



УДК 577.11

ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ЛЕЙЦИНСВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА

I. НИТРОВАНИЕ ТИРОЗИНОВЫХ ОСТАТКОВ ТЕТРАНИТРОМЕТАНОМ

*Гаврилова Н. А., Антюхов В. К.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Нитрование тетранитрометаном нативного лейцинсвязывающего белка (LIV-белка) приводит к модификации суммарно 1 остатка тирозина с сохранением 70% связывающей субстрат активности. Субстрат не защищает этот остаток тирозина от модификации. Пептидные карты свидетельствуют, что реакция затрагивает более чем 1 остаток тирозина. Нитрование в растворах мочевины приводит к введению большего количества нитрогрупп, причем исчерпывающее нитрование происходит в ~ 4 М мочевины. Активность белка после удаления мочевины снижается пропорционально числу введенных нитрогрупп. Сделан вывод, что остатки тирозина не принимают непосредственного участия в комплексообразовании, но важны для сохранения пространственной структуры белка.

Периплазматический белок *E. coli*, связывающий лейцин, изолейцин и валин (LIV-белок), по-видимому, является компонентом транспортной системы разветвленных аминокислот в микробной клетке [1]. Он был выделен и очищен в нескольких лабораториях [2—4], его свойства в настоящее время интенсивно изучаются [5—8]. Одним из широко используемых подходов для обнаружения групп белка, участвующих в связывании субстрата, является метод химической модификации белка. Ранее [4] нами было показано, что эллиптичность полос ароматических хромофоров в спектрах КД LIV-белка изменяется, хотя и слабо, в присутствии лейцина. Поэтому можно было предположить, что ароматические остатки белка, в частности остатки тирозина, участвуют в комплексообразовании LIV-белка с субстратом. Для проверки этого предположения мы предприняли опыты по химической модификации остатков тирозина нитрованием тетранитрометаном [9].

Нитрование LIV-белка проводили в Трис-HCl-буфере (рН 8) 150-кратным избытком тетранитрометана. По изменению оптической плотности раствора при λ 350 нм определили, что реакция заканчивается примерно через 2,5—3 ч. Такое время было использовано для препаративного получения нитро-LIV-белка. Последний выделяли гель-фильтрацией подкисленной до рН 4 реакционной смеси на биогеле Р-4. Анализ полученных препаратов по оптической плотности при λ 280 и 381 нм, определение содержания белка по методу Лоури, а также данные аминокислотного анализа показывают, что содержание нитротирозина в препаратах колеблется в пределах 0,7—1,2 остатка на 1 моль белка (считая M равным 36 000). Таким образом, нитрование нативного LIV-белка приводит суммарно к введению ~ 1 нитрогруппы в молекулу белка.

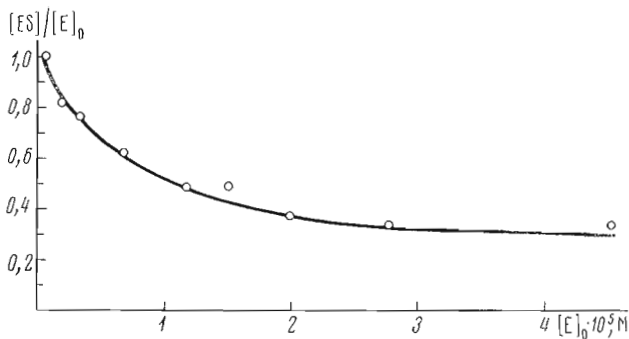


Рис. 1. Калибровочная кривая зависимости относительной концентрации связанного лейцина к начальной концентрации белка ($[ES]/[E]_0$) от $[E]_0$ при равновесной концентрации лейцина $[S]_{\text{равн}} \sim 1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$

