



УДК 547.96.04

СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА
ЛЕЙЦИН-ИЗОЛЕЙЦИН-ВАЛИНСВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА
И ЕГО КОМПЛЕКСОВ С СУБСТРАТАМИ

*Воротынцева Т. П., Сурин А. М., Траханов С. Д.,
Набиев И. Р., Антонов В. К.*

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

Исследованы разностные УФ-спектры, спектры флуоресценции, спектры КД и комбинационного рассеяния лейцин-изолейцин-валинсвязывающего белка из *Escherichia coli* (LIV-белка), LIV-белка, освобожденного от «эндогенных» субстратов (с-LIV-белка) и комплексов этих белков с лейцином и изолейцином. Установлено, что комплексообразование сопровождается изменением спектральных параметров ароматических аминокислот белка (триптофана и тирозина). Показано, что белок имеет по крайней мере два центра связывания субстратов, различающихся по сродству к последним. В центр с высоким сродством входит один остаток триптофана и, возможно, остаток тирозина. Предложена гипотетическая модель связывания LIV-белком субстратов.

Лейцин-изолейцин-валинсвязывающий белок (LIV-белок) локализован в периплазматическом пространстве клеток *Escherichia coli* и участвует в транспорте разветвленных алифатических аминокислот через цитоплазматическую мембрану этого микроорганизма [1]. Он состоит из 344 аминокислотных остатков, соединенных в одну полипептидную цепь, и содержит один дисульфидный мостик [2]. Недавно были опубликованы первые результаты исследования LIV-белка методом рентгеноструктурного анализа [3]. Выяснены некоторые особенности его комплексообразования с субстратами [4, 5] и интенсивно проводится исследование активного центра этого белка методами химической модификации [6, 7].

До сих пор не удавалось зарегистрировать каких-либо изменений спектральных свойств LIV-белка при связывании субстратов [8], если не считать небольших изменений в спектрах КД, отмеченных на ранних стадиях его изучения [9]. Эти наблюдения давали основание предположить участие остатков ароматических аминокислот белка в связывании субстратов. Чтобы проверить это предположение, мы предприняли детальное изучение спектральных свойств LIV-белка и его комплексов с лейцином, изолейцином и валином.

Известно, что гомогенный LIV-белок содержит прочно связанные так называемые эндогенные субстраты — лейцин, изолейцин и, в меньшей степени, валин, которые можно удалить, лишь предварительно подвергнув белок обратной денатурации в растворе мочевины [10]. Можно было думать, что отсутствие заметного влияния субстратов на спектральные характеристики LIV-белка обусловлено тем, что нативный белок представляет собой комплекс с субстратами. Мы показали, что если пред-

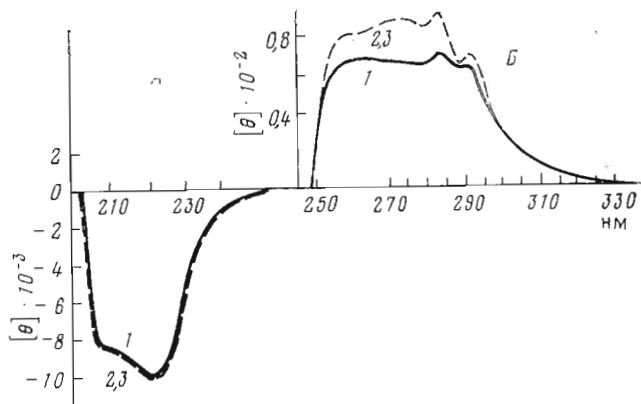


Рис. 1. Спектры КД с-LIV-белка (1) и его комплекса с лейцином или изолейцином (2, 3). Концентрация белка $1,4 \cdot 10^{-5}$ М, концентрация субстрата $1,3 \cdot 10^{-4}$ М. Толщина слоя 1 (а) и 10 мм (б)

варительно освободиться от эндогенных субстратов инкубацией белка в растворе мочевины с последующим диализом, то полученный свободный белок (с-LIV-белок) становится спектрально чувствительным к введению субстратов.

Спектры КД. Как видно из рис. 1, образование с-LIV-белком комплексов с лейцином и изолейцином совершенно не сказывается на эллиптичности коротковолновой области (200–250 нм), т. е. связывание субстратов не сопровождается заметными изменениями конформации полипептидной цепи белка. Однако эллиптичность полос ароматических хромофоров (250–330 нм) существенно возрастает. Это указывает на изменение окружения ароматических групп белка, т. е. подтверждает предположение об их участии в связывании субстрата. Следует отметить, что изменения, вызванные связыванием лейцина и изолейцина, совершенно одинаковы, т. е. обе аминокислоты вызывают одинаковое изменение окружения ароматических хромофоров.

Разностные УФ-спектры. На рис. 2 представлены разностные УФ-спектры с-LIV-белка и его комплексов с лейцином, изолейцином и валином в области 240–340 нм. Судя по форме спектра и положению основного максимума ($\lambda_{\text{макс}}$ 288 нм), главный вклад в поглощение вносят остатки тирозина белка. Характер спектральных изменений не зависит от природы субстрата. Наблюдаемые спектральные изменения можно трактовать как следствие уменьшения полярности (увеличения гидрофобности) окружения остатков тирозина [11], обусловленное связыванием субстрата белком. Сходные изменения спектров могут также наблюдаться, если фенольный гидроксил остатка тирозина становится донором водородной связи [12, 13]. Как будет показано ниже, на основании спектров комбинационного рассеяния можно заключить, что остаток тирозина если и образует водородную связь, то только как акцептор. Поэтому наблюдаемые изменения в УФ-спектрах наиболее вероятно связаны с увеличением гидрофобности окружения остатков тирозина в белке.

Спектры пертурбации растворителем. Анализ разностных спектров пертурбации с-LIV-белка 20% этиленгликолем и 20% сахарозой (рис. 3), проведенный по методу [14], показал, что из 13 остатков тирозина, входящих на молекулу LIV-белка, растворителю доступны 7 остатков с-LIV-белка, тогда как в присутствии изолейцина — только 5–6.

