



УДК 547.963.4;577.150.3

АФИННОЕ МЕЧЕНИЕ ГЕМОГЛОБИНА ЧЕЛОВЕКА ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ ЭТЕНОПРОИЗВОДНЫМ АТФ

*Воробьев Л. В., Котельников А. И., Кост А. А.,
Гвоздев Р. И.*

*Отделение Института химической физики
Академии наук СССР, Черноголовка,
Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва*

Разработан новый метод ковалентного введения флуоресцентной метки в гемоглобин (Hb) человека. Установлено, что флуоресцентная метка вводится только по регуляторному центру (РЦ) Hb. На основе АТФ, ковалентно связанного с сефарозой 4В, создан новый носитель для афинной хроматографии Hb. Полученный носитель успешно применен как для очистки Hb, так и для отделения модифицированного Hb от исходного. Разработана методика, позволяющая получить Hb со 100%-ной модификацией регуляторного центра.

Низкомолекулярные молекулы, обладающие флуоресцентными свойствами или свойствами стабильных радикалов, в последние годы нашли широкое применение в качестве меток-репортеров при исследовании биологических макромолекул и надмолекулярных структур [1, 2, 3]. Эти соединения широко используются для модификации отдельных функциональных групп и гидрофобных участков молекул белков и ферментов. Специфическое ковалентное мечение ферментов по отдельным функциональным группам представляет большой интерес, поскольку открывает новые возможности в исследовании их структуры и механизма действия.

В данной работе описан простой метод афинного мечения РЦ Hb флуоресцентным этеноаденозинтрифосфатом (ϵ -АТФ, 3- β -D-рибофуранозилимидазо[2,1-*i*]пурин-5'-трифосфат), а также способ получения модифицированного Hb со 100%-ной модификацией РЦ с помощью афинной хроматографии.

Hb содержит РЦ, который связывает 2,3-дифосфоглицерат, АТФ и некоторые другие органические полифосфаты [4, 5, 6]. Этот центр находится в центральной полости Hb и сформирован из аминокислотных остатков двух β -полипептидных цепей. Обе α -полипептидные цепи не принимают участия в его образовании [7]. В состав РЦ входит несколько аминокислот: два концевых валина, лизин и гистидин [7]. Положительно заряженные группы этих аминокислот образуют несколько локализованных положительно заряженных областей, которые взаимодействуют с полифосфатами. Это обстоятельство позволяет ожидать, что с РЦ Hb могут связываться по средству некоторые аналоги АТФ, обладающие рядом интересных физических свойств, в частности флуоресцентный аналог АТФ. Изучая флуоресцентные свойства ϵ -АТФ, расположенного в РЦ Hb, можно исследовать топографию РЦ и механизм его действия. Исследование РЦ

Hb с помощью ϵ -АТР, находящегося в динамическом равновесии $Hb + \epsilon\text{-АТР} \rightleftharpoons Hb\text{-}\epsilon\text{-АТР}$ сопряжено с рядом экспериментальных трудностей. Поэтому была предпринята попытка ковалентно присоединить ϵ -АТР к РЦ Hb.

Для этого ϵ -АТР окисляли периодатом натрия по методу [8, 9], окисленный препарат ϵ -АТР прибавляли к Hb и восстанавливали образовавшееся основание Шиффа боргидридом натрия. Полученную смесь разделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-25. При этом Hb отделялся от непрореагировавшего ϵ -АТР. Полученный препарат Hb обладал явно выраженной флуоресценцией, что свидетельствовало о наличии в нем остатков ϵ -АТР. Повторная гель-фильтрация Hb в 0,1%-ном додецилсульфате натрия подтвердила, что остатки ϵ -АТР ковалентно присоединены к Hb.

Можно было ожидать, что в результате проведенной химической модификации полученный препарат Hb будет содержать Hb, модифицированный по РЦ (рис. 1, *a-1*), немодифицированный Hb (рис. 1, *a-2*) и Hb, модифицированный не по РЦ (рис. 1, *a-3*).

Единственным методом, которым представлялось возможным выяснить состав полученного препарата Hb, являлся метод афинной хроматографии. Данные работ [4, 5, 6] позволяют предполагать, что Hb будет связываться по РЦ с АТР, ковалентно присоединенным к нерастворимому носителю, в частности к сефарозе. Для этого сефарозу 4В, предварительно активированную бромцианом и модифицированную гексаметилендиамином, обрабатывали АТР, окисленным периодатом натрия и восстанавливали полученный аддукт $NaBH_4$. Полученный препарат сефарозы с ковалентно привязанным к ней АТР (АТР-сефарозу) применили для афинной хроматографии препарата Hb, полученного после лизиса отмывтых эритроцитов человека.