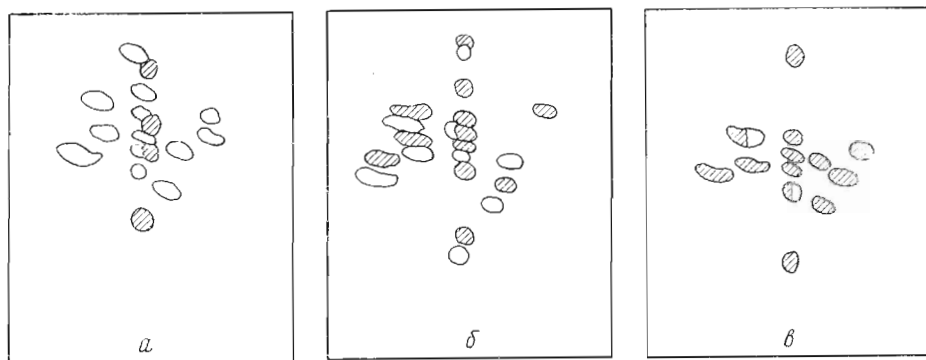


Рис. 2. Пептидные карты, полученные химотриптическим гидролизом препаратов восстановленного и карбоксиметилированного нитро-LIV-белка. *a* — нитрование в отсутствие мочевины, *б* — в 3,5 М мочевины, *в* — в 7 М мочевины. Заштрихованные пятна — пептиды, содержащие нитротирозин; белые пятна — пептиды, содержащие тирозин

Определение связывающей активности нитрованных препаратов и контрольных проб (белок инкубировали 3,5 ч в условиях нитрования, но без тетранитрометана и подвергали геле-хроматографии на биогеле Р-4) проводили равновесным диализом против ^{14}C -L-лейцина ($1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) в стандартных условиях [3]. Результаты корректировали в соответствии с различием в концентрациях опытных и контрольных проб, поскольку, как было показано нами ранее [7], связывание субстрата LIV-белком не подчиняется гиперболическому закону, особенно при низких концентрациях белка. Корректировка проводилась по калибровочной кривой (рис. 1). Оказалось, что введение одной нитрогруппы в LIV-белок приводит к потере активности примерно на 30%.

Представлялось интересным выяснить, происходит ли нитрование какого-либо определенного остатка тирозина в белке, или полученные результаты отражают усредненную картину нитрования нескольких остатков тирозина. С этой целью препараты нитрованного LIV-белка подвергали восстановлению, карбоксиметилированию и химотриптическому гидролизу. Были получены пептидные карты гидролизата (рис. 2*a*), свидетельствующие о наличии 4—5 разных пептидов, содержащих остатки нитротирозина. Таким образом, нитрованию, по-видимому, подвергаются несколько доступных реагенту остатков тирозина так, что суммарное количество нитрогрупп соответствует приблизительно одной нитрогруппе на 1 моль белка.

Возникает вопрос: отражает ли наблюдаемое, сравнительно небольшое падение связывающей активности LIV-белка химические изменения остатка

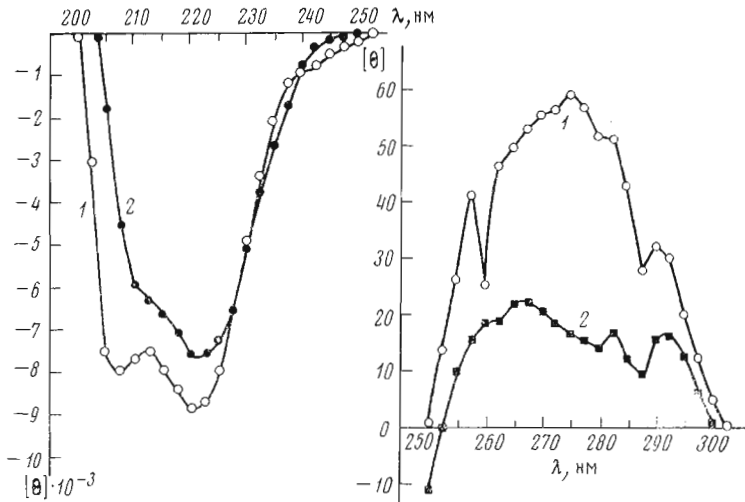


Рис. 3. КД-спектры нативного (1) и нитрованного в отсутствие мочевины (2) LIV-белка

