



УДК 547.96.02

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА LIV-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА ИЗ *E. COLI*

III.* ПЕПТИДЫ ИЗБИРАТЕЛЬНОГО ТРИПТИЧЕСКОГО И ОГРАНИЧЕННОГО
КИСЛОТНОГО ГИДРОЛИЗОВ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИСУЛЬФИДНОГО МОСТИКА
В МОЛЕКУЛЕ БЕЛКА

*Мороз И. Н., Гринкевич В. А., Арзамасова Н. М.,
Потапенко Н. А., Акименко З. А., Назимов И. В.,
Алданова П. А.*

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Проведен триптический гидролиз карбоксиметилированного (СМ), малеилированного препарата LIV-белка. Методами гель-фильтрации, хроматографии на DEAE-целлюлозе и бумаге выделено 8 индивидуальных пептидов. Установлена полная аминокислотная последовательность 6 пептидов и частичная — 2. Осуществлен гидролиз СМ-LIV-белка по связям аспарагиновая кислота — пролин. Из гидролизата хроматографией на биогеле Р-10 и DEAE-целлюлозе выделено 4 пептида. Структурный анализ полученных пептидов позволил завершить реконструкцию полипептидной цепи белка. Двумя независимыми методами показано наличие дисульфидного мостика в молекуле LIV-белка.

На основании исследования пептидов исчерпывающего триптического гидролиза [2] и бромциановых пептидов [1] была установлена частичная структура Leu, Pe, Val-связывающего белка (LIV-белок). Настоящее сообщение является завершающим в серии и посвящено выделению и установлению строения пептидов избирательного триптического гидролиза по остаткам аргинина и кислотного гидролиза по связям аспарагиновая кислота — пролин, а также определению дисульфидного мостика в молекуле белка.

I. Пептиды избирательного триптического гидролиза по остаткам аргинина

Молекула LIV-белка содержит 7 остатков аргинина [2], и, следовательно, при избирательном триптическом гидролизе должно было образоваться максимально 8 фрагментов, строение которых предполагалось определять методом автоматической деградации.

Для модификации и последующего триптического гидролиза карбоксиметилированного малеилированного LIV-белка (СМ-М-белок) использовались обычные условия. Во избежание возможной агрегации большинство операций по разделению полученной смеси пептидов проводилось без предварительного удаления защитных групп.

* Сообщение II см. [1].

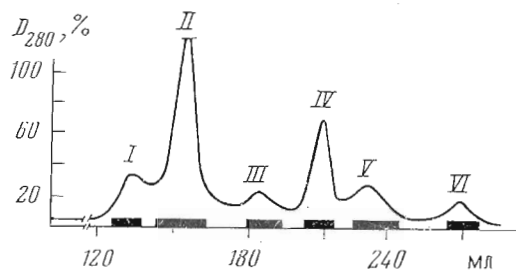


Рис. 1. Хроматография пептидов избирательного триптического гидролиза LIV-белка на колонке (2,5×100 см) с биогелем P-10 в 0,05 М бикарбонате аммония. Здесь и далее прямоугольники на оси абсцисс — границы объединения фракций

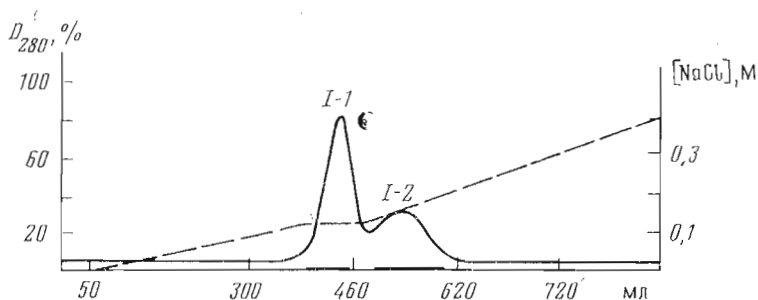


Рис. 2. Хроматография фракции I (рис. 1) на колонке с целлюлозой DE-32 в 0,05 М трис-НСl-буфере, рН 8,0, в 6 М мочеvine. Пунктирная линия — изменение концентрации NaCl

Первоначальное фракционирование гидролизата осуществлялось на биогеле P-10, при этом было получено 6 фракций (рис. 1). Определение N-концевых аминокислот в аликвотах растворов объединенных фракций до и после снятия защитных групп (табл. 1) показало, что все фракции, за исключением IV и V, гетерогенны, причем во фракциях I и II присутствует N-концевой фрагмент белка (N-концевым остатком LIV-белка является глутаминовая кислота).

Для дальнейшего разделения пептидов фракции I была применена хроматография на DEAE-целлюлозе в градиенте концентраций NaCl (рис. 2). В результате были получены фракции I-1 и I-2, содержащие индивидуальные пептиды с N-концевыми аминокислотами — глутаминовая кислота и аланин соответственно.

Фракция II содержала в качестве примеси небольшие количества пептидов, присутствовавших во фракции I. Для их отделения была использована хроматография на биогеле P-30. Основной компонент фракции II, по данным N-концевого анализа и диск-электрофореза в полиакриламидном геле, был гомогенен, однако определение частичной N-концевой последовательности (см. ниже) показало, что он является смесью двух пептидов. Разделить смесь не удалось, поскольку составляющие ее пептиды, как оказалось впоследствии, имели близкие молекулярные веса и заряды.

Фракция III была разделена на индивидуальные компоненты III-1 и III-2 (после снятия защитных групп) хроматографией на бумаге. Фракции IV и V, судя по N-концевому анализу и хроматографическому поведению, содержали гомогенные пептиды. Из фракции VI хроматографией на бумаге были выделены индивидуальные пептиды VI-1 и VI-2.