Оказалось, что исследуемый препарат разделяется на три пика (рис. 2). Часть белка проходила через колонку при элюции буфером трис-HCl (рис. 2, пик 1). При хроматографии свежеприготовленного раствора Hb быстро элюирующийся белок обычно был либо желтоватого цвета, либо слегка окрашен в розовый цвет. Однако при хранении раствора Hb количество белка, несвязывающегося с АТР-сефарозой, увеличивалось и он приобретал более яркую красную окраску. В этой фракции увеличивалось содержание деструктированного Hb. Белки, элюирующиеся буфером трис-HCl, являются примесными белками. По-видимому, к ним относятся белки эритроцитов, а также белки сыворотки крови, не удаленные в процессе отмывания эритроцитов.

Основная часть белков связывалась с АТР-сефарозой и располагалась в виде ярко-красного кольца в верхней части колонки. Известно, что константы связывания органических полифосфатов с РЦ Hb резко снижаются при повышении ионной силы раствора, так что в 0,2–0,3 М растворе NaCl присоединения аллостерического регулятора к РЦ не происходит [10, 11]. Присутствие нескольких органических полифосфатов приводит к их взаимной конкуренции и при избытке одного из них связывание другого также резко снижается. Поэтому можно было ожидать, что Hb, связанный с АТР-сефарозой, будет элюироваться при повышенной ионной силе или под действием растворов органических полифосфатов.

И действительно, этот белок (рис. 2, пик 2) элюировался только в том случае, когда в элюирующем растворе присутствовали АТР, GTP или CTP ($5 \cdot 10^{-2}$ – $5 \cdot 10^{-4}$ М) либо NaCl (0,2 М). При этом ярко-красное кольцо на колонке исчезало. Спектры поглощения элюата подтверждали, что элюирующийся белок является Hb. Состав его подробно не исследовали, но можно полагать, что он неоднороден и включает все разновидности Hb, содержащиеся в эритроцитах [5]. (Более подробные результаты афинной хроматографии Hb на различных сорбентах, включая биогель, связанный с АТР через остаток рибозы и через 6-NH₂-группы аденинового кольца, будут опубликованы отдельно.)

Незначительная часть белка обычно элюировалась 0,5 М раствором NaCl (рис. 2, пик 3). Состав этой фракции не исследовали. Однако на основании спектров поглощения можно утверждать, что Hb в ней отсутствовал. По-видимому, в этой фракции содержатся белки, константы связывания РЦ которых значительно выше, чем у Hb.

Для оценки специфичности связывания Hb с АТР-сефарозой через колонку с афинным сорбентом пропускали сыворотку крови, содержание Hb

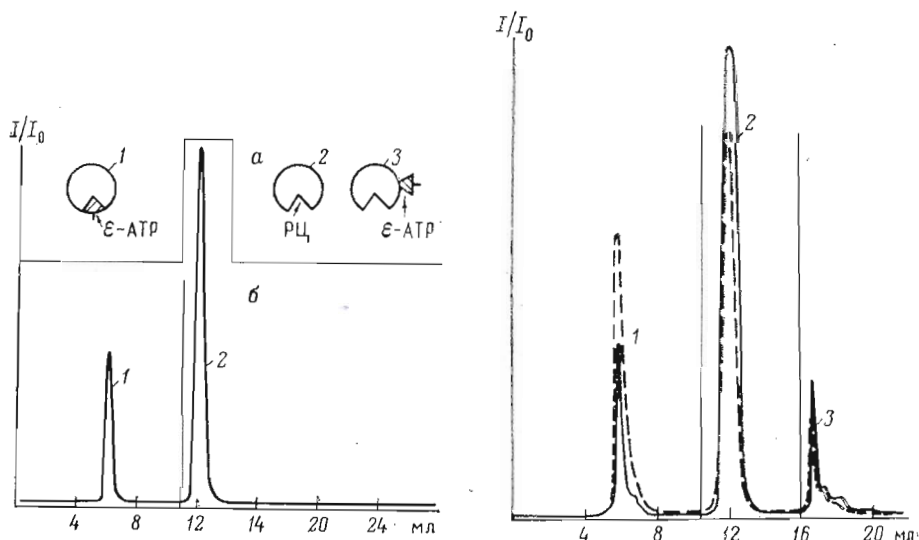


Рис. 1

Рис. 2

Рис. 1. Возможные варианты модификации Hb ε-АТР (а) и хроматография по сорбенту Hb, модифицированного ε-АТР (б) (I_0 — световой поток проточного денситометра, поступающий на фотоэлемент при прохождении через проточную камеру растворителя; I — то же, что и I_0 , но в присутствии вещества, поглощающего световой поток; I/I_0 — относительная величина)

