



УДК 577.155.32.04

ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ *L*-АСПАРАГИНАЗЫ *E. COLI*

II *. ТРИНИТРОФЕНИЛИРОВАНИЕ

Виндука Л. Я., Шпрунка И. К., Бендерс Ю. А.,
Жагат Р. А.

Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига

Методом тринитрофенилирования установлено, что из 24 аминогрупп лизина на субъединицу *L*-аспарагиназы (КФ 3.5.1.1) *E. coli* ATCC 9637 модификации, включая условия денатурации, подвергается около 22 групп. По реакционной способности ϵ -NH₂-группы лизина разделяются на три типа, для каждого из которых рассчитаны константы скорости реакции k_i (М⁻¹мин⁻¹) и соответствующие им числа модифицированных аминогрупп n_i : k_1 166, n_1 3,0; k_2 29,6, n_2 1,8; k_3 6,5, n_3 13,5, при суммарном параметре n_i 18,3. Субстрат и ингибитор (N-Cbz-S-бензилцистеин) не защищают от инактивации тринитрофенилированием. Следовательно, NH₂-группы в формировании активного центра *L*-аспарагиназы непосредственно не участвуют.

L-Аспарагиназа неоднократно подвергалась химической модификации по ϵ -NH₂-группам лизина различными агентами [2–9], но у исследователей до сих пор нет единого мнения о роли этих функциональных групп в структурно-функциональной организации данного фермента.

Цель данной работы — выяснение реакционной способности отдельных ϵ -NH₂-групп лизина этого фермента и установление в связи с этим пределов применения метода определения свободных NH₂-групп тринитрофенилированием.

Непосредственное спектрофотометрическое изучение реакции тринитрофенилирования белков возможно исключительно в изобестической точке спектра Tnf-белков, т. е. при 367 нм [10]. Изучая кинетику тринитрофенилирования *L*-аспарагиназы, мы установили, что характер зависимости времени полуреакции от концентрации фермента в нашем случае подчиняется псевдопервому порядку [11], а скорость этой реакции зависит от температуры и рН среды (рис. 1) и от абсолютных значений концентрации белка и ТНБС (рис. 2).

На основании экспериментальной кинетической кривой реакции тринитрофенилирования *L*-аспарагиназы (рис. 3) по методике А. Р. Гольдфарба [11, 12] мы рассчитали кинетические кривые реакций отдельных типов аминогрупп белка, определили константы скорости k_i , характеризующие парциальную реакционную способность этих типов аминогрупп, число аминогрупп (n_i), соответствующее каждому типу, а также общее число модифицированных аминогрупп (n_i) фермента.

Из данных табл. 1 следует, что наивысшей реакционной способностью обладают 3 NH₂-группы на субъединицу данного белка. Удельный вес

* Сообщение I см. [1]. Сокращения: Tnf — тринитрофенил; ТНБС — 2,4,6-тринитробензилсульфокислота.

Таблица 1

Реакционная способность отдельных типов аминогрупп одной субъединицы *L*-аспарагиназы с ТНБС
[E] 3 мкМ, [ТНБС] 0,8 мМ, 37° С, рН 9,0

Тип i	k_i , M ⁻¹ мин ⁻¹	n_i
1	166	3,0
2	29,6	1,8
3	6,5	13,5
		$n_i=18,3$

Таблица 2

Влияние субстратно-ингибиторной защиты на реакцию *L*-аспарагиназы с ТНБС
37° С, рН 9; 2,5 мин, [E] 0,79 мкМ,
[ТНБС] 7,5 мМ, [I] и [Asn] 0,75 мМ

Субстрат или ингибитор	Глубина модификации, моль ТНБС/ /субъед.	Уд. акт., МФ/мг белка
—	3,8	76
Asn	5,0	75,6
Cbz-Cys (Bzl)	6,4	67,9

отдельных типов реакционноспособных аминогрупп, а также общее число доступных для ТНБС аминогрупп белка зависят от конкретных условий реакции. Предельная глубина тринитрофенилирования нами достигалась через 24 ч (рН 9,0; 37° С) или в условиях денатурации 6 М мочевиной.

Аминокислотный анализ предельно тринитрофенилированной аспарагиназы показал, что 2 лизиновых остатка из 24 на субъединицу и N-концевой лейцин остаются немодифицированными (найдепо для нативной *L*-аспарагиназы: лизин — 23,7; лейцин — 23,1; для Tnf-аспарагиназы: лизин — 1,7; лейцин — 22,7). Расчет предельной глубины модификации по кривым кинетики реакции дает общее число реакционноспособных NH₂-групп в пределах 16—21 в зависимости от концентрационных соотношений белка и ТНБС. Наши результаты согласуются с данными японских исследователей [8], показавших, что в условиях щелочной денатурации *L*-аспарагиназы *E. coli* штамм НАР монохлортрифтор-*n*-хивону недоступны 2—4 NH₂-группы лизина.