В табл. 2 приведен аминокислотный состав и N-концевые аминокислотные остатки всех выделенных в индивидуальном состоянии пептидов избирательного триптического гидролиза LIV-белка. Полученные данные свидетельствуют о неравномерном распределении остатков аргинина в

Таблица 1

N-Концевые аминокислоты фракций I–VI (рис. 1) до (а) и после (б) снятия защитных групп

Фракции	а	б	Фракции	а	б
I	Ala	Ala, Glu	IV	Leu	Leu
II	Ala	Ala, Glu	V	Ile	Ile
III	Ala, Thr	Ala, Thr	VI	Gly, Glu	Gly, Glu

Таблица 2

Аминокислотный состав пептидов избирательного триптического гидролиза СМ-М-белка

Аминокислота	I-1	I-2	III-1	III-2	IV	V	VI-1	VI-2
Cys (См)	1,73 (2)							
Asp	13,42 (13)	16,80 (17)	4,88 (5)	2,21 (2)	2,00 (2)	1,19 (1)		
Thr	4,78 (5)	8,15 (8)	1,93 (2)	2,85 (3)				
Ser	4,91 (5)	6,81 (7)	1,00 (1)	1,13 (1)				
Glu	12,34 (12)	12,05 (12)	2,25 (2)	3,32 (3)	2,86 (3)	3,00 (3)	1,19 (1)	0,93 (1)
Pro	4,93 (5)	6,79 (7)		1,79 (2)	1,07 (1)			
Gly	10,38 (10)	12,33 (12)	4,06 (4)	2,37 (2)	2,90 (3)	1,82 (2)	1,40 (1)	
Ala	15,81 (16)	18,24 (18)	3,87 (4)	2,00 (2)		1,96 (2)		1,00 (1)
Val *	10,50 (11)	9,05 (9)	3,64 (4)	0,94 (1)	1,10 (1)	1,05 (1)		
Met	1,61 (2)	1,64 (2)			0,84 (1)			
Ile *	8,83 (9)	3,98 (4)	0,94 (1)	0,89 (1)	2,06 (2)	1,84 (2)	1,03 (1)	
Leu *	4,30 (4)	10,11 (10)	1,80 (2)	1,78 (2)	1,90 (2)	1,01 (1)	2,11 (2)	
Tyr	3,76 (4)	2,65 (3)		0,75 (1)	2,83 (3)	0,62 (1)	0,80 (1)	
Phe	0,97 (1)	4,67 (5)	2,81 (3)		1,05 (1)			
His	0,85 (1)	0,83 (1)			0,79 (1)	0,93 (1)		
Lys	8,21 (8)	11,86 (12)	3,23 (3)	2,96 (3)	2,02 (2)	0,96 (1)		
Arg	1,19 (1)		0,89 (1)	1,10 (1)	1,00 (1)	1,07 (1)	0,95 (1)	0,94 (1)
Trp **		2,62 (3)						
Число остатков	109	130	32	24	23	16	7	3
N-Концевая аминокислота	Glu	Ala	Ala	Thr	Leu	Ile	Gly	Glu
Выход, %	34	2,5	42	31	79,5	73	58	55

* Результаты 120-часового гидролиза.

** Определено после гидролиза метансульфоновой кислотой.

полипептидной цепи белка. Два из полученных фрагментов (I-1 и I-2) содержат 109 и 130 аминокислотных остатков соответственно и составляют в сумме две трети молекулы белка. Остальные 6 фрагментов представлены пептидами, содержащими от 32 до 3 аминокислот. Следует отметить, что пептиды III-2 и IV были разделены в одну стадию при гелехроматографии, несмотря на практически одинаковый молекулярный вес. Вероятно, в данном случае эффективность разделения обуславливалась различным содержанием ароматических аминокислот в их составе.

Пептид I-1. При автоматической деградации нативного LIV-белка было идентифицировано 52 аминокислотных остатка [1]. Анализ N-концевой последовательности фрагмента I-1 (Glu-Asp-Ile-Lys-Val-Ala-) позволил установить, что он является N-концевым пептидом молекулы белка — R₁ *. Данные о C-концевой последовательности пептида R₁, полученные при действии смеси карбоксипептидаз А (СРА) и В (СРВ) (95% Arg, 83% Ala, 75% Thr, 69% Leu), свидетельствуют о том, что C-концевое положение в нем занимает триптический пептид T-IV-2 [2].

* R — обозначение пептидов триптического гидролиза СМ-М-белка, цифра указывает порядок их расположения в молекуле.

Установление строения пептидов III-1, III-2, IV, V, VI-1 и VI-2

Шифр пептида	Положение в пептидной цепи	Аминокислотная последовательность*
VI-1	R ₂	Gly-Tyr-Gln-Leu-Ile-Leu-Arg
III-2	R ₃	Thr-Thr-Gly-Leu-Asp-Ser-Asp-Gln-Gly-Pro-Thr-Ala-Ala-Lys- Tyr-Ile-Leu-Glu-Lys-Val-Lys-Pro-Gln-Arg
V	R ₄	Ile-Ala-Ile-Val-His-Asp-Lys-Gln-Gln-Tyr-Gly-Glu-Gly-Leu- Ala-Arg
III-1	R ₅	Ala-Val-Gln-Asp-Gly-Leu-Lys-Lys-Gly-Asn-Ala-Asn-Val-Val-Phe- Phe-Asp-Gly-Ile-Thr-Ala-Gly-Glu-Lys-Asp-Phe-Ser-Thr-Leu Val-Ala-Arg
IV	R ₆	Leu-Lys-Lys-Glu-Asn-Ile-Asp-Phe-Val-Tyr-Tyr-Gly-Gly-Tyr- His-Pro-Glu-Met-Gly-Gln-Ile-Leu-Arg
VI-2	R ₇	Gln-Ala-Arg

* Здесь и далее приняты следующие обозначения: → — стадии деградации по методу Эдмана с идентификацией дансильных производных аминокислот, → — фенилтиогидантонов и дансильных производных; ← — гидролиз CPA, ← — смесью CPA и CPB; Ch — пептиды гидролиза химотрипсина.

Пептид I-2. Автоматической деградацией установлена последовательность пяти N-концевых аминокислот фрагмента: Ala-Ala-Gly-Leu-Lys-. По данным аминокислотного анализа (табл. 2), этот пептид не содержит остатка аргинина и его C-концевой аминокислотой, так же как и целой молекулы белка, является лизин. Отсюда было сделано заключение, что пептид I-2 занимает C-концевое положение в полипептидной цепи белка (R₈). Следует отметить, что выход пептида был незначительным (2,5%).