тирозина, принимающего участие в комплексообразовании, или это падение связано с конформационными изменениями макромолекулы? Мы провели опыты по нитрованию LIV-белка в присутствии больших избытков лейцина. Оказалось, что число введенных нитрогрупп по сравнению с контролем (нитрование в отсутствие лейцина) практически одно и то же. Следовательно, субстрат не защищает белок от химической модификации. Сравнение спектров кругового дихроизма нативного белка и белка, модифицированного нитрованием, показывает (рис. 3), что введение нитрогрупп приводит к заметному изменению структуры белковой глобулы.

Были поставлены опыты по более глубокому нитрованию LIV-белка. Как известно [2,6], этот белок способен полностью регенерировать связывающую субстрат активность после разворачивания в растворах мочевины и последующего удаления мочевины. Мы нитровали LIV-белок в растворах мочевины разной концентрации, затем удаляли мочевины диализом и в полученном белке определяли число введенных нитрогрупп и активность по сравнению с контролем — белком, подвергнутым тем же обработкам мочевиной, но не обработанным тетранитрометаном. Как видно из рис. 4, при повышении концентрации мочевины число введенных нитрогрупп увеличивается, причем примерно до 3 М растворов мочевины очень медленно, а при более высоких концентрациях денатурирующего агента число введенных нитрогрупп резко увеличивается. При концентрациях мочевины 4—5 М происходит полное нитрование всех 13 остатков тирозина в молекуле LIV-белка.

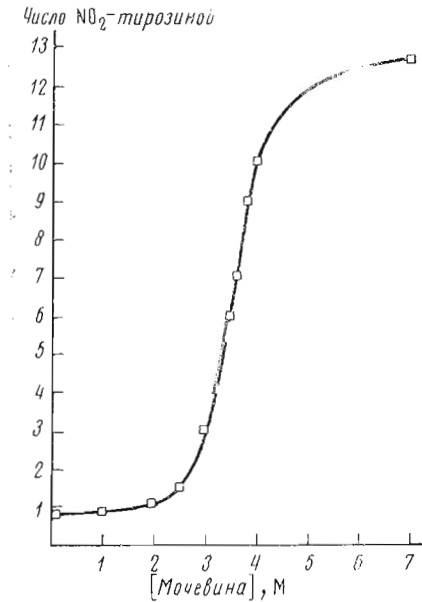


Рис. 4. Нитрование остатков тирозина при разных концентрациях мочевины

Пептидные карты химотрипсинового гидролизата белка, полученного нитрованием в 3,5 М мочевины (рис. 2б), по-