Оценка количества доступных пертурбанту остатков триптофана затруднена, так как максимум полосы при 290–292 нм выражен слабо (рис. 3б) или полностью отсутствует (рис. 3а). Из соотношения поглоще-

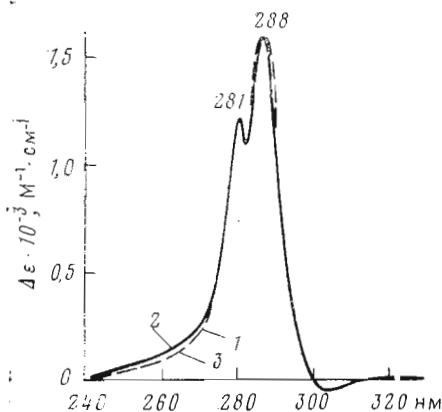


Рис. 2

Рис. 2. Разностные спектры поглощения с-LIV-белка в присутствии лейцина (1), изолейцина (2), валина (3). Концентрация белка $1,8 \cdot 10^{-5}$ М, субстрата $1,3 \cdot 10^{-4}$ М. Толщина слоя 10 мм

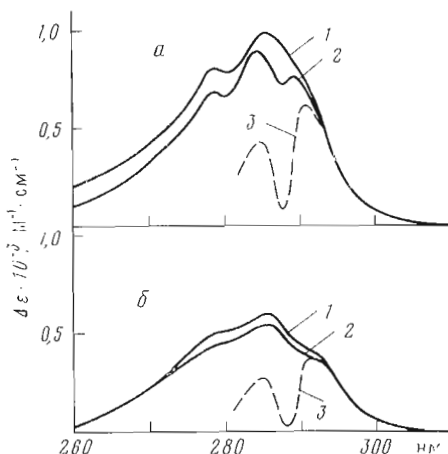


Рис. 3

Рис. 3. Разностные спектры пертурбации с-LIV-белка: а — этиленгликолем, б — раствором сахарозы, 1 — белок без субстрата, 2 — комплекс белка с изолейцином, 3 — расчетная кривая для триптофана (2 остатка на 1 моль белка). а — концентрация белка $1,19 \cdot 10^{-5}$ М, субстрата — $1,2 \cdot 10^{-4}$ М, этиленгликоля — 20% (V/V). б — концентрация белка $1,24 \cdot 10^{-5}$ М, субстрата — $1,2 \cdot 10^{-4}$ М, сахарозы 20%

ний при 286 и 291 нм следует, что в с-LIV-белке имеется 2 экспонированных остатка триптофана из общего числа 3 остатков на молекулу.

Таким образом, в молекуле с-LIV-белка доступны растворителю 7 остатков тирозина и 2 остатка триптофана. При связывании субстрата уменьшается доступность 1—2 остатков тирозина. Доступность остатков триптофана в присутствии субстрата не меняется.

Эти данные о числе доступных растворителю остатков тирозина и триптофана не согласуются с данными по химической модификации белка. Так, в с-LIV-белке удается пронитровать лишь 1—2 остатка тирозина, а модификация остатков триптофана при действии 2-окси-5-нитробензилбромидом вообще не наблюдается. Это может быть связано с таким положением доступных растворителю остатков, при котором химические реагенты, использованные для модификации, не могут реагировать с соответствующими атомами в белке.

Спектры флуоресценции. Спектры испускания остатков триптофана в LIV-белке и с-LIV-белке при довольно большой полуширине имеют весьма коротковолновое положение максимума (рис. 4). Квантовый выход с-LIV-белка при длине волны возбуждения 295 нм равен 0,17 (табл. 1). Анализ формы спектров флуоресценции позволяет заключить, что остатки триптофана в LIV-белке гетерогенны в отношении их окружения, причем основной вклад в общее излучение белка вносит остаток, находящийся в гидрофобном окружении, — по-видимому, это остаток, не доступный растворителю (см. выше). Остатки тирозина также вносят вклад в суммарное излучение с-LIV-белка, о чем свидетельствует вид спектров флуоресценции при возбуждении светом с длиной волны 277 нм (рис. 5).

Добавление субстратов (лейцина, изолейцина или валина) к относительно концентрированному ($[P]_0$ $1,6 \cdot 10^{-5}$ М) раствору с-LIV-белка приводит к появлению разностных спектров флуоресценции, вид которых зависит от длины волны возбуждения. При длине волны возбуждения 295 нм наблюдаемые спектры имеют сходную форму и положение максимума (319 ± 1 нм) и различаются в основном величиной интенсивности

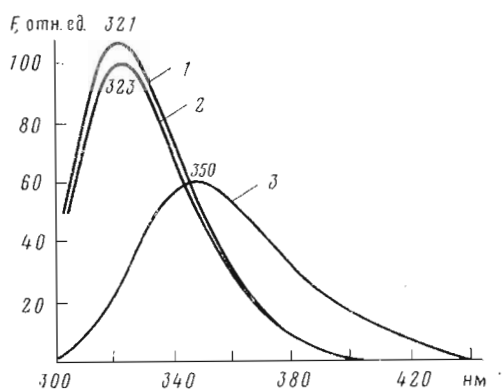


Рис. 4

Рис. 4. Спектры флуоресценции (F) нативного LIV-белка (1), с-LIV-белка (2) и триптофана (3). Концентрация нативного и с-LIV-белка $1,4 \cdot 10^{-6}$ М. Длина волны возбуждения 295 нм

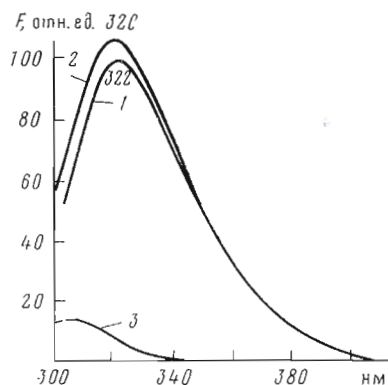


Рис. 5

Рис. 5. Спектры флуоресценции с-LIV-белка при $\lambda_{\text{возб}}$ 295 (1) и 277 нм (2). 3 — разность спектров 1 и 2. Концентрация белка $1,8 \cdot 10^{-6}$ М