Рис. 2. Очистка Hb афинной хроматографией на АТР-сефарозе: 1 — примесные белки; 2 — Hb; 3 — неидентифицированные белки, не содержащие Hb (сплошная линия — свежеприготовленный препарат Hb, штриховая линия — препарат Hb через 30 сут хранения при 5°)

в которой очень низко. Типичная картина хроматографического разделения приведена на рис. 3. Как видно из рисунка, основная часть белков сыворотки крови (более 95%) не связывается с АТР-сефарозой (пик 1, элюция трис-HCl). Присутствующий в сыворотке крови Hb элюировался 0,2 М NaCl (пик 2). Белки, элюировавшиеся 0,5 М раствором NaCl (пик 3), не идентифицировались, однако Hb в этой фракции отсутствовал.

Полученные результаты показывают, что Hb специфически связывается своим РЦ с АТР, ковалентно присоединенным к сефарозе. Любое нарушение структуры РЦ или эффективной величины его положительного заряда снижает прочность связи Hb с АТР-сефарозой. Этот вывод подтверждается следующими фактами: 1) элюция Hb сравнительно низкими концентрациями полифосфатов, 2) увеличение содержания Hb, не связывающегося с АТР-сефарозой, после длительного хранения, при котором происходят деструктивные изменения препарата, 3) элюция Hb в условиях, когда РЦ не связывает органические полифосфаты и 4) отсутствие связывания основной массы белков сыворотки крови с АТР-сефарозой. Таким образом; АТР-сефароза является хорошим носителем для афинной хроматографии Hb и может быть использована для исследования препаратов Hb, модифицированных по РЦ.

При афинной хроматографии Hb, модифицированного ϵ -АТР, наблюдали, что $\sim 10\%$ Hb не связывается с АТР-сефарозой (рис. 1, б, пик 1, элюция трис-HCl). Оставшийся Hb элюировался с колонки 0,2 М раствором NaCl (рис. 1, б, пик 2). При этом флуоресцентными свойствами обладал только Hb, не связывавшийся с АТР-сефарозой.

Логично предположить, что отсутствие связывания модифицированного Hb с афинным носителем обусловлено блокированием РЦ Hb ϵ -АТР

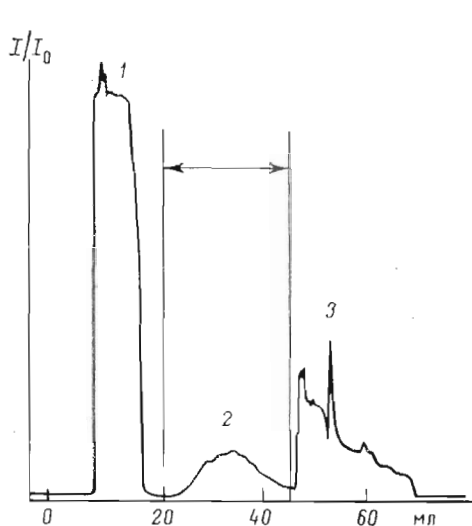


Рис. 3

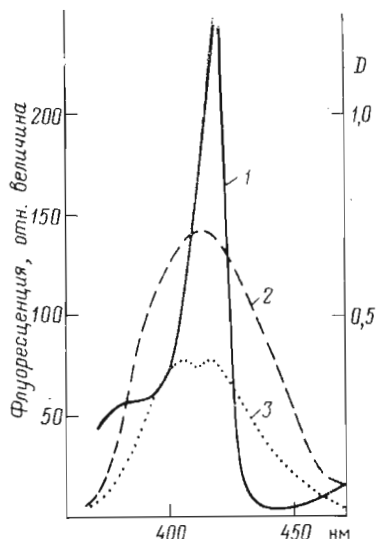


Рис. 4

Рис. 3. Афинная хроматография сыворотки крови человека на АТР-сефарозе

Рис. 4. Спектральные свойства модифицированного ϵ -АТР Hb: 1 — спектр поглощения, 2 — спектр флуоресценции свободного ϵ -АТР, 3 — спектр флуоресценции ϵ -АТР, ковалентно привязанного к регуляторному центру Hb

(рис. 1, а—1). Немодифицированной Hb, а также Hb, модифицированный не по РЦ, должны связываться с АТР-сефарозой. Отсутствие флуоресценции во фракции Hb, связывающегося с АТР-сефарозой, свидетельствует о том, что модификация Hb ϵ -АТР происходит строго по РЦ.

Возможность присутствия в пике 1 (рис. 1, б) Hb, у которого произошла деструкция РЦ, исключена, так как известно, что химическая обработка Hb, аналогичная проведенной нами, не вызвала какой-либо деструкции Hb [12].