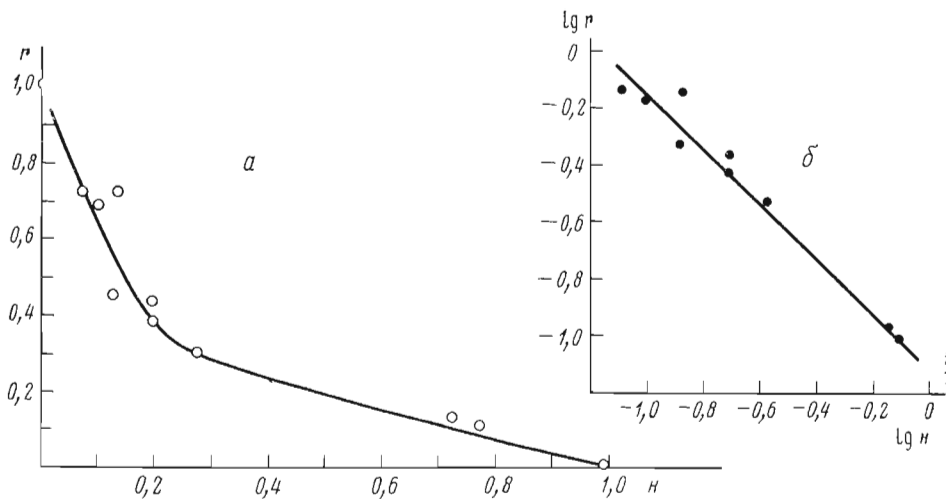


Рис. 5

Рис. 5. Зависимость относительной активности LIV-белка (r) (по связыванию L-лейцина) от доли нитрованных остатков тирозина (n): a — в прямых, b — в логарифмических координатах

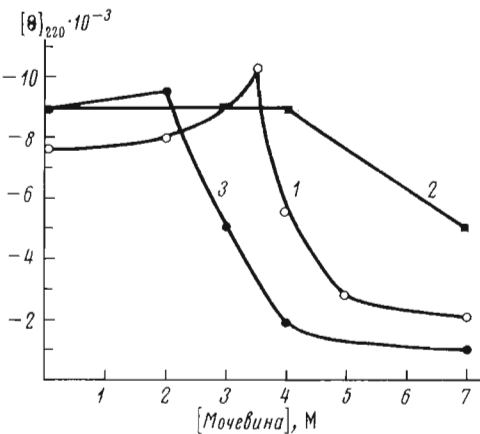


Рис. 6

Рис. 6. Изменение эллиптичности полосы при 220 нм в КД-спектрах LIV-белка: 1 — подвергнутого нитрованию в растворах с различной концентрацией мочевины (после удаления мочевины); 2 — нативного LIV-белка, обработанного мочевиной (после удаления мочевины); 3 — нативного LIV-белка в растворах мочевины различной концентрации

казывают, что в этом случае нитрование идет неоднозначно. Было обнаружено 12 пептидов, содержащих нитротирозин, и 10 тирозинсодержащих пептидов, тогда как суммарное число введенных нитрогрупп, по данным спектрофотометрического анализа, составляет от 3 до 4,5 (в зависимости от исходной концентрации белка, взятого для нитрования). Таким образом, в этих условиях нитруется значительно большее число тирозиновых остатков, чем это определяется спектрофотометрически, однако нитрование их идет не до конца.

Связывающая лейцили активность полученных препаратов падает с увеличением числа введенных нитрогрупп (рис. 5а). Следует отметить, что график изменения активности с изменением доли модифицированных остатков тирозина в логарифмических координатах представляет собой прямую линию (рис. 5б). Такой характер зависимости может свидетельствовать о постепенном падении концентрации активного белка за счет инактивации тех молекул белка, которые подверглись нитрованию.

Нитрование в растворах мочевины низкой концентрации, по-видимому, не вызывает существенных конформационных перестроек белковой глобулы, хотя и приводит к потере активности. Об этом говорит характер изменения эллиптичности полосы $n^0 \rightarrow \pi^*$ -переходов (220 нм) в КД-спектрах ренатурированных после нитрования в мочевины препаратов LIV-белка (рис. 6). Эллиптичность этой полосы для препаратов, нитрованных в ра-

створах мочевины вплоть до 3,5 М, даже несколько увеличивается. Резкое падение Θ_{220} наблюдается в интервале концентраций мочевины от 3,5 до 4,5 М. Именно в этом интервале концентраций модифицируется максимальное число тирозиновых остатков. Препараты белка, нитрованные в 7 М мочевины, после ее удаления практически не ренатурируют, и величина Θ_{220} у них близка соответствующей величине для нативного белка, полученной в растворе мочевины этой концентрации. Ренатурация немодифицированного белка после обработки 7 М мочевиной хотя и приводит к некоторому падению Θ_{220} , но значительно меньшему, чем у исчерпывающе нитрованных препаратов.