Литературные данные о зависимости каталитической активности *L*-аспарагиназы от глубины модификации ее NH₂-групп противоречивы. По данным Нишимура и сотр. [8], для оптимального действия фермента существенна одна NH₂-группа на субъединицу, вследствие модификации которой теряется 40% активности фермента, а модификация 2—3 остатков ведет к полной потере активности. В результате тринитрофенилирования 1,7 NH₂-групп Паррот и Шифрин [13] наблюдали потерю 60% каталитической активности *L*-аспарагиназы, которая достигает 88% инактивации после модификации 5 лизиновых остатков. Харе и Хандшумахер [6] ацетамидином модифицировали 17 остатков лизина. При этом сохранился 81% гидролазной активности, однако малеилирование лишь 1 остатка понизило активность до 69%. Важно отметить, что глубину модификации названные авторы определили методом тринитрофенилирования.

В наших опытах (рис. 4) тринитрофенилирование 2—3 NH₂-групп фермента привело к потере 26% активности, модификация 8 NH₂-групп повлекла за собой потерю 68% каталитической активности, но при модификации даже 21 NH₂-группы сохраняется 2% остаточной активности. Эта же реакция в условиях денатурации 6 М мочевиной в течение 4 мин приводила к модификации 11 NH₂-групп (рис. 5) и сопровождалась полной потерей активности, не восстанавливаемой после удаления денатуранта. В отсутствие модификатора денатурация мочевиной обратима [14, 15]. Можно предполагать, что в денатурирующих условиях быстрая модификация *L*-аспарагиназы, сопровождающаяся резкой инактивацией фермента, происходит с раскрытием для доступа ТНБС закрытых в обычных условиях модификации NH₂-групп, возможно, принимающих участие в организации межсубъединичной связи.

Опыты по тринитрофенилированию *L*-аспарагиназы в условиях защиты активного центра фермента субстратом или конкурентным ингибитором (табл. 2) подтверждают предположение о том, что NH₂-группы не-

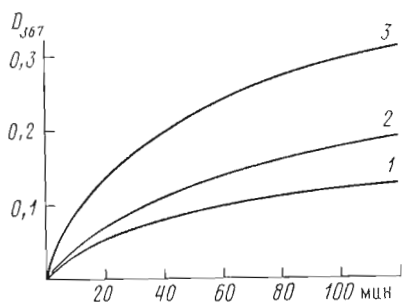


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость скорости реакции тринитрофенилирования *L*-аспарагиназы от температуры и pH среды: 1 — 22° С, pH 9; 2 — 37° С, pH 8; 3 — 37° С, pH 9; [E] 3 мкМ, [ТНБС] 0,76 мМ

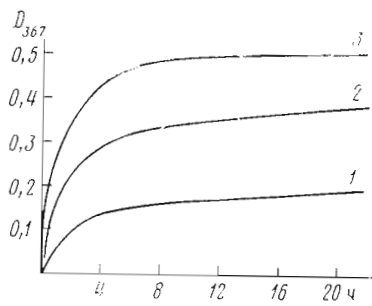


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость скорости реакции тринитрофенилирования *L*-аспарагиназы от концентрации компонентов реакции: [E] 1,5 (1), 3 (2), 3 (3) мкМ; [ТНБС] 0,8 (1), 0,8 (2), 1,6 мМ (3); 37° С, pH 9

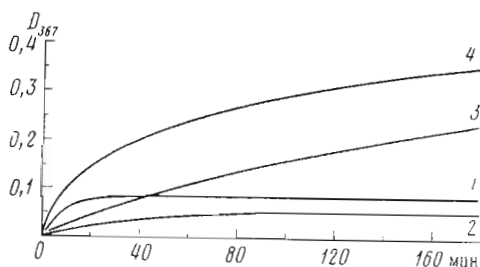


Рис. 3. Рассчитанные кривые скорости тринитрофенилирования трех разных типов ϵ -NH₂-групп лизина *L*-аспарагиназы с константами скорости k_1 166 (1), k_2 29,6 (2) и k_3 6,5 М⁻¹·мин⁻¹ (3) и экспериментальная кривая (4) суммарной реакции тринитрофенилирования фермента (37° С, pH 9; [E] 3 мкМ, [ТНБС] 0,76 мМ)

посредственно не участвуют в формировании активного центра данного фермента, а их вклад в сохранение оптимальной каталитической активности опосредован поддержкой определенной пространственной организации этого субъединичного белка. Эти выводы хорошо согласуются с данными о том, что модификация более 1,7 NH₂-групп на субъединицу ускоряет диссоциацию тетрамерного фермента [13], и с предположением об изменении структурной организации белка вследствие взаимодействия модификатора с гидрофобными областями фермента [10]. Вышеизложенное следует учитывать в том случае, если тринитрофенилирование применяется для определения глубины модификации, так как реакция предварительно модифицированного фермента с ТНБС может протекать иначе, чем реакция нативного белка: с иной кинетикой и конечной глубиной модификации.