Пептиды фракции II. При анализе фракции на секвенаторе было выяснено, что она состоит из двух пептидов со следующими N-концевыми

последовательностями:

Ala-Ala-Gly-Leu-Lys-Thr-Gln-Phe-Met-Gly-Pro-Glu-Gly-Val-Ala-,
Ala-Ala-Leu-Gln-Ser-Leu-Gln-Ala-Gly-Leu-Asn-Gln-Ser-Asp-Asp-

Отнесение идентифицированных на каждой из 15 стадий аминокислот к одной из двух приведенных последовательностей было однозначным, поскольку одна из них (Ala-Ala-Leu-Gln-) принадлежала к известному триптическому пептиду T-III-2, состоящему из 21 аминокислоты. N-Концевая последовательность второго пептида была идентична N-концевой последовательности пептида R₈. Во фракции II, по данным аминокислотного анализа (не приведен), аргинин не содержался. На основании этих данных было предположено, что пептиды фракции II (условно обозначены R₉ и R₁₀) образовались в результате неспецифического гидролиза C-концевого фрагмента белка R₈, причем расщепление прошло практически количественно.

Аминокислотная последовательность пептидов III-1, III-2, IV, V, VI-1 и VI-2 устанавливалась классическими методами. Данные по определению их строения суммированы в табл. 3.

Пептид III-1. Деграцией по методу Эдмана определена последовательность 11 аминокислот, при этом найдено соединение триптических пептидов T-XIV и T-XXVIII-1. Результаты анализа C-концевой последовательности с помощью смеси CPB и CPA (100% Arg, 82% Ala, 74% Val, 45% Leu, 39% Thr, 40% Ser, 27% Phe) позволяют однозначно установить, что C-концевое положение в пептиде III-1 занимает триптический пептид T-XVII. Данные аминокислотного состава пептида III-1 подтверждают его строение.

Пептид III-2. Деграцией по методу Эдмана установлено, что N-концевым пептидом фрагмента является триптический пептид T-VII-1. Смесь CPA и CPB отщепляет с C-конца пептида только остаток аргинина. Для получения дополнительной информации проведен химотриптический гидролиз пептида III-2. Из гидролизата хроматографией на бумаге в системе I выделено 3 пептида (Ch-1—Ch-3) со следующим аминокислотным составом: Ch-1—Thr 1,85(2), Gly 1,26(1), Leu 0,97(1); Ch-2—Asp 1,96(2), Thr 0,75(1), Ser 1,26(1), Glu 0,79(1), Pro 0,99(1), Gly 1,10(1), Ala 2,12(2), Tyr 0,84(1), Lys 1,21(1); Ch-3—Glu 1,78(2), Pro 1,10(1), Val 0,96(1), Ile 0,84(1), Leu 1,16(1), Lys 2,17(2), Arg 1,00(1).

Данные по определению C-концевой последовательности пептида Ch-2 с помощью CPA (90% Tyr, 83% Lys, 160% Ala) и N-концевой последовательности пептида Ch-3 методом Эдмана (табл. 3) позволяют заключить, что в пептиде III-2 соединены последовательно триптические пептиды T-VII-1, T-XXX-4 и T-XXXV.

Пептид IV. Определение частичной N-концевой последовательности позволило найти перекрытие между триптическими пептидами T-XXXVII и T-XXX-2 и приписать пептиду IV приведенную структуру (табл. 3).

Пептид V. Результаты деграции по методу Эдмана в совокупности с данными аминокислотного состава свидетельствуют о том, что пептид V является суммой триптических пептидов T-XXIX и T-X-3.

Пептиды VI-1 и VI-2 имели N-концевые аминокислотные остатки и аминокислотный состав, идентичные соответствующим характеристикам триптических пептидов T-XXXII и T-IX-2. На этом основании им приписаны структуры, приведенные в табл. 3.

Положение в цепи белка пептидов IV (R₆) и VI-2 (R₇) однозначно следует из данных, полученных при определении структуры бромцианового фрагмента M₄ [1].

Бромциановый пептид M₃ содержит 5 из 7 остатков аргинина, имеющих в молекуле белка. Анализ на секвенаторе его N-концевой последовательности [1] позволяет соединить пептиды ограниченного триптичес-

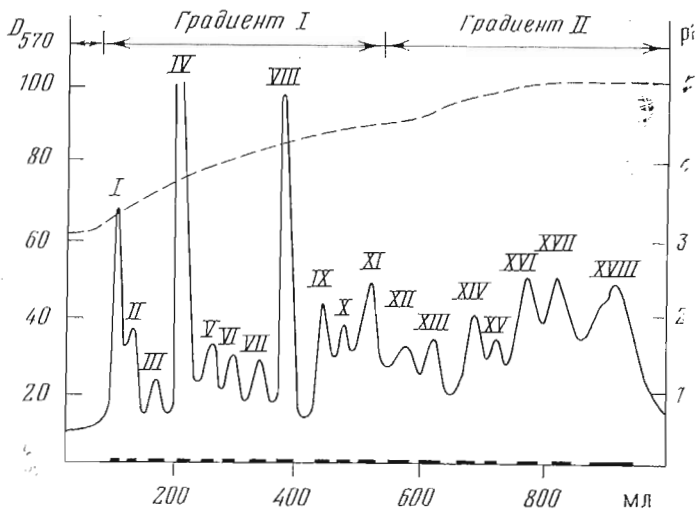


Рис. 3. Хроматография пептидов химотриптического гидролиза бромцианового фрагмента M_3 на колонке (0,6×100 см) с катионитом AG 50W×4. Пунктирная линия — изменение pH. Описание условий элюции см. «Экспериментальную часть»