Некоторое повышение эллиптичности при 220 нм у LIV-белка, модифицированного в 1—3,5 М растворах мочевины, видимо, связано с разрушением в этих условиях белковых ассоциатов (см. [7]) и нитрованием остатков тирозина, находившихся в зоне межглобулярных контактов. Удаление мочевины может приводить к реассоциации так, что остатки нитротирозина оказываются «иммобилизованными» в этой зоне, что вызывает увеличение Θ_{220} .

Можно, таким образом, заключить, что остатки тирозина не участвуют непосредственно в комплексообразовании с субстратом, однако играют, по-видимому, важную роль в поддержании нативной структуры белковой глобулы. Изменения этой структуры резко сказываются на активности LIV-белка.

Экспериментальная часть

LIV-белок получали по методу [4]. Белок хранили в замороженном состоянии при -20° . Для предотвращения микробного заражения в растворы добавляли 0,02% KN_3 .

Мочевину марки ч. д. а. перед использованием дважды кристаллизовали из смеси этанол — вода. Все остальные реагенты (х. ч.) использовались без дополнительной очистки.

Для нитрования в отсутствие мочевины к 3 мл раствора LIV-белка (1 мг/мл) в 0,05 М Трис-НСI-буфере (рН 8) добавляли 0,127 мл 0,1 М спиртового раствора тетранитрометана, размешивали 3,5 ч при 20° , затем подкисляли ледяной уксусной кислотой до рН 4 и наносили на колонку ($1,8 \times 21$ см) с биогеом Р-4. Колонку элюировали водой, собирая фракции по ~ 3 мл.

При нитровании в растворах мочевины 7 мл раствора LIV-белка (1,5 мг/мл) диализовали 18 ч при 4° против 500 мл раствора мочевины соответствующей концентрации, содержащего 0,01 М Трис-НСI-буфер (рН 8). Затем раствор белка разделяли на две порции. Первую порцию (3 мл) диализовали против 700 мл 0,005 М Трис-НСI-буфера (рН 7,6) и затем против 700 мл воды. Этот раствор белка служил контролем для определения связывающей активности. Вторую порцию (4 мл) нитровали тетранитрометаном, как описано выше. По окончании реакции раствор диализовали против 600 мл 0,01 М Трис-НСI-буфера (рН 7,6) и повторно против 600 мл воды.

Активность нитрованного LIV-белка и контрольных проб определяли методом равновесного диализа, как описано в работе [3], используя ^{14}C -L-лейцин (Amersham, 324 мКи/ммоль). Радиоактивность проб измеряли на счетчике SL-30 (Intertechnique, Франция). Результаты корректировали на различие в концентрациях белка в контрольных и опытных пробах по калибровочной кривой зависимости отношения концентрации связанного лейцина к концентрации белка от начальной концентрации белка, построенной для равновесной концентрации лейцина $\sim 1 \cdot 10^{-6}$ М.

Спектрофотометрические измерения проводили на приборах СФ-4, Specord (ГДР) и Gifford (США).

Спектры кругового дихроизма получали на дихрографе J. Yvon mark III (Франция) и спектрополяриметре Cary-60 (США) с приставкой CD-6002.

Аминокислотный анализ выполняли на автоматическом анализаторе BC-201 (Bio-Cal, ФРГ) с использованием 3-нитро-*L*-тирозина в качестве стандарта.

Для восстановления и карбоксиметилирования [10] 5 мг белка растворяли в 4,5 мл Трис-НСl-буфера, рН 8,6 (~ 1,4 М). В раствор добавляли 1,8 г мочевины и 0,45 мл насыщенного раствора EDTA. Продуvalи азот и приливали 0,15 мл меркаптоэтанола. Реакционную смесь оставляли на ночь при 20°, затем добавляли 1,5 мл иодуксусной кислоты (0,402 г в 1,5 мл 1 н. NaOH). Через 15 мин реакционную смесь подкисляли ледяной уксусной кислотой (несколько капель) до рН 4,5—5,0 и наносили на колонку с сефадексом G-25, предварительно промытую 30% уксусной кислотой; этой же кислотой проводили элюцию. Фракции, содержащие белок, объединяли и диализовали, меняя диализат до исчезновения запаха уксусной кислоты. Затем раствор лиофилизовали.