Возрастание глубины тринитрофенилирования в условиях функционирования активного центра, сопровождающееся незначительным дополнительным падением каталитической активности (табл. 2), вероятно, объясняется пространственной перестройкой белка в процессе связывания субстрата или ингибитора, облегчающей доступ к NH₂-группам, несущественным для каталитической функции.

Экспериментальная часть

В опытах использовали фермент *L*-аспарагиназу (КФ 3.5.1.1) отечественного производства с уд. акт. 180 МЕ/мг белка. N^α-Cbz-N^ε-Tnf-лизин синтезирован в лаборатории химии пептидов ИОС АН ЛатвССР.

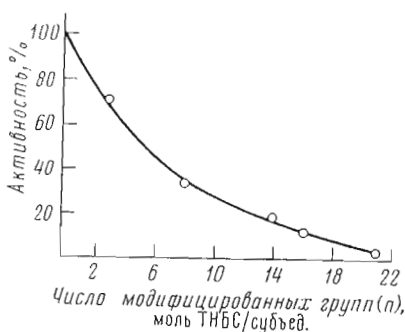


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость каталитической активности *L*-аспарагиназы от глубины тринитрофенилирования (37° С, рН 9; [Е] 0,75 мкМ, [ТНБС] 3 мМ)

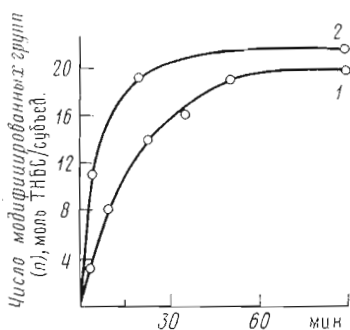


Рис. 5

Рис. 5. Зависимость глубины тринитрофенилирования в боратном буфере (37° С, рН 9) от времени реакции в отсутствие (1) и в присутствии 6 М мочевины (2) ([Е] 0,75 мкМ, [ТНБС] 3 мМ)

Гидролазную активность *L*-аспарагиназы и ее Tnf-производных определяли прямой несслеризацией по ранее предложенной нами методике [16]. Модифицированные образцы перед определением гидролазной активности подвергали гель-фильтрации для устранения избытка ТНБС.

Концентрацию белка определяли методом Лоури [17] или спектрофотометрически на приборе Specord UV VIS (ГДР) с использованием коэффициента поглощения для аспарагиназы $E_{278}^{0,1} = 0,72 \pm 0,02$ [14].

Молярный коэффициент экстинкции N^ϵ -Tnf-лизина (ϵ_{367}) для конкретных значений рН инкубации найден по поглощению в этих условиях N^ϵ -Cbz- N^ϵ -Tnf-лизина в 0,1 М Na-боратном буфере, рН 9, и имеет значение ϵ_{367} 9600.

При кинетических исследованиях тринитрофенилирования *L*-аспарагиназы в кювете спектрофотометра Pye Unicam SP-1800 (Англия), содержащей 2,2 мл буфера (0,1 М фосфатного, рН 8; 0,1 М боратного, рН 9), добавляли 0,1 мл раствора *L*-аспарагиназы в данном буфере, чтобы конечная концентрация составляла 1,5–3,6 мкМ, и 0,1 мл ТНБС до конечной концентрации 0,8–1,6 мМ. Все компоненты перед смешиванием термостатировали при температуре проводимой реакции. В кювете сравнения вместо раствора фермента использовали данный буфер.

Для препаративных опытов по тринитрофенилированию *L*-аспарагиназы 5 мл белка (0,75 мкМ) растворяли в 0,1 М боратном буфере, рН 9,0, и инкубировали с 0,1 мл (3 мМ) водного раствора ТНБС при 37° С. В определенные промежутки времени (3 мин–24 ч) отбирали пробы по 0,3 мл и наносили на колонку сефадекса G-25 (элюировали 0,05 М Na-фосфатным буфером, рН 8,0, на колонке размером 1×30 см, скорость элюции 1 мл/мин). Белковый пик использовали для аминокислотного анализа, предварительно определив содержание белка и гидролазную активность.