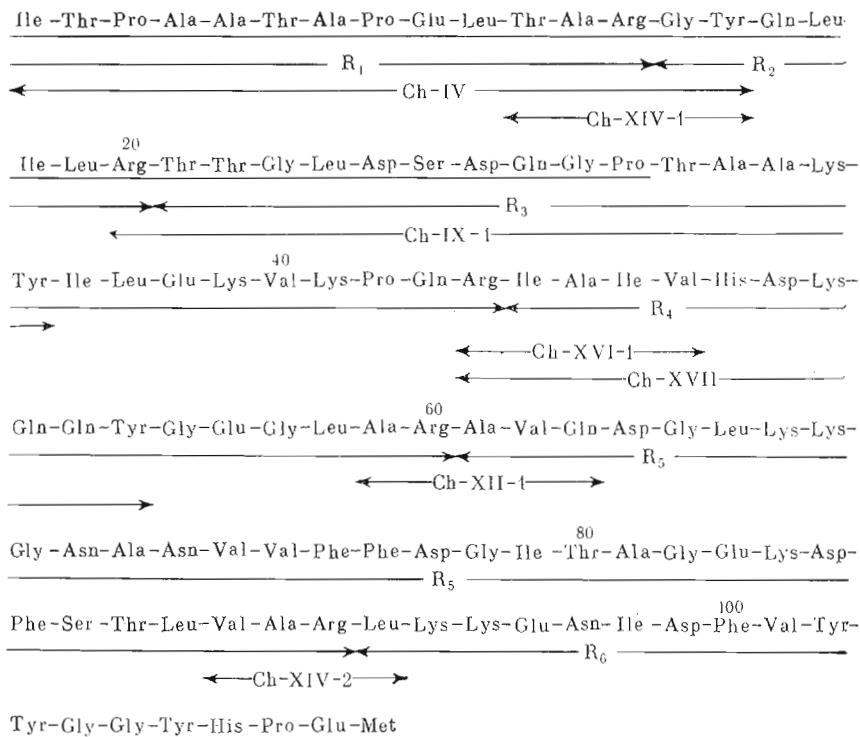


Рис. 4. Структура бромцианового пептида M_3 . Подчеркнута аминокислотная последовательность, установленная автоматической деградацией. R₁-R₆ — пептиды избирательного триптического гидролиза LIV-белка по остаткам аргинина; Ch — аргинин-содержащие пептиды химотриптического гидролиза фрагмента M_3

Установление строения аргининсодержащих пептидов химотриптического гидролизата фрагмента M₃

Пептид	Аминокислотный состав	Строение *
Ch-IV	Thr 2,55(3), Glu 1,23(1), Pro 1,93(2), Gly 1,16(1), Ala 3,74(4), Ile 0,67(1), Leu 0,84(1), Tyr 0,73(1), Arg 0,96(1)	Ile-Thr-Pro-Ala-Ala-Thr-Ala- Pro-Glu-Leu-Thr-Ala-Arg- 20% 45% Gly-Tyr 46% 92%
Ch-IX-1	Asp 1,92(2), Thr 2,74(3), Ser 0,95(1), Glu 1,06(1), Pro 0,91(1), Gly 2,28(2), Ala 1,87(2), Leu 1,10(1), Tyr 0,93(1), Lys 1,00(1), Arg 0,84(1)	Arg-Thr-Thr-Gly-Leu-Asp-Ser- Asp-Gln-Gly-Pro-Thr-Ala- Ala-Lys-Tyr 145% 91% 98%
Ch-XII-1	Glu 1,07(1), Ala 2,02(2), Val 0,85(1), Arg 1,06(1)	Ala-Arg-Ala-Val-Gln
Ch-XIV-1	Thr 0,86(1), Pro 1,14(1), Ala 1,17(1), Tyr 0,79(1), Arg 0,98(1)	Thr-Ala-Arg-Gly-Tyr
Ch-XIV-2	Ala 1,19(1), Val 1,10(1), Leu 0,89(1), Arg 0,83(1)	Val-Ala-Arg-Leu
Ch-XVI-1	Ala 1,34(1), Val 0,80(1), Ile 1,48(2), His 1,21(1), Arg 0,76(1)	Arg-Ile-Ala-Ile-Val-His
Ch-XVII	Asp 1,14(1), Glu 2,28(2), Ala 1,16(1), Val 0,54(1), Ile 1,49(2), Tyr 0,86(1), His 0,88(1), Lys 1,10(1), Arg 0,84(1)	Arg-Ile-Ala-Ile-Val-His-Asp- Lys-Gln-Gln-Tyr

* См. примечание к табл. 3.

кого гидролиза I-1, VI-1 и III-2 в блок R₁-R₂-R₃. Таким образом, оставался невыясненным порядок расположения пептидов III-1 и V. Для его нахождения был проведен химотриптический гидролиз пептида M₃ с целенаправленным выделением аргининсодержащих пептидов. В результате первичного деления гидролизата ионообменной хроматографией в градиенте концентраций и pH пиридин-ацетатных буферов (рис. 3) было получено 18 фракций. В шести из них (IV, IX, XII, XIV, XVI и XVII) были идентифицированы аргининсодержащие пептиды, причем пептиды фракций IV и XVII были индивидуальными. Для выделения пептидов из фракций XII, XIV, XVI была использована хроматография на бумаге, а фракция IX разделена на индивидуальные компоненты гель-фильтрацией на сефадексе G-15. Аминокислотный состав и строение выделенных химотриптических пептидов приведены в табл. 4. Полная структура пептидов Ch-IV, Ch-IX-1 и Ch-XVII установлена на основании данных их аминокислотного состава и строения соответствующих триптических пептидов [2].

Аминокислотная последовательность химотриптических пептидов Ch-IV, Ch-XIV-1 и Ch-IX-1 служит подтверждением соединения пептидов R₁, R₂ и R₃ (рис. 4). Результаты определения строения пептидов Ch-XIV-2 и Ch-XII-1 позволяют установить перекрытия между пептидами ограниченного триптического гидролиза III-1 (R₃) и R₆ и V (R₁) и R₅ соответственно. Химотриптические пептиды Ch-XVI-1 и Ch-XVII дают дополнительную информацию для подтверждения логически вытекающей связи пептидов R₃ и R₄.

Полученные данные дают возможность однозначно расположить пептиды ограниченного триптического гидролиза и одновременно реконструировать полную аминокислотную последовательность бромцианового фрагмента M₃ (рис. 4).

Таким образом, из триптического гидролизата СМ-М-LIV-белка были выделены все пептиды, составляющие его полипептидную цепь. Восемь пептидов (R_1-R_8) образовались в результате специфического расщепления по остаткам аргинина, и два пептида (R_9 и R_{10}) были обязаны своим происхождением разрыву пептидной связи, не отвечающей специфичности трипсина. Определение полной или частичной структуры выделенных фрагментов позволило установить 12 перекрытий между пептидами исчерпывающего триптического гидролиза.

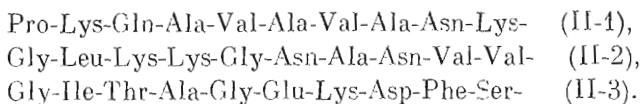
II. Пептиды ограниченного кислотного гидролиза по связям аспарагиновая кислота — пролин

Пептиды исчерпывающего триптического гидролиза LIV-белка T-XI-1, T-III-2 и T-XXX-3 содержат связи аспарагиновая кислота — пролин [2]. На основании имевшихся данных по частичной структуре белка были локализованы положения в пептидной цепи пептидов T-XI-1 (N-концевая часть белка) и T-III-2 (пептид R_{10}). Местонахождение пептида T-XXX-3 не было определено, однако наличие в нем остатка триптофана позволяло предположить, что он входит в бромциановый пептид M_5 , поскольку пептид M_{1+2} триптофана не содержит (рис. 5).