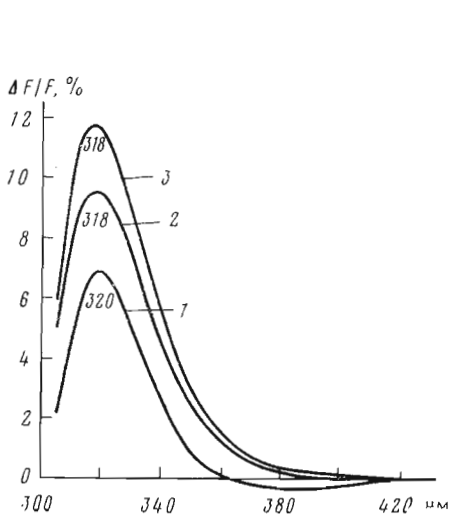


Рис. 6

Рис. 6. Разностные спектры флуоресценции с-LIV-белка и его комплексов с субстратами: лейцином (1), изолейцином (2), валином (3), $\Delta F/F, \%$ — разность интенсивностей флуоресценции комплекса и белка, отнесенная к интенсивности полосы эмиссии белка в максимуме, в %. Концентрация с-LIV-белка $1,4 \cdot 10^{-5}$ М, концентрация субстратов $1,3 \cdot 10^{-4}$ М, $\lambda_{\text{возб}}$ 295 нм

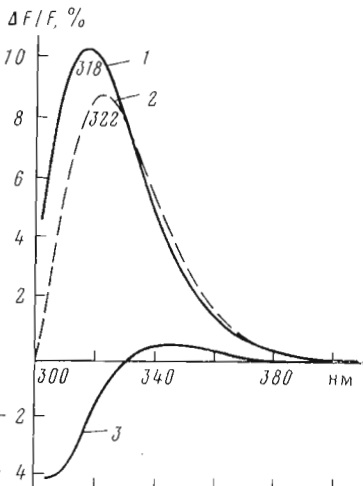


Рис. 7

Рис. 7. Разностные спектры флуоресценции с-LIV-белка и с-LIV-белка в присутствии изолейцина при $\lambda_{\text{возб}}$ 295 нм (1) и 280 нм (2), 3 — разность спектров 2 и 1. Концентрация белка $1,8 \cdot 10^{-5}$ М, концентрация изолейцина $1,3 \cdot 10^{-4}$ М

(рис. 6). Подобные изменения могут быть обусловлены коротковолновым сдвигом с одновременным возрастанием интенсивности полосы флуоресценции маскированного остатка триптофана, окружение которого становится еще более гидрофобным при связывании субстрата.

Вид разностных спектров флуоресценции несколько меняется при возбуждении 280 нм. Интенсивность в максимуме снижается, а положение максимума смещается в длинноволновую область (рис. 7). Очевидно, что эти изменения обусловлены отрицательным вкладом остатков тирозина

Т а б л и ц а 1

Параметры спектров флуоресценции с-LIV-белка и его комплекса с субстратом. Концентрация белка $1,4 \cdot 10^{-5}$ М, изолейцина $1,3 \cdot 10^{-4}$ М, $\lambda_{\text{возб}}$ 295 нм

Параметры флуоресценции	с-LIV-белок	с-LIV-белок+Пе
$\lambda_{\text{макс}}$, нм	322 ± 1	319 ± 1
$\Delta\lambda_{1/2}$, нм	47 ± 1	47 ± 1
Квантовый выход	$0,17 \pm 0,02$ *	$0,20 \pm 0,02$

* Квантовый выход при $\lambda_{\text{возб}}$ 277 нм составляет $\sim 0,01$.

Т а б л и ц а 2

Параметры связывания (константа диссоциации и кажущееся число активных центров) с-LIV-белка с субстратами. Концентрация белка $1,6 \cdot 10^{-5}$ М

Субстрат	$K_D \cdot 10^7$, М	n
Пе	0,9	0,36
Leu	2,3	0,39
Val	4,2	0,3

(рис. 7, спектр 3), флуоресценция которых тушится при связывании субстрата.

Таким образом, связывание субстратов с-LIV-белком сопровождается увеличением гидрофобности маскированного остатка триптофана. Окружение остатков тирозина также становится более гидрофобным, однако связывание субстрата приводит к тушению флуоресценции этих остатков.

В случае разбавленных растворов с-LIV-белка ($1,6 \cdot 10^{-6}$ М) образование комплекса с субстратом также сопровождается изменением спектров флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}}$ 280 * нм), однако вид разностных спектров заметно зависит от природы субстрата (рис. 8), а именно сходен для изолейцина и валина и отличается для лейцина. Это различие становится понятным при исследовании флуоресценции нативного LIV-белка, содержащего эндогенные субстраты (рис. 9). Если добавлять лейцин или изолейцин к разбавленному раствору LIV-белка ($[P]$, $1,4 \cdot 10^{-6}$ М), наблюдаются разностные спектры с экстремумом ~ 330 нм, причем знак разности спектров противоположен для лейцина и изолейцина. Такие спектральные эффекты можно объяснить изменением окружения другого (или двух других), менее гидрофобного остатка триптофана. Полученные данные позволяют предположить, что в молекуле LIV-белка существуют два типа связывающих участков: с высоким сродством к субстрату и с низким. Как было показано нами ранее, при низких концентрациях белка наблюдается частичная диссоциация его олигомеров и демаскируются участки связывания с низким сродством к субстрату (для лейцина $K_D_{\text{наб}}$ $5,5 \cdot 10^{-6}$ М [5]). Очевидно, что в нативном LIV-белке эндогенные субстраты занимают высокоаффинные центры связывания. Дополнительное введение субстрата приводит к связыванию в участке с низким сродством. Последний, по-видимому, включает остаток триптофана в более полярном окружении, чем остаток триптофана в высокоаффинном участке связывания, причем связывание изолейцина и лейцина по-разному изменяет окружение остатка триптофана в низкоаффинном центре. Таким образом, различия в спектрах флуоресценции, наблюдаемые в случае разбавленных растворов

* Получить разностный спектр разбавленного раствора с-LIV-белка при $\lambda_{\text{возб}}$ 295 нм не удалось, поскольку интенсивность флуоресценции в этих условиях очень низкая.