Аминокислотный состав устанавливали по общепринятой методике [18] в ускоренном варианте на аминокислотном анализаторе 6020 А (ЧССР).

Опыты по изучению тринитрофенилирования в денатурирующих условиях отличались тем, что в белковый раствор одновременно добавляли концентрированные растворы ТНБС и мочевины в буфере в таких концентрациях, чтобы конечная концентрация мочевины достигала 6 М, а конечные концентрации белка и ТНБС соответствовали концентрациям в предыдущем опыте.

В опытах по изучению субстратно-ингибиторной защиты 2 мл *L*-аспарагиназы ([Е] 0,79 мкМ) в 0,1 М Na-боратном буфере, рН 9,0, инкубиро-

вали при 37° в течение 2,5 мин с 0,1 мл раствора ТНБС ([ТНБС] 7,5 мМ) в присутствии N-Cbz-S-бензилцистеина ([I] 0,75 мМ) или L-аспарагина ([Asn], 0,75 мМ).

Авторы благодарят д-ра хим. н. С. М. Аваеву (МГУ) за ценные советы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Блума Р. К., Вина И. А., Кирстукас И. П., Милман И. А., Гейман И. И., Жагат Р. А. (1978) Биоорг. химия, 4, 1264–1272.
2. Wagner O., Irion E., Agens A., Bauer K. (1969) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 37, 383–392.
3. Irion E., Agens A., Rauenbusch E., Bauer K., Wagner O., Bierling R., Putter J. (1969) Англ. пат. 1 229 566 от 17.X.
4. Irion E., Agens A., Rauenbusch E., Bauer K., Wagner O., Bierling R., Putter J. (1969) Англ. пат. 1 264 896 от 5.XI.
5. Rutter D. A., Wade H. E. (1971) Brit. J. Exp. Pathol., 52, 610–614.
6. Hare L. E., Handschumacher R. E. (1973) Mol. Pharmacol., 9, 534–549.
7. Makino H., Saton H., Kuroiwa Y., Yamazaki S., Tamaura Y., Inada Y. (1975) Immunochimistry, 12, 183–185.
8. Nishimura Y., Makino H., Takenaka O., Inada Y. (1971) Biochim. et biophys. acta, 227, 171–179.
9. Shifrin S., Grochowski B. J. (1972) J. Biol. Chem., 247, 1048–1054.
10. Plapp B. V., Moore S., Stein W. H. (1971) J. Biol. Chem., 246, 939–945.
11. Golfarb A. R. (1966) Biochemistry, 5, 2570–2573.
12. Golfarb A. R. (1966) Biochemistry, 5, 2574–2578.
13. Parrot C. L., Shifrin S. (1976) Biochim. et biophys. acta, 445, 437–445.
14. Frank B. H., Pekar A. H., Veros A. J., Ho P. P. K. (1970) J. Biol. Chem., 245, 2716–2724.
15. Shifrin S., Luborsky S. W., Grochowski B. J. (1971) J. Biol. Chem., 246, 7708–7714.
16. Жагат Р. А., Шпрунка И. К., Эйдусе И. А., Вина И. А., Дайя Д. Я. (1972) Изв. АН ЛатвССР. Сер. хим., № 1, 73–76.
17. Lowry O. H., Rozenborough V. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) J. Biol. Chem., 193, 265–275.
18. Spackman D. H., Stein W. H., Moore S. (1958) Anal. Chem., 30, 1190–1194.

Поступила в редакцию
30.X.1979

После доработки
20.II.1980

CHEMICAL MODIFICATION OF L-ASPARAGINASE FROM *E. COLI*. II. TRINITROPHENYLATION

BINDUKA L. Ya., SHPRUNKA I. K., BENDERS Yu. A., ZHAGAT R. A.

Institute of Organic Synthesis, Academy of Sciences of the Latvian SSR, Riga

Out of 24 lysine residues in one subunit of *E. coli* ATCC 9637 L-asparaginase, 22 were trinitrophenylated under denaturing conditions. By their reactivity the ϵ -amino groups were divided into three classes, the number (n) of groups in each class and the reaction rate (k , $M^{-1} \text{ min}^{-1}$) being respectively 3.0 and 166; 1.8 and 29.6; 13.5 and 6.5. The sum kinetic parameter n_i is equal to 18.3. Since neither the substrate nor the inhibitor protected the enzyme against inactivation, the conclusion is drawn that NH_2 -groups are not directly implicated in the formation of the L-asparaginase active site.