Из приведенного рисунка видно, что при расщеплении пептидной цепи по связям аспарагиновая кислота — пролин образуются фрагменты, определение структуры которых позволит получить информацию, необходимую для завершения реконструкции молекулы белка.

Для ограниченного кислотного гидролиза белка были использованы условия, предложенные в работе [3]. В результате первичного фракционирования полученной смеси фрагментов на сефадексе G-75 было получено пять фракций (рис. 6). Определение дансилым методом N-концевых аминокислотных остатков показало, что ни одна из объединенных фракций не содержит индивидуального компонента (табл. 5). С помощью диск-электрофореза в полиакриламидном геле во фракции I было обнаружено наличие негидролизованного белка. Для его отделения была использована хроматография на биогеле P-100, в результате которой был выделен в гомогенном состоянии фрагмент I-2.

Анализ фракции II методом диск-электрофореза не позволил определить числа пептидов, входящих в ее состав, так как при этом получена одна, но диффузная полоса. Попытки разделить эту фракцию с помощью ионообменной хроматографии и гель-фильтрации не удалось. Наличие во фракции II в качестве N-концевой аминокислоты наряду с пролином остатка глицина свидетельствовало о протекании некоторых неспецифических процессов гидролиза. Для выяснения состава фракции II была проанализирована с помощью автоматической деградации. В результате было найдено, что эта фракция является смесью трех компонентов, имеющих следующие N-концевые последовательности:



Отнесение идентифицированных аминокислотных остатков к одному из трех фрагментов было сделано на основании имевшихся структурных данных. Так, N-концевая последовательность фрагментов II-2 и II-3 совпадала с последовательностью двух участков пептида ограниченного триптического гидролиза R_5 . N-Концевая последовательность фрагмента II-1 оказалась идентичной структуре N-концевой части пептида I-2, выделенного из первой фракции гидролизата (см. ниже), однако по молекулярному весу эти пептиды отличались друг от друга. Образование всех трех фрагментов было обусловлено частичным разрывом двух связей аспарагиновая кислота — глицин в пептиде R_5 , входящем в состав фрагмента I-2.

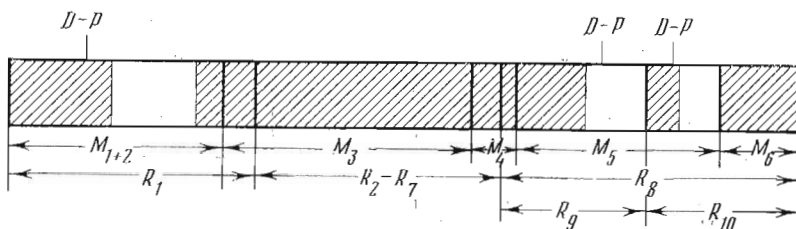


Рис. 5. Расположение связей Asp-Pro (D-P) в цепи LIV-белка. Затрихованы участки молекулы с установленной структурой. M_{1+2} - M_6 - бромциановые пептиды LIV-белка [1], R - см. подпись к рис. 4

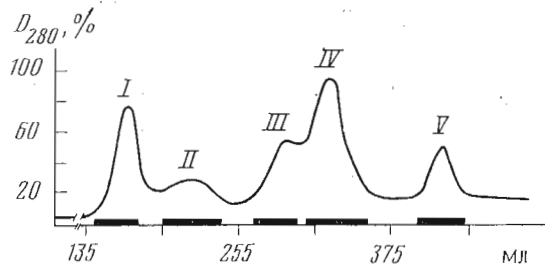


Рис. 6. Хроматография смеси пептидов ограниченного кислотного гидролиза LIV-белка на колонке ($2,5 \times 100$ см) с сефадексом G-75 в 10% уксусной кислоте

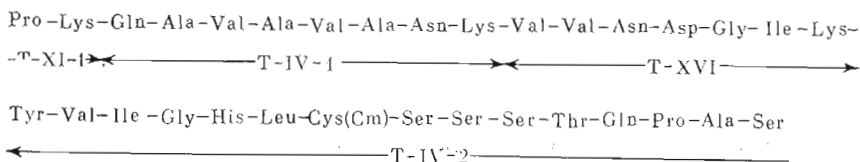
Фракции III и IV состояли из смеси двух компонентов, причем фракция III была обогащена пептидом, содержащим глутаминовую кислоту в качестве N-концевого остатка, а во фракции IV преобладал пептид, начинающийся с остатка пролина. Индивидуальные пептиды (III-1 и IV-2) были выделены после рехроматографии фракций III и IV на сефадексе G-75 в приведенных выше условиях. По данным аминокислотного анализа (табл. 6), оба пептида имеют близкие молекулярные веса. Несмотря на это, их удалось удовлетворительно разделить с помощью гель-хроматографии, по-видимому, за счет разного содержания в них остатков триптофана.

В процессе концентрирования фракции V основной ее компонент выпал в осадок, отделенный центрифугированием. Супернатант в дальнейшем не исследовался, так как содержал небольшие количества неспецифических пептидов, не представлявших интереса в плане структурных исследований белка.

Аминокислотный состав всех выделенных в индивидуальном состоянии пептидов этого типа гидролиза приведен в табл. 6.

Пептид III-1. N-Концевая последовательность пептида III-1 (Glu-Asp-Phe-Lys-Val-) и данные аминокислотного состава свидетельствуют о том, что он является N-концевым фрагментом (1-54) молекулы белка (D-P-1)*. Полное строение пептида D-P-1 известно из данных, полученных при анализе автоматическим методом N-концевой последовательности белка [1].

Пептид I-2. Автоматической деградацией фрагмента I-2 было идентифицировано 32 аминокислотных остатка:



* Обозначение пептидов кислотного гидролиза белка в соответствии с порядком их расположения в цепи.