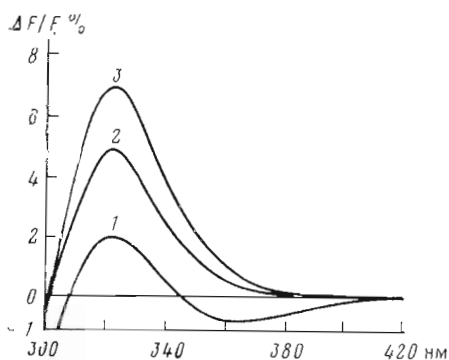


Рис. 8

Рис. 8. Разностные спектры флуоресценции с-LIV-белка и с-LIV-белка в присутствии лейцина (1), валина (2), изолейцина (3). $\lambda_{возб}$ 280 нм. Концентрация белка $1,4 \cdot 10^{-6}$ М, концентрация субстратов $2,6 \cdot 10^{-5}$ М

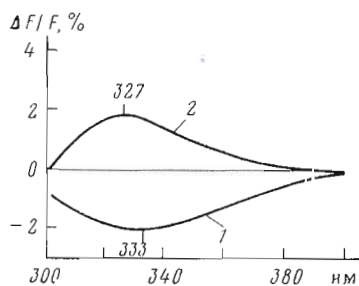


Рис. 9

Рис. 9. Разностные спектры флуоресценции нативного LIV-белка и LIV-белка в присутствии лейцина (1) и изолейцина (2). Концентрация белка $1,4 \cdot 10^{-6}$ М, концентрация субстратов $2,6 \cdot 10^{-5}$ М, $\lambda_{возб}$ 280 нм

с-LIV-белка в присутствии лейцина и изолейцина, скорее всего обусловлены вкладом флуоресценции остатка триптофана, принадлежащего участку с низким сродством к субстрату.

Оба субстрата (лейцин и изолейцин) связываются конкурентно в обоих участках сорбции на белке. Это подтверждается опытами по взаимному вытеснению аминокислот. Так, при добавлении 10-кратного избытка лейцина к раствору комплекса с-LIV-белка с изолейцином (1 : 1) разностный спектр флуоресценции, характерный для изолейцина, переходит в спектр, характерный для лейцина (рис. 8, 3, 1). Мало вероятно, что эти изменения обусловлены конформационными изменениями белка и связанным с ними изменением сродства к вытесняемому субстрату, поскольку спектры КД и комбинационного рассеяния свидетельствуют об отсутствии конформационных изменений полипептидной цепи белка.

Следует подчеркнуть, что наблюдаемые эффекты весьма специфичны — добавление *D*-изомеров аминокислот или неспецифической аминокислоты β-аланина не влияет на параметры флуоресценции белка.

Флуориметрическое титрование. Флуориметрическое титрование с-LIV-белка субстратами — лейцином, изолейцином и валином (рис. 10а) — позволяет убедиться в том, что наблюдаемые спектральные изменения обусловлены специфическим связыванием субстратов в активном центре белка. Полученные данные позволили рассчитать константы диссоциации комплексов (K_D) и кажущееся число активных центров (n) в условиях, когда связыванием субстратов в центре с низким сродством можно пренебречь. Для этого в соответствии с выражением, полученным аналогично [15]

$$\frac{1 - \Delta F_{отн}}{\Delta F_{отн}} \cdot \frac{[S]_0}{[P]_0} = \frac{K_D}{[P]_0} + n(1 - \Delta F_{отн}) \quad (1)$$

($\Delta F_{отн} = \Delta F_{набл} / \Delta F_{макс}$; $[P]_0$ и $[S]_0$ — полные концентрации белка и субстрата), строили зависимость величин $(1 - \Delta F_{отн}) / \Delta F_{отн} ([S]_0 / [P]_0)$ от $(1 - \Delta F_{отн})$ (рис. 10б). Наклон графиков равен n , а отсекаемый отрезок на оси ординат — $K_D / [P]_0$. Экспериментальные точки хорошо укладываются на прямую с коэффициентом линейной регрессии $r^2 \geq 0,996$. Полученные значения K_D и n (табл. 2) близки к величинам, определенным ранее [4] методом равновесного диализа. Низкое кажущееся число активных центров обусловлено, по-видимому, концентрационно-зависимой самоассоциа-

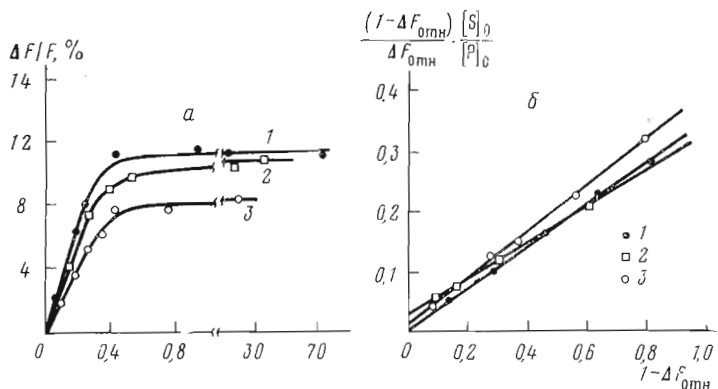


Рис. 10. Титрование с-LIV-белка аминокислотами в дифференциальном режиме — а: изолейцином (1), валином (2) и лейцином (3). Сплошные линии — теоретические кривые (см. текст). Концентрация белка $1,6 \cdot 10^{-5}$ М, $\lambda_{\text{возб}}$ 295 нм. б — графики титрования в линейных координатах, рассчитанные в соответствии с уравнением (1)

цией белка, сопровождающейся маскированием части связывающих субстрат участков [4].

pH-Зависимость флуоресценции и активности LIV-белка. Как видно из рис. 11, при переходе в область низких значений pH активность белка и интенсивность флуоресценции резко падают, а положение максимума эмиссии сдвигается в длинноволновую область. Таким образом, в этой области pH наблюдается сходство в изменении флуоресцентных свойств и связывающей субстрат активности белка. Кажущееся значение pK_a группы, контролирующей оба параметра, составляет $\sim 3,0-3,2$. Такое значение согласуется с предположением о том, что для проявления активности важно состояние ионизации некоторой карбоксильной группы белка. Как известно [16], протонированная карбоксильная группа является эффективным тушителем флуоресценции остатков триптофана. Таким образом, можно предположить, что одна и та же карбоксильная группа участвует в связывании субстрата и, будучи расположенной вблизи остатка триптофана в активном центре белка, при протонировании становится эффективным тушителем флуоресценции.

В области щелочных значений pH активность белка и интенсивность флуоресценции также резко падают с pK_a как $10,1-10,5$, что может указывать на изменение ионного состояния остатков тирозина или лизина вблизи активного центра. Ионизация указанных групп или одной из них, вероятно, сказывается на способности белка к комплексообразованию.

