции является отсутствие Dns-Asp-ОН в гидролизате дансильрованной аликвоты, содержащей 0,05-0,1 мг фрагмента парвальбумина. В наших экспериментах для полного протекания реакции достаточно одной обработки раствора ε-Вос₁₈-фрагмента 75-108 (3-5 мг/мл) 20-50-кратным молярным избытком водорастворимого эфира. Деблокирование и очистку полусинтетического фрагмента 74-108 осуществляли, как описано ранее для ε-Вос₁₈-фрагмента 75-108 [1].

Константы связывания кальция определяли методом собственной фенилаланиновой флуоресценции [5, 6] на основании кривых флуориметрического титрования фрагментов ионами Ca²⁺ (рис. 2). Результаты представлены в таблице. Там же для сравнения приведены константы связывания ионов кальция исходным парвальбумином, его ацетимидированным производным, а также фрагментом 75-108 и Arg⁷⁴-фрагментом 74-108.

Результаты наших исследований показывают, что добавление остатка аланина к N-концу фрагмента 75-108 парвальбумина III щуки приводит к некоторому увеличению константы связывания кальция ($K=500 M^{-1}$), однако получаемый при этом Ala⁷⁴-фрагмент 74-108 связывает кальций хуже, чем Arg⁷⁴-фрагмент 74-108 ($K=1670 M^{-1}$). Это подтверждает вы-

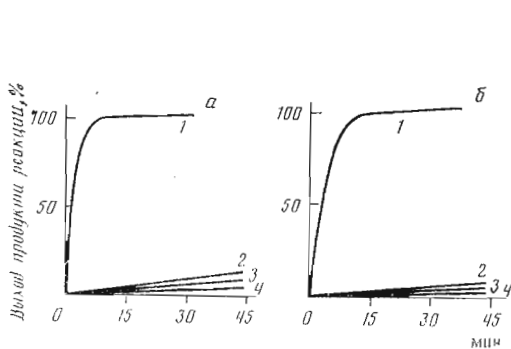


Рис. 1

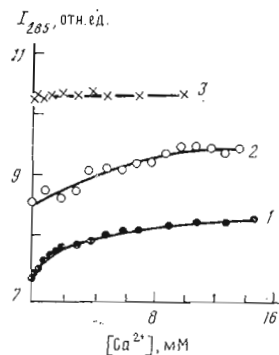


Рис. 2

Рис. 1. Кинетика гидролиза и аминоллиза N-оксисукцинимидного (а) и 2-нитро-4-сульфофенилового (б) эфиров Вос-лейцина в 50% диоксапе. 1 — взаимодействие активированного эфира с эквивалентом лейцинамида (реакция аминоллиза), pH 8,0. Гидролиз активированного эфира при pH 9,0 (2), 8,5 (3), 8,0 (4). Концентрация активированного эфира 0,1 М; титрование 0,25 М Na₂CO₃.

Рис. 2. Флуориметрическое титрование ионами Ca²⁺ фрагментов парвальбумина: 1 — Arg⁷⁵-фрагмент 74—108; 2 — Ala⁷⁴-фрагмент 74—108; 3 — Asim-Ala⁷⁴, ε-Asim₁₆-фрагмент 74—108. Концентрации фрагментов 5·10⁻⁵—2·10⁻⁴ М.

сказанное предположение о функциональной важности положительно заряженной гуанидиновой группы остатка Arg⁷⁵ в поддержании структуры EF-фрагмента парвальбумина. Полную потерю способности связывать кальций ацетимидированным Ala⁷⁴-фрагментом 74—108 ($K=0$) можно рассматривать как косвенное свидетельство о большей, чем у исходного белка, роли электростатического взаимодействия ионов аминокислотных остатков в формировании структуры 35-членного белкового фрагмента.

Экспериментальная часть

Парвальбумин III щуки выделяли по методике [7]. Модификацию белка Вос-аланидом и последующее расщепление по остатку Arg⁷⁴ осуществляли по методике [1]. Ацетимидирование парвальбумина и Ala⁷⁴-фрагмента 74—108 проводили по методике [8].