Таблица 5

N-Концевые аминокислоты фракций I-V (рис. 6)

Фракции	N-Концевой остаток	Фракции	N-Концевой остаток
I	Pro, Glu	IV	Pro, Glu
II	Gly, Pro	V	Pro, Gly, Ala
III	Glu, Pro		

Таблица 6

Аминокислотный состав пептидов ограниченного кислотного гидролиза CM-LIV-белка

Аминокислота	I-2	III-1	IV-2	V
Cys (Cm)	0,71 (1)	0,63 (1)		
Asp	22,33 (22)	8,15 (8)	7,15 (7)	2,90 (3)
Thr	10,76 (11)	1,20 (1)	3,75 (4)	1,84 (2)
Ser	8,65 (9)	1,04 (1)	1,15 (1)	2,91 (3)
Glu	24,00 (24)	7,16 (7)	3,09 (3)	3,12 (3)
Pro	10,94 (11)	0,92 (1)	2,12 (2)	1,03 (1)
Gly	20,47 (20)	7,39 (7)	5,31 (5)	2,26 (2)
Ala	25,21 (25)	8,41 (8)	6,23 (6)	4,07 (4)
Val *	17,16 (17)	5,87 (6)	2,94 (3)	0,69 (1)
Met	2,62 (3)	0,55 (1)	0,64 (1)	
Ile *	14,84 (15)	3,78 (4)	1,10 (1)	
Leu *	15,69 (16)	1,11 (1)	2,96 (3)	3,08 (3)
Tyr	8,63 (9)	1,63 (2)	0,59 (1)	0,80 (1)
Phe	4,80 (5)	0,94 (1)	2,77 (3)	0,99 (1)
His	2,73 (3)		0,81 (1)	
Lys	18,66 (19)	5,09 (5)	4,88 (5)	
Arg	7,00 (7)			
Trp **			1,63 (2)	0,75 (1)
Число остатков	217	54	48	25
N-Концевая аминокислота	Pro	Glu	Pro	Pro
Выход, %	31	44	38	53

* Результаты 120-часового гидролиза.

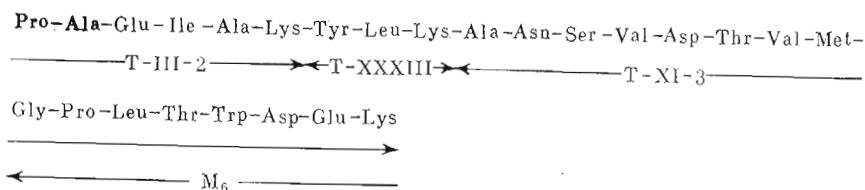
** Определяли после гидролиза метансульфоной кислотой.

При этом была получена информация о соединении последовательно триптических пептидов T-XI-1, T-IV-1, T-XVI и T-IV-2. Одновременно было выяснено, что пептид I-2 занимает второе положение в цепи белка (D-P-2), поскольку части триптического пептида T-XI-1 (гидролиз по связи Asp-Pro) являются соответственно C- и N-концевыми в пептидах D-P-1 и D-P-2.

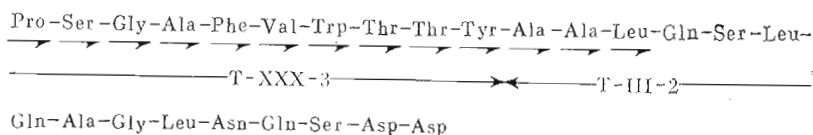
Полученные результаты в совокупности с данными по строению триптического пептида T-IV-2 позволяют удлинить известную N-концевую последовательность белка до 109 остатков и, таким образом, полностью завершить реконструкцию структуры пептида избирательного триптического гидролиза R₁ и бромцианового фрагмента M₁₊₂ [1].

Пептид IV-2. Смесь карбоксипептидаз А и В при pH 8,3 отщепляет с C-конца пептида только остаток лизина. Таким образом, пептид IV-2 занимает C-концевое положение в молекуле белка (D-P-4). Автоматической деградацией пептида D-P-4 идентифицировано 25 аминокислотных остатков, установлено соединение триптических пептидов T-III-2, T-XXXIII и T-XI-3 и найдено перекрытие с бромциановым фрагментом M₆, структура

которого определена ранее [2].



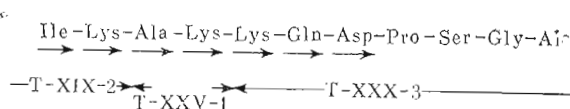
Пептид V. Деградацией по методу Эдмана определена последовательность 13 аминокислот и найдено перекрытие между триптических пептидами T-XXX-3 и T-III-2. Аминокислотный состав пептида V находится в хорошем соответствии с установленной структурой.



Полученные данные позволяют локализовать положение в пептидной цепи фрагмента V (D-P-3). При установлении строения пептида D-P-3 было выяснено, что образование при исчерпывающем триптическом гидролизе пептида T-XXX-3, не содержащего остатка основной аминокислоты, обусловлено неспецифическим разрывом связи Tyr-Ala в молекуле белка. Практически полным гидролизом этой связи объясняется и образование в триптическом гидролизате белка по остаткам аргинина пептидов R₉ и R₁₀.

Результаты исследования структуры бромциановых пептидов и пептидов избирательного триптического и ограниченного кислотного гидролизатов LIV-белка привели к объединению в полипептидную цепь триптических пептидов N-концевой последовательности белка (положения 1-266) и C-концевого участка, включающего 76 аминокислотных остатков. Не было лишь установлено перекрытие между триптическими пептидами T-XIX-2 и T-XXX-3, входящими в состав бромцианового фрагмента M₅, и не было локализовано положение в молекуле белка одного триптического пептида — T-XXV-1 (Ala-Lys).

Для выяснения строения этого участка цепи белка бромциановый пептид M₅ был подвергнут термолитическому гидролизу с целенаправленным поиском искомого фрагмента (N-концевая аминокислота — изолейцин). Первоначальное деление гидролизата осуществлялось хроматографией на сефадексе G-15 в 5% уксусной кислоте, при этом было получено 5 фракций. Из фракции II с очисткой электрофорезом на бумаге при pH 6,4 был выделен пептид со следующим аминокислотным составом: Asp 1,23(1), Ser 0,85(1), Glu 0,94(1), Pro 1,12(1), Gly 1,15(1), Ala 1,83(2), Ile 1,15(1), Lys 2,74(3). Деградацией по методу Эдмана было идентифицировано 7 аминокислот N-концевой последовательности пептида и найдены перекрытия триптических пептидов T-XIX-2, T-XXV-1 и T-XXX-3.



Таким образом, было завершено определение аминокислотной последовательности бромцианового пептида M₅ и установление полной первичной структуры LIV-белка [4, 5].