Тушение флуоресценции. Добавление к растворам нативного или с-LIV-белка при нейтральных значениях pH ионов I^- или Cs^+ — эффективных тушителей флуоресценции — почти не влияет на флуоресцентные свойства белка. Так, в присутствии 0,2 М KI интенсивность флуоресценции снижается лишь на 2–3%. Незначительное тушение может быть следствием того, что экспонированные остатки триптофана, доступные I^- и Cs^+ , флуоресцируют слабо (см. «спектры флуоресценции»), а маскированный остаток триптофана недоступен тушителям.

Эффективное тушение флуоресценции с-LIV-белка ионами I^- удается наблюдать лишь при pH 4,0. В этих условиях или «разрыхляется» компактная структура белка, или же нейтрализуется отрицательный заряд, расположенный вблизи остатка триптофана и препятствующий подходу тушителя. Присутствие субстратов (Leu, Ile) затрудняет тушение ионами йода. Доступность остатков триптофана при этом снижается, что проявляется в уменьшении вклада доступных тушителю остатков в общее излучение от 1 до 0,5 и в соответствующем уменьшении константы Штерна — Фольмера от 2,8 до $1,9-2,3 \text{ M}^{-1}$ (рис. 12). Эффект защиты субстратом со-

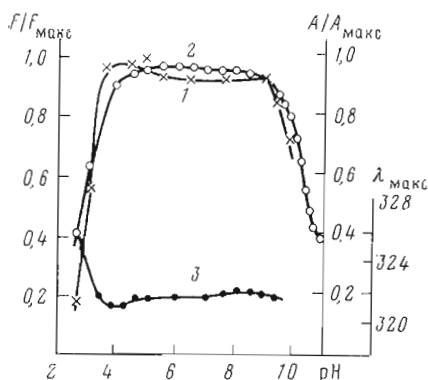


Рис. 11

Рис. 11. Зависимость относительных величин связывающей активности $A/A_{\text{макс}}$ (1), интенсивности $F/F_{\text{макс}}$ (2) в максимуме полосы эмиссии и положения максимума полосы эмиссии ($\lambda_{\text{эм}}$) (3) нативного LIV-белка от pH. Концентрация белка $2,8 \cdot 10^{-5}$ М (1) и $4,8 \cdot 10^{-6}$ М (2, 3), $\lambda_{\text{возб}}$ 295 нм. Щели: возбуждения — 5 нм, эмиссии — 10 нм

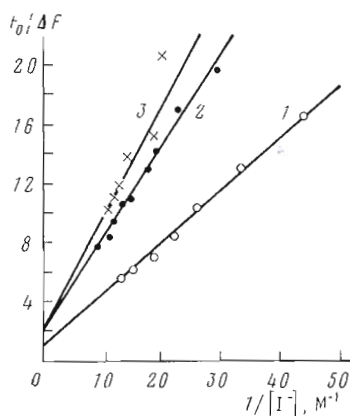


Рис. 12

Рис. 12. Тушение флуоресценции с-LIV-белка подкистым калием при pH 4,0 в отсутствие субстрата (1) и в присутствии лейцина (2) и изолейцина (3). $\Delta F = F_0 - F$, где F_0 — интенсивность флуоресценции в отсутствие тушителя, F — в присутствии KI. $[I^-]$ — концентрации тушителя. Концентрация белка $4,8 \cdot 10^{-6}$ М, субстрата $2,6 \cdot 10^{-5}$ М. Буфер: 0,05 М ацетат натрия, 0,2 М NaCl, pH 4,0. $\lambda_{\text{возб}}$ 295 нм

гласуется с представлением о наличии в активном центре белка остатка триптофана. На основании этих данных можно предположить, что при pH 4,0 становится доступным тушителю маскированный остаток триптофана, принадлежащий активному центру и вносящий основной вклад в суммарное излучение белка.

Спектры комбинационного рассеяния (КР). Как видно из рис. 13, спектры КР нативного LIV-белка и с-LIV-белка в присутствии любого из трех субстратов полностью совпадают. Наиболее информативными спектральными характеристиками в спектрах КР, позволяющими оценить конформационное состояние основной полипептидной цепи объекта, являются частоты и контуры полос колебаний «амид I» и «амид III», а также полосы в области C—C- и C—N-колебаний, чувствительных маркеров конформационных изменений [17].

В спектре КР с-LIV-белка колебания «амид I» проявляются в виде интенсивной полосы с максимумом 1660 см^{-1} , свидетельствующим о существенном содержании α -спиралей в LIV-белке. Последнее подтверждается наличием высокочастотных полос «амид III», исчезающих при дейтерозамещении. Этот вывод подтверждают оценочные расчеты, выполненные по методам Липпета [18] и Пезолетта [19] и дающие для α -спиралей величины порядка 47 и 55% соответственно, а также наличие полосы C—C- или C—N-колебаний в области $935\text{--}945 \text{ см}^{-1}$ [17]. Сопоставление результатов анализа полос «амид I», «амид III» и полос в области C—C- и C—N-колебаний приводит к выводу, что в нативном, с-LIV-, а также с-LIV-белке с добавлением лейцина, изолейцина или валина конформация основной полипептидной цепи одинакова.

В работах [20–22] было показано, что полоса 1361 см^{-1} колебания индольного кольца триптофана является характерной при определенных степенях гидрофобности окружения триптофана в растворе. В спектре с-LIV-белка наблюдается небольшая по интенсивности (по сравнению с полосой 1340 см^{-1}) полоса 1361 см^{-1} , свидетельствующая о том, что 1–2 остатка триптофана находятся в гидрофобном окружении. Для нативного белка (и для с-LIV-белка в присутствии субстрата) наблюдается увеличение интенсивности полосы 1361 см^{-1} . Подобные спектральные изменения