Asim-Ala⁷⁴, ε-Asim₁₆-фрагмент 74—108 очищали гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-25 (Pharmacia, Швеция) в 0,05 М NH₄HCO₃ (pH 8,0) и лиофилизовали. Asim₁₆-парвальбумин III щуки очищали на колонке TSK G 2000 (7,5×600 мм) в 0,1 М NH₄OAc, pH 6,5. В работе использовали хроматографическое оборудование производства LKB (Швеция).

Константы связывания кальция определяли методом фенилаланиновой флуоресценции, как описано в работах [5, 6]. Концентрации парвальбумина и его фрагментов находили спектрофотометрически. Для парвальбумина III щуки $\epsilon_{259}^{1\%} = 1810 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, для фрагментов использовали расчетные значения коэффициента поглощения, исходя из количества остатков фенилаланина.

Ala⁷⁴-фрагмент 74—108 парвальбумина III щуки. 10 мг (3 мкмоль) ε-Вос₄-фрагмента 75—108 парвальбумина III щуки растворили в 2 мл воды, добавили 20 мкл ТЕМЕВ. К полученному раствору добавили 20 мг 2-нитро-4-сульфофенилового эфира Вос-аланина [4]. Перемешивали 16 ч при 20°С. Анализ гидролизата дацилированной аликвоты показал, что реакция прошла полностью. Реакционную смесь разбавили 5 мл воды, центрифугировали 30 мин при 4000 г, супернатант фильтровали через фильтр Synrog № 6 (Чехословакия), обессолили на колонке (1,6×30 см) с сефадексом G-25 и лиофилизовали. Деблокирование, очистку и анализ полусинтетического фрагмента проводили, как описано ранее для ε-Вос₄-фрагмента 75—108 [1]. Получили 5 мг Ala⁷⁴-фрагмента 74—108, имеющего, по данным N-концевого анализа, остаток аланина на N-конце.

ЛИТЕРАТУРА

1. Медведев В. Н., Митин Ю. В., Пермяков Е. А. // Биооргани. химия. 1987. Т. 13. № 2. С. 177—182.
2. Kretsinger R. H., Nockolds C. E. // J. Biol. Chem. 1973. V. 248. № 9. P. 3313—3326.
3. Offord R. E. Semisynthetic proteins. N. Y.: John Wiley and Sons, Chichester. 1980. 235 P.
4. Гершкович А. А., Серебряный С. В. // Биооргани. химия. 1979. Т. 5. № 8. С. 1125—1131.
5. Permyakov E. A., Burstein E. A., Sawada Y., Yamazaki J. // Biochim. et biophys. acta. 1977. V. 491. № 1. P. 149—154.

6. Пермяков Е. А., Ярмоленко В. В., Калининченко Л. П., Буриштейн Э. А. // Биохимическая химия. 1981. Т. 7. № 11. С. 1660–1668.
7. Bhushana Rao K. S. P., Gerday Ch. // Comp. Biochem. and Physiol. B. 1973. V. 44. № 5. P. 931–937.
8. Wallace C. J. A., Harris D. E. // Biochem. J. 1984. V. 217. № 3. P. 589–594.

Поступила в редакцию
18.XI.1986
После доработки
17.II.1987

THE PREPARATION OF THE Ala⁷⁴ ANALOGUE OF THE PIKE PARVALBUMIN III FRAGMENT 74–108 AND ITS ACETIMIDINATED DERIVATIVE

MEDVEDKIN V. N., MITIN Yu. V., PERMYAKOV E. A.*

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

Interaction of the water-soluble 2-nitro-4-sulfophenyl ester of Boc-alanine with ϵ -Boc₄-fragment 75–108 of parvalbumin III of pike leads to semisynthetic Boc-Ala⁷⁴, ϵ -Boc₄-fragment 74–108. After deprotection and purification steps Ala⁷⁴-fragment 74–108 binds calcium ions with $K=500 \text{ M}^{-1}$, which is ca. 3 times lower than calcium binding constant of Arg⁷⁴-fragment 74–108. After acetimidination of the Ala⁷⁴-fragment 74–108 its calcium binding ability completely disappeared.