III. Определение дисульфидного моста в молекуле LIV-белка

Молекула LIV-белка содержит два остатка цистеина (положения 53 и 78). Прямым титрованием реактивом Элмана нативного и денатурированного белка не было обнаружено свободных SH-групп. Наличие дисульфидного мостика в молекуле белка доказано нами двумя независимыми методами.

В первом из них ограниченному кислотному гидролизу по связям Asp—Pro в приведенных выше условиях был подвергнут образец нативного белка. Хроматографией на биогеле P-100 в 8% муравьиной кислоте гидролизат был разделен на 5 фракций (см. рис. 5). Фракция II содержала компонент с двумя N-концевыми аминокислотами — глутаминовая кислота и пролин. После восстановления и карбоксиметилирования из этой фракции рехроматографией в тех же условиях были выделены два фрагмента. Как показали результаты аминокислотного анализа и определения частичной N-концевой последовательности, один из этих фрагментов оказался идентичным пептиду D-P-1, а второй — D-P-2. Отсутствие во фракции IV (см. рис. 5) N-концевого фрагмента белка также свидетельствовало о том, что пептиды D-P-1 и D-P-2 связаны дисульфидным мостиком.

Во втором методе была использована ковалентная хроматография нативного и предварительно восстановленного образцов белка на активированной тиол-сефарозе [6]. Имобилизация белка с освобождением эквивалентного количества 2-тиопиридона наблюдалась только в том случае, когда образец белка предварительно инкубировался с меркаптоэтанолом.

На основании этих данных было сделано заключение о соединении остатков цистеина в молекуле LIV-белка дисульфидным мостиком.

Экспериментальная часть

В работе использовали трипсин, химотрипсин, карбоксипептидазы А и В (Worthington, США), термолизин (Serva, ФРГ).

Малеилирование CM-LIV-белка. CM-белок (3 мкмоль) растворяли в 10 мл 0,1 М К-фосфатного буфера, pH 8,5, содержащего 8 М мочевины, и переносили в термостатированную ячейку, снабженную магнитной мешалкой. При температуре 2°С и энергичном перемешивании к раствору небольшими порциями добавляли малеиновый ангидрид (0,44 г — 50-кратный избыток по отношению к свободным аминогруппам). Очередную порцию ангидрида вводили после полного растворения предыдущей, поддерживая pH среды 8,5—9 добавлением 5 н. NaOH с помощью автотитратора. После окончания реакции модифицированный белок обессоливали на сефадексе G-50 в водном растворе аммиака, pH 8,5, и лиофилизовали.

Триптический гидролиз CM-M-белка. Модифицированный белок растворяли в 12 мл 0,1 М NH₄HCO₃, pH 8,35, помещали в термостатируемую ячейку автотитратора и добавляли порцию трипсина (1:200). Гидролиз вели в атмосфере аргона при 37°С, при тщательном перемешивании, поддерживая pH среды с помощью 12,5% раствора аммиака. Через 2 ч после начала опыта добавляли вторую порцию трипсина до соотношения фермент — субстрат 1:100. После 4 ч гидролизат лиофилизовали.

Первичное разделение триптического гидролизата проводили гель-хроматографией на колонке (2,5×100 см) и биогелем P-10 (100—200 меш), предварительно уравновешенным 0,05 М аммоний-бикарбонатным буфером, pH 8,3, при скорости элюирования 15 мл/ч. Контроль за выходом пептидов вели с помощью ультрафиолетового детектора Uvicord II (LKB, Швеция) при 280 нм. Фракции объединяли согласно спектрофотометрическим данным и лиофилизовали.

Разделение пептидов фракции I триптического гидролизата. Смесь пептидов фракции I растворяли в 10 мл 0,01 М трис-HCl-буфера, pH 8,0,

в 8 М мочевины и с помощью перистальтического насоса наносили на колонку (2,5×7,0 см) с целлюлозой DE-32, предварительно уравновешенной этим же буфером. Колонку промывали 50 мл стартового буфера, а затем пептиды элюировали градиентом концентрации NaCl (0,0–0,4 М). Градиент создавали с помощью градиентного смесителя Ultrograd (ЛКВ, Швеция). Детекцию пептидов осуществляли при 280 нм. Объединенные фракции обессоливали на колонке с сефадексом G-25 в водном растворе аммиака, pH 8,5, и лиофилизовали.

Очистка пептидов фракции II триптического гидролизата. Пептиды фракции II растворяли в 2,5 мл 0,05 М бикарбонат-аммонийного буфера, pH 8,3, содержащего 8 М мочевины, и наносили на колонку (2,5×100 см) с биогелем P-30 (100–200 меш), уравновешенную этим же буфером. Элюирование пептидов вели со скоростью 15 мл/ч с детекцией при 280 нм.

Демалеилирование пептидов проводили в 0,2 М пиридин-ацетатном буфере, pH 3,5, содержащем 6 М мочевины, в течение 72 ч при 20° С. Затем растворы подщелачивали 25% раствором аммиака до pH 8,5 и обессоливали на колонке (2,5×40 см) с сефадексом G-25. Контроль за выходом пептидов с колонки вели при помощи ультрафиолетового детектора Uvicord III (ЛКВ, Швеция) при 206 и 280 нм. Растворы пептидов лиофилизовали.

Для разделения на индивидуальные компоненты фракций III и VI использована хроматография на бумаге в системе: пиридин — *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 10 : 15 : 3 : 12 (А). Степень чистоты пептидов контролировали хроматографией на пластинках с тонким слоем целлюлозы в системе А.

Химотриптический гидролиз бромцианового пептида M₃ (1 мкмоль) проводили в 0,1 М аммоний-бикарбонатном буфере, pH 9,1, при 37° С в течение 4 ч при конечном отношении фермент — субстрат 1 : 50.

Фракционирование химотриптического гидролизата осуществляли на колонке высокого давления (0,6×100 см, ЛКВ, Швеция) с катионообменной смолой аминекс AG 50W×4 (200–400 меш). Смесь пептидов растворяли в 3 мл 0,2 М пиридин-ацетатного буфера, pH 3,1 (стартовый буфер), и наносили на колонку под давлением азота 1,5–2 атм. Для разделения пептидов использовали градиент концентрации и pH пиридин-ацетатных буферов при скорости элюирования 35 мл/ч. Первоначально через колонку пропускали при 35° С 70 мл стартового буфера. Градиент I получали пропуская через смеситель, содержащий 150 мл стартового буфера, 500 мл 0,5 М пиридин-ацетатного буфера, pH 5,0. Затем температуру в рубашке колонки повышали до 50° С и в смеситель пачинали подавать 2,0 М пиридин-ацетатный буфер, pH 5,0 (градиент II). Этим градиентом элюировали в течение 16 ч (500 мл), потом смеситель отсоединяли и колонку промывали 70 мл 8% аммиака. Фракции объемом 2,5 мл собирали с помощью автоматического коллектора.