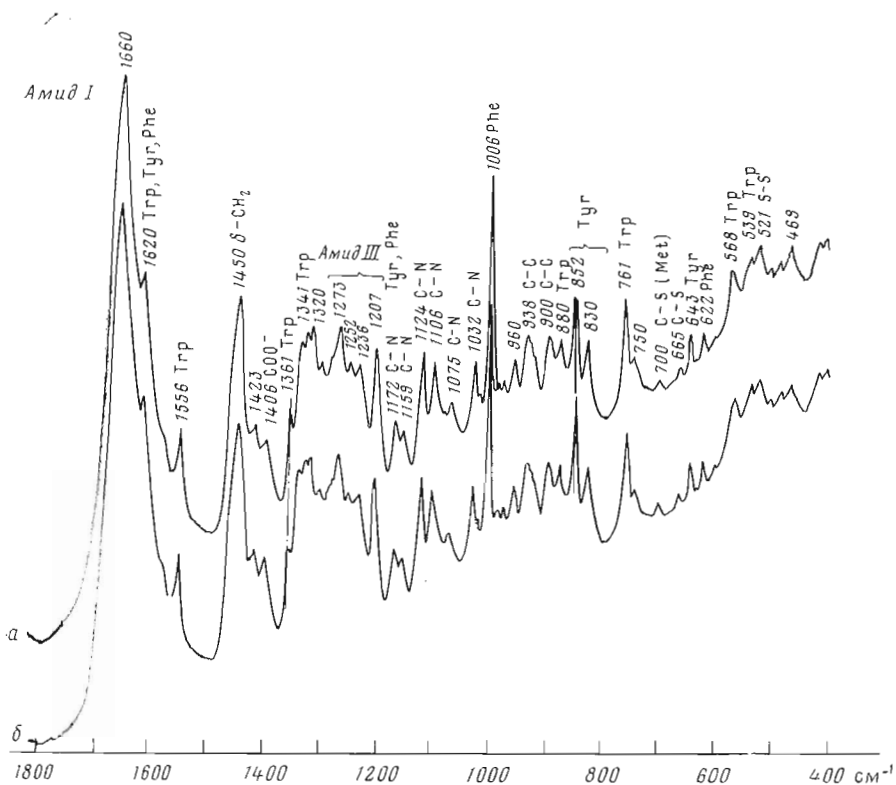


Рис. 13. Спектры комбинационного рассеяния нативного (а) и с-LIV-белка (б) в воде. Концентрация 80 мг/мл, рН 6,5. Возбуждающая лазерная линия 514,5 нм. Ширина щели 700 мкм. Мощность лазера 250 мВт. Напряжение на ФЭУ 1180 В. Скорость сканирования 10 см⁻¹/мин

согласуются с представлением о том, что при образовании комплекса белка с субстратом происходит усиление гидрофобного контакта маскированного остатка триптофана.

Был также проведен анализ состояния остатков тирозина в белке. Тестом на состояние гидроксильной группы остатка тирозина является отношение интенсивностей полос ферми-резонансного дублета в области 800–900 см⁻¹ [23]. Известно, что указанное отношение не зависит от окружения фенольного кольца тирозина, а определяется величиной отрицательного заряда на кислороде гидроксила. Шиямвиза и др. [23] предложили систему коэффициентов, позволяющую оценивать состояние гидроксильной группы тирозина по отношению интенсивностей полос тирозинового дублета.

В случае с-LIV-белка отношение интенсивностей полос тирозинового дублета составляет 1,55. Отсюда следует (см. [23]), что гидроксильная группа по крайней мере одного из тирозиновых остатков белка участвует в водородной связи, причем выступает как акцептор протона. При добавлении субстрата к с-LIV-белку это отношение увеличивается до 1,77. Последнее говорит о том, что по крайней мере еще один остаток тирозина вступает в водородную связь, причем и в этом случае гидроксильная группа выступает как акцептор протона. Возможно также, что в присутствии субстрата происходит усиление исходной водородной связи, а не образование новой.

Приведенные выше данные позволяют заключить следующее: а) связывание субстратов с-LIV-белком не сопровождается конформационными изменениями основной полипептидной цепи белка; б) белок имеет по крайней мере два связывающих субстраты центра, различающихся по

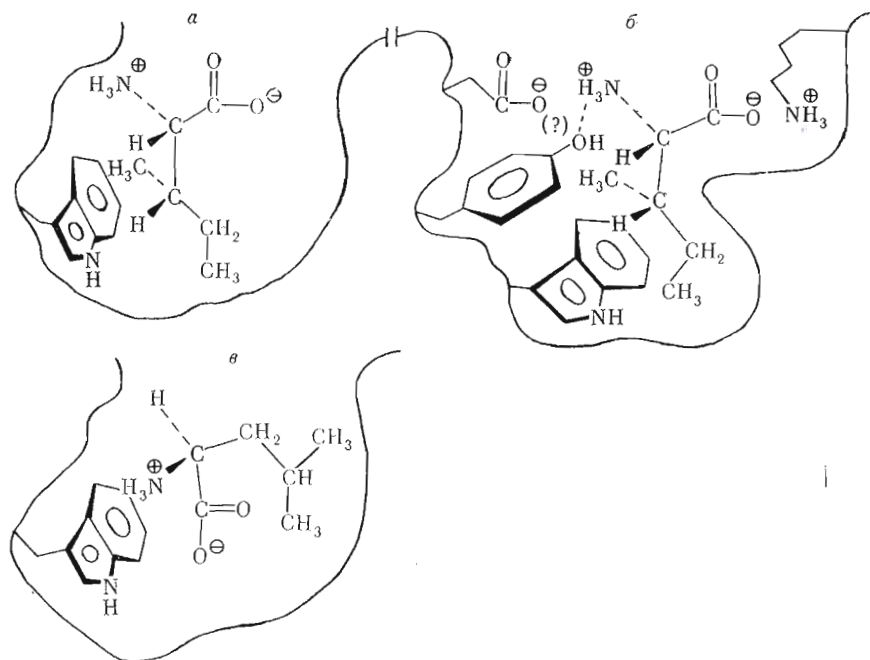


Рис. 14. Гипотетическая модель комплекса с-LIV-белка с изолейцином (а, б) и лейцином (в). а и в — участок с низким средством к субстрату, б — участок с высоким средством

средству к субстратам; в) в области высокоаффинного центра расположен остаток триптофана, находящийся в сильногидрофобном окружении. В области центра с низким средством к субстратам расположен остаток триптофана, находящийся в более полярном окружении; г) в центре с высоким средством к субстратам расположен остаток тирозина, выступающий как акцептор протона в водородной связи, появлением которой сопровождается образование комплекса.

Остаток триптофана, расположенный в участке с высоким средством, недоступен ни растворителю, ни тушителям флуоресценции (I⁻ или Cs⁺). Остаток, расположенный в участке с низким средством, доступен растворителю и, по-видимому, тушителям флуоресценции. Ни один из этих остатков в с-LIV-белке не модифицируется 2-окси-5-нитробензилбромидом. Лишь 1—2 остатка тирозина из 7 доступных растворителю модифицируются при нитровании тетранитрометаном.