Для гидролиза α -химотрипсином 2,5 мг карбоксиметилированного белка растворяли в 0,6 мл 0,1 М аммоний-бикарбонатного буфера (рН 8,5) и прогревали 10 мин на кипящей водяной бане. Затем охлаждали, приливали 0,06 мл раствора α -химотрипсина (1 мг α -химотрипсина в 0,5 мл 0,1 М аммоний-бикарбонатного буфера, рН 8,5) и выдерживали 6 ч при 37°. Гидролизат лиофилизовали. Половину гидролизата использовали для получения пептидной карты на пластине 20 × 20 см целлюлозой MN-300.

Электрофорез проводили в буфере пиридин — уксусная кислота — вода (20 : 9 : 971), рН 5,6.

Хроматографию осуществляли в системе бутанол — пиридин — уксусная кислота — вода, 60 : 40 : 12 : 48.

Для идентификации тирозинсодержащих пептидов [11] пластины с пептидными картами одрыскивали сначала 0,1% раствором 1-нитрозо-2-нафтаола в этаноле, а затем 20% азотной кислотой и слегка нагревали 3—5 мин. Идентификацию пептидов, содержащих нитротирозин, проводили в атмосфере аммиака.

Авторы благодарят Н. А. Алданову за помощь в структурном анализе препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Piperno J. R., Oxender D. L. (1966) J. Biol. Chem., **241**, 5732—5734.
2. Penrose W. R., Nichoalds G. E., Piperno J. R., Oxender D. L. (1968) J. Biol. Chem., **243**, 5924—5928.
3. Anraku Y. (1968) J. Biol. Chem., **243**, 3116—3122.
4. Антонов В. К., Арсеньева Е. Л., Гаврилова Н. А., Гинодман Л. М., Крылова Ю. И. (1973) Биохимия, **38**, 1294—1297.
5. Anraku Y. (1968) J. Biol. Chem., **243**, 3123—3127.
6. Penrose W. R., Zand R., Oxender D. L. (1970) J. Biol. Chem., **245**, 1432—1437.
7. Антонов В. К., Воротишцева Т. И., Александров С. Л., Гаврилова Н. А., Арсеньева Е. Л. (1975) Докл. АН СССР, **221**, 1215—1218.
8. Amauma H., Noe J., Anraku Y. (1976) J. Biochem., **79**, 1167—1182.
9. Sokolovsky M., Riordan J. F., Vallee B. L. (1966) Biochemistry, **5**, 3582—3589.
10. Crestfield A. M., Moore S., Stein W. H. (1963) J. Biol. Chem., **238**, 622—627.
11. Tsao D., Azari P., Phillips J. L. (1974) Biochemistry, **13**, 408—413.

Поступила в редакцию
7.XII.1976

CHEMICAL MODIFICATION OF THE LEUCINE-BINDING PROTEIN.
I. NITRATION OF TYROSINE RESIDUES BY TETRANITROMETHANE

GAVRILOVA N. A., ANTONOV V. K.

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

Nitration of native leucine-binding protein by tetranitromethane causes modification of 1 tyrosine residue (in total) and results in a preparation which retains 70 percent of initial binding activity. The substrate does not protect the protein from nitration. Examination of the peptide maps revealed that nitration affects more than one residue. Nitration of the protein in urea solutions leads to modification of several tyrosine residues, whereas in 4M urea all the tyrosines are modified. After removing the urea, the activity of the protein decreases strictly proportionally to the amount of nitro-groups introduced. It was suggested that tyrosine residues are not directly involved in substrate-binding but play a role in the maintenance of the protein native conformation.