Для обнаружения пептидов из каждой второй фракции отбирали по 0,04 мл и анализировали по нингидриной реакции на автоматическом анализаторе (Technicon, США). Объединенные фракции упаривали до объема 1–1,5 мл. Аргининсодержащие пептиды идентифицировали с помощью реактива Сакагучи при хроматографировании полученных фракций на пластинках с тонким слоем целлюлозы в системе А. В этой же системе было проведено препаративное разделение на бумаге фракций XII, XIV и XVI.

Гидролиз SM-LIV-белка по связям аспарагиновая кислота—пролин. SM-белок (1 мкмоль) растворяли в 3 мл 10% пиридин-ацетатного буфера, pH 2,5, содержащего 7 М хлоргидрат гуанидина, и инкубировали 96 ч в вакуумированной ампуле при 40° С.

Разделение кислотного гидролизата проводили гель-хроматографией на колонке (2,5×100 см) с сефадексом G-75 (сверхтонкий) в 10% уксусной кислоте при скорости элюирования 15 мл/ч. Контроль осуществляли с по-

мощью ультрафиолетового детектора при 280 нм. Объединенные фракции упаривали до объема 2–3 мл и хранили в замороженном состоянии.

Раствор пептидов фракции I наносили на колонку (1,5×100 см) с биоге-лем Р-100 (100–200 меш), уравновешенную 8,5% муравьиной кислотой. Элюирование пептидов вели со скоростью 6,6 мл/ч с детекцией при 280 нм. Полученные фракции разбавляли 10-кратным объемом воды и лиофилизовали.

Термолитический гидролиз бромцианового пептида M₅. 0,2 мкмоль пептида M₅ растворяли в 1,5 мл 0,1 М бикарбонат-аммонийного буфера, рН 8,3, добавляли термолизин (2% по весу) и выдерживали при 37° С в течение 4 ч. Гидролиз упаривали досуха, затем растворяли в 0,2% уксусной кислоте и наносили на колонку (1×100 см) с сефадексом G-25 (сверхтонкий). Элюирование пептидов вели уксусной кислотой той же концентрации со скоростью 6 мл/ч с УФ-контролем при 206 и 280 нм. Объединенные фракции лиофилизовали.

Ковалентная хроматография белка на тиол-сефарозе. В опыте были использованы две порции нативного LIV-белка по 0,1 мкмоль каждая. Одну порцию белка растворяли в 1 мл насыщенного аргоном 0,01 М трис-НСI-буфера, рН 8,3, содержащего 7 М хлоргидрат гуанидина и 10⁻³ М EDTA, а другую – в том же буфере с добавкой 2-меркаптоэтанола (0,001 моль). Обе пробы инкубировали при 20° С в течение 6 ч. Освобо-дились от меркаптоэтанола с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-25. При нанесении на колонку (2,5×3 см) с активированной тиол-сефарозой 4В (Pharmacia, Швеция) практически количественная иммобилизация на-блюдалась только в случае предварительно восстановленного образца бел-ка. О степени связывания белка судили по выходу 2-тиопиридона [6].

Определение N-концевых аминокислот и N-концевой последователь-ности пептидов методом Эдмана и C-концевой последовательности с по-мощью карбоксипептидаз, а также очистку пептидов методами хромато-графии и электрофореза на бумаге проводили как описано в сообще-нии [2].

Автоматическую деградацию пептидов и последующую идентифика-цию фенилтиогидантоинов осуществляли как описано в сообщении [4].

Аминокислотный состав пептидов определяли на аминокислотном ана-лизаторе D-500 (Durrum, США) (см. [2]).

Авторы приносят глубокую благодарность акад. Ю. А. Овчинникову за ценные советы и помощь при выполнении данной работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гринкевич В. А., Арзамазова Н. М., Гринкевич Х. А., Акименко З. А., Мороз И. Н., Назимов И. В., Алданова Н. А. (1979) Биоорган. химия, 5, 1775–1781.
2. Гринкевич В. А., Арзамазова Н. М., Потапенко Н. А., Гринкевич Х. А., Кравчел-ко З. Б., Фейгина М. Ю., Алданова Н. А. (1979) Биоорган. химия, 5, 1757–1774.
3. Fraser K. J., Poulsen K., Haber R. (1972) Biochemistry, 11, 4974–4977.
4. Овчинников Ю. А., Алданова Н. А., Гринкевич В. А., Арзамазова Н. М., Мороз И. Н., Назимов И. В. (1977) Биоорган. химия, 3, 564–567.
5. Ovchinnikov Yu. A., Aldanova N. A., Grinkevich V. A., Arzamazova N. M., Moroz I. N. (1977) FEBS Lett., 78, 313–316.
6. Brocklehurst K., Carlsson J., Kiersten M. P. J., Crook E. M. (1973) Biochem. J., 133, 573–584.

Поступила в редакцию
22.V.1979

THE PRIMARY STRUCTURE OF LIV-BINDING PROTEIN FROM *E. coli*.
III. THE PEPTIDES OF RESTRICTED TRYPTIC AND LIMITED ACIDIC
HYDROLYSES. DETERMINATION OF A DISULFIDE BRIDGE IN THE
PROTEIN MOLECULE

MOROZ I. N., GRINKEVICH V. A., ARZAMAZOVA N. M., POTAPENKO N. A.,
AKIMENKO Z. A., NAZIMOV I. V., ALDANOVA N. A.

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

Tryptic hydrolysis of carboxymethylated, maleylated Leu, Ile, Val (LIV)-binding protein from *E. coli* was performed. By means of gel-filtration, DEAE-chromatography and paper chromatography, 8 individual peptides were isolated. The complete structures of six peptides and partial amino acid sequences of two peptides were determined. Acidic hydrolysis at Asp-Pro bonds resulted in 4 fragments, which were resolved by gel-filtration and DEAE-chromatography. The structural analysis of the obtained peptides allowed to complete the reconstruction of the polypeptide chain of the protein. The presence of a disulfide bridge in the LIV-protein was established by two different methods.