Таким образом, полученные данные показывают, что остатки триптофана и тирозина, участвующие в связывании субстратов, находятся в белке в особом состоянии, когда по крайней мере один из них способен взаимодействовать только с субстратами, но не с другими неспецифическими реагентами (тушителями или модификатором). Можно предположить, что остаток триптофана в участке с высоким средством к субстрату расположен в гидрофобной щели и экранирован от среды заряженными группами остатков лизина и аспарагиновой (или глутаминовой) кислоты. При связывании субстрата эти заряженные группы образуют солевые связи с ионными группами субстрата, а боковая цепь последнего взаимодействует с индольным кольцом триптофанового остатка белка (об участии остатков лизина в связывании см. [7]). При этом увеличивается гидрофобность окружения остатка тирозина (расположенного вблизи триптофана), который, возможно, участвует своей гидроксильной группой в образовании водородной связи с аммонийной группой субстрата. Эти представления позволяют изобразить гипотетическую модель комплексообразования (рис. 14).

Экспериментальная часть

LIV-белок выделяли из лиофильно высушенной шоковой жидкости *E. coli* K-12 и очищали модифицированным методом Авраку [24] с последующей кристаллизацией. Для кристаллизации к раствору белка в 10 мМ трис-НСl-буфере, pH 7,5, добавляли 2-метил-2,4-пентандиол (Fluka) до концентрации 40% (V/V) при концентрации белка 5–10 мг/мл. Кристаллизацию вели диализом против 40% (V/V) раствора 2-метил-2,4-пентандиола в 40 мМ Na-ацетатном буфере, pH 4,5, при 3–4° С в течение недели. Образовавшиеся кристаллы гексагональной формы [25] собирали на стеклянном фильтре, промывали несколько раз диализным противораствором и растворяли в требуемом буфере.

Наличие одной полосы, соответствующей LIV-белку, при электрофорезе в трис-глициновом буфере [26] и в присутствии додецилсульфата натрия свидетельствовало о чистоте препарата. Это подтверждалось также анализом N-концевой аминокислоты в растворе полученных кристаллов. В последнем случае на хроматограмме идентифицировались три пятна, соответствующие дансильным производным глутаминовой кислоты — N-концевой аминокислоты LIV-белка, а также лейцина и изолейцина — субстратов, прочно связанных с белком при его выделении [27].

Белок, свободный от эндогенных аминокислот (с-LIV-белок), получали по измененной методике [27]. Раствор LIV-белка (несколько миллилитров, концентрация 1 мг/мл) диализовали против 1 л 5,5 М мочевины в течение 1 сут, затем такое же время — против 2,5 М мочевины. После обработки мочевиной проводили исчерпывающий диализ против воды или буфера.

Концентрацию белка определяли по методу Лоури и по поглощению при 280 нм, принимая $E_{\text{мг/мл}}$ равной 1,0. Активность белка измеряли методом равновесного диализа [28] с использованием равномерно меченого L-[¹⁴C]лейцина (324 мКи/ммоль).

Спектры КД получены на дихрографе «Dichrographe III» (Jobin Yvon, Франция). Концентрация с-LIV-белка составляла $1,4 \cdot 10^{-5}$ М, концентрация субстрата — $1,3 \cdot 10^{-4}$ М. Средний вес остатка, рассчитанный согласно аминокислотному составу, равен 104,6.

Измерения спектров поглощения проводили на спектрофотометре «Beckman ACTA M-V1» (США).

Разностные УФ-спектры, возникающие при пертурбации этиленгликолем и сахарозой, получены по методу Гершковича и Ласковского [29]. Связывающая способность с-LIV-белка не изменялась при добавлении 20% (V/V) этиленгликоля и 20% сахарозы.

Измерения флуоресценции (корректированные спектры) проводили на двухлучевом спектрофлуориметре «Aminco SPF-1000» (США). При получении разностных спектров флуоресценции в две кюветы вносили по 1,8 мл раствора белка (концентрация 0,05 или 0,5 мг/мл), регистрировали базовую линию и в кювету образца добавляли микролитровые аликвоты субстрата ($2,6 \cdot 10^{-2}$ М), а в кювету сравнения — такое же количество воды или буфера.

Квантовые выходы определяли сравнительным методом [30], используя триптофан в качестве стандарта. Квантовый выход триптофана принят равным 0,2 [31]. Поглощение растворов при определении квантового выхода не превышало 0,05 ОЕ.

Измерения тушения флуоресценции проводили при pH 7,6 и 4,0 на спектрофлуориметре «Hitachi MPF-3». К 2 мл раствора белка ($4,8 \cdot 10^{-6}$ М) в 0,05 М фосфатном или ацетатном буфере в присутствии 0,2 М NaCl добавляли аликвоты (5–10 мкл) 3 М KI или CsCl. В раствор KI для предотвращения образования I_3^- вносили небольшое количество тиосульфата натрия. В присутствии 0,2 М NaCl эффектом изменения ионной силы при добавлении тушителя пренебрегали. Следует отметить, что при pH 4,0 с-LIV-белок неустойчив: происходит его медленная денатурация и соответственно изменение интенсивности, которое учитывалось при обработке

экспериментальных данных. Данные по тушению анализировали согласно модифицированному уравнению Штерна — Фольмера [32].

Модификацию остатков триптофана в с-LIV-белке осуществляли 2-окси-5-нитробензилбромидом (Sigma) по методу [33]. К 4 мл раствора белка (1 мг/мл) в ацетатном буфере (рН 4,6) при 4°С добавляли 0,2 мл раствора 2-окси-5-нитробензилбромида в сухом ацетоне (50 мг/мл). Через 2 ч раствор подвергали гель-фильтрации на сефадексе G-25. Степень модификации определяли по поглощению при 410 нм [34]. Показано, что в этих условиях препарат белка не модифицируется.

При нитровании с-LIV-белка к 3 мл раствора белка (концентрация 0,8 мг/мл) в 0,05 М буфере, рН 8,0, добавляли 0,1 мл 0,1 М спиртового раствора тетранитрометана при 20°С [6]. Через 3,5 ч раствор подкисляли до рН 4,5 уксусной кислотой, обессоливали на сефадексе G-25 и определяли степень модификации по поглощению при 381 нм. В этих условиях нитровались 1–2 остатка тирозина на молекулу белка. Активность белка сохранялась на 70% по сравнению с контролем. Введение субстрата (изолейцина) не изменяло степени модификации.

Спектры КР получены на раман-спектрометре «Ramanog HG-2S» (Jobin Yvon, Франция) с двойным монохроматором на вогнутых голографических решетках и фотумножителем типа РСА-с31034. Для возбуждения использованы линии 514,5 нм Ar⁺-лазера «Spectra-Physics 164-03». Съемка спектров растворов проводилась в кварцевых кюветах на 300 мкл. Для ослабления плазменных линий, лежащих вблизи от возбуждающей линии на пути лазерного луча, ставился соответствующий интерференционный фильтр. Спектры КР воспроизводились от 3 до 5 раз.

Все измерения, за исключением случаев, оговариваемых особо, проводили в 5 мМ фосфатном буфере при рН 7,0 и температуре 20°С. В случае флуоресцентных измерений использовали щели возбуждения и эмиссии 5 и 10 нм соответственно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Piperno J. R., Oxender D. L. (1966) *J. Biol. Chem.*, **241**, 5732–5743.
2. Овчинников Ю. А., Алданова Н. А., Гринкевич В. А., Арзамасова Н. А., Мороз И. Н., Назимов И. В. (1977) *Биоорг. химия*, **3**, 564–568.
3. Meador W. E., Quiosco F. A. (1978) *J. Mol. Biol.*, **123**, 499–502.
4. Антонов В. К., Воротынцева Т. И., Александров С. Л., Гаврилова Н. А., Арсеньева Е. Л. (1975) *Докл. АН СССР*, **221**, 1215–1218.
5. Antonov V. K., Alexandrov S. L., Vorotyntseva T. I. (1975) *Adv. Enzyme Regulation*, **14**, 269–278.
6. Гаврилова Н. А., Антонов В. К. (1977) *Биоорг. химия*, **3**, 768–773.
7. Гаврилова Н. А., Гринкевич Х. А., Антонов В. К. (1979) *Биоорг. химия*, **5**, 1176–1183.
8. Penrose W. R., Zand R., Oxender D. L. (1970) *J. Biol. Chem.*, **245**, 1432–1437.
9. Антонов В. К., Арсеньева Е. Л., Гаврилова Н. А., Гиодман Л. М., Крылова Ю. И. (1973) *Биохимия*, **38**, 1294–1297.
10. Amanuma H., Iton J., Anraku Y. (1976) *J. Biochem.*, **79**, 1167–1182.
11. Коган Г. А. (1973) *Молекулярн. биология, ВИНТИ*, т. 3, М.
12. Sheraга H. (1957) *Biochim. et biophys. acta*, **23**, 196–197.
13. Wetlaufer D. B. (1962) in: *Advances in Protein Chemistry* (Anfinsen C. B., Jr., ed.), vol. 17, pp. 304–382, Acad. Press, New York – London.
14. Herskowitz T., Sorensen M. (1968) *J. Biol. Chem.*, **243**, 1892–1899.
15. Cogan U., Kopelman M., Mokady S., Shinitzky M. (1976) *Eur. J. Biochem.*, **65**, 71–78.
16. Бурштейн Э. А. (1976) в кн.: *Итоги науки и техники*, т. 6, с. 119, ВИНТИ, М.
17. Spiro T. G., Gabor B. P. (1977) *Ann. Rev. Biochem.*, **46**, 553–572.
18. Lippert J. L., Tyminski D., Desmeules P. J. (1976) *J. Amer. Chem. Soc.*, **98**, 7075–7080.
19. Pesolet M., Pigeon-Gosselin M., Conlomb L. (1976) *Biochim. et biophys. acta*, **453**, 502–512.
20. Chen M. C., Lord R. C., Mendelsohn R. (1974) *J. Amer. Chem. Soc.*, **96**, 3038–3042.
21. Chen M. C., Lord R. C., Mendelsohn R. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, **328**, 252–260.
22. Yu N. T. (1974) *J. Amer. Chem. Soc.*, **96**, 4664–4668.
23. Siamwiza M. N., Lord R. C., Chen M. C., Takamatsu T., Harada M., Matsuura H., Shimanouchi T. (1975) *Biochemistry*, **14**, 4870–4876.
24. Amanuma H., Anraku Y. (1978) *J. Biochem.*, **76**, 1165–1173.

25. Oxender D. L., Quay S. (1975) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **264**, 358-372.
26. Ornstein L., Davis B. T. (1964) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 321-327.
27. Amanuma H., Iton T., Anraku Y. (1976) *J. Biochem.*, **79**, 1167-1182.
28. Akiraku Y. (1968) *J. Biol. Chem.*, **243**, 3116-3122.
29. Herskovits T., Laskowski M. (1962) *J. Biol. Chem.*, **237**, 2481-2492.
30. Parker C. A., Rees W. T. (1960) *Analyst*, **85**, 587-601.
31. Teale F., Weber G. (1957) *Biochem. J.*, **65**, 476-482.
32. Lehrer S. S. (1967) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **29**, 767-777.
33. Horton H. R., Koshland D. E. (1964) *J. Amer. Chem. Soc.*, **86**, 1448-1450.
34. London J. M., Koshland D. E. (1970) *J. Biol. Chem.*, **245**, 2247-2254.

Поступила в редакцию
6.V.1980

SPECTRAL PROPERTIES OF THE LEUCINE-ISOLEUCINE-VALINE BINDING PROTEIN AND ITS COMPLEXES WITH SUBSTRATES

VOROTYNTSEVA T. I., SURIN A. M., TRAKHANOV S. D.,
NABIEV I. R., ANTONOV V. K.

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

The difference UV, fluorescence, CD and Raman spectra have been studied for leucine-isoleucine-valine binding protein (LIV-protein), as well as for LIV-protein depleted from endogeneous substrates (s-LIV-protein), and for the complexes of these two proteins with leucine and isoleucine. It was found that the complexation of s-LIV-protein changes the spectral parameters of the aromatic residues (tryptophan and tyrosine) of the proteins. The protein has at least two substrate binding sites which differ in their affinity for the substrates. The high-affinity site contains one tryptophan residue and, possibly, one tyrosine residue. A hypothetical model for the substrate binding by LIV-protein is suggested.