Спектр флуоресценции модифицированного Hb (рис. 4, 3) отличался от спектра исходного ϵ -АТР (рис. 4, 2). Наличие перегиба в спектре флуоресценции в области 418—420 нм обусловлено эффектом экранизации флуоресценции полосой Soret порфириновых структур Hb, так как аналогичный по характеру спектр наблюдается при добавлении ϵ -АТР к раствору Hb.

Сравнивая интенсивность флуоресценции ϵ -АТР в присутствии Hb, установили, что интенсивность флуоресценции Hb, модифицированного ϵ -АТР, была равна интенсивности флуоресценции раствора ϵ -АТР+Hb при соотношении их 1 : 1, т. е. количество ϵ -АТР, ковалентно присоединенного к Hb, соответствует 1 молекуле ϵ -АТР на молекулу Hb.

Описанный метод ковалентного присоединения ϵ -АТР, по-видимому, можно с успехом использовать для афинного мечения ряда ферментов, имеющих активные или РЦ для АТР, АДФ, АМФ, NAD (NADH), NADP (NADPH). Афинное мечение таких ферментов флуоресцентными производными перечисленных нуклеотидов откроет дополнительные возможности в исследовании топографии ферментов, структуры активных и регуля-

торных центров и механизма их действия. Как нами показано на примере Нв, сочетание аффинного мечения ферментов с методом аффинной хроматографии позволяет получать препараты фермента, меченные по РЦ на 100%, что в ряде исследований представляет исключительно большой интерес.

Экспериментальная часть

Спектры поглощения снимали на спектрофотометре «Unicam SP-800»; спектры флуоресценции — на спектрофлуориметре конструкции А. П. Пивоварова [13], снабженном устройством для автоматической регистрации спектров. При записи спектров флуоресценции препараты возбуждали при 313 нм. Спектры флуоресценции корректировали на спектральную чувствительность фотоумножителя.

Хроматографию по сродству и гель-фильтрацию проводили на колонках: 1×10 см с автоматической регистрацией оптического поглощения элоата на выходе колонки, количество наносимого образца не превышало 3 мкмоль. В работе использовали 0,02 М буфер трис-НСI (рН 7,0).

Образцы сыворотки крови были любезно предоставлены А. П. Андреевой (Институт гематологии и переливания крови).

Активирование сефарозы. Сефарозу 4В («Pharmacia», Швеция) обрабатывали бромцианом по методу [11], используя 300 мг бромциана на 1 мл сефарозы. Затем сефарозу промывали в течение 2 мин. охлажденным до 5° 0,1 М раствором бикарбоната натрия в вакууме водоструйного насоса и суспендировали в 0,1 М растворе бикарбоната натрия. К суспензии добавляли гексаметилендиамин (100 мг на 1 мг сефарозы) и перемешивали 24 ч при 3–5°. Избыток гексаметилендиамина отделяли, промывая сефарозу водой. 0,1 М раствором NaCl и 0,1 М раствором бикарбоната натрия (рН 7,2).

Получение АТР-сефарозы. К 10 мл сефарозы, активированной гексаметилендиамином, добавляли 20 мл 0,1 М раствора бикарбоната натрия (рН 7,2) и 300 мкмоль окисленного периодата АТР (см. далее). Полученную суспензию перемешивали 3 ч при 3–5°, добавляли 1 ммоль NaBH₄, растворенного в 5 мл 1 мМ растворе NaOH, и через 30 мин полученный препарат АТР-сефарозы промывали водой, 1 М раствором NaCl и 0,02 М буфером трис-НСI (рН 7,0).

Для анализа количества АТР, ковалентно привязанного к сефарозе, к 3 мл модифицированной сефарозы, предварительно промытой водой, добавляли 5 мл 1 М HCl и полученную смесь нагревали 10 мин при 100°. Сефарозу отделяли от жидкой фазы фильтрованием и промывали (2×3 мл) водой. Фильтрат и промывные воды объединяли и анализировали на содержание неорганического фосфата по методу [14]. Содержание неорганического фосфата составило 1–1,5 мкмоль на 1 мл сефарозы.

Периодатное окисление АТР и ε-АТР. АТР («Reanal», Венгрия) или ε-АТР, синтезированный по методу [15], окисляли периодатом натрия при рН 8,0, как описано [8, 9]. Для этого к раствору АТР или ε-АТР желаемой концентрации добавляли Na₂H₂IO₆ («Reanal», Венгрия), предварительно нейтрализованный 0,1 М раствором HCl до рН 8,0. Соотношение реагентов бралось равным 1 : 1. Реакцию проводили в темноте 3 ч при 3°. Полученный препарат использовали для дальнейшей работы в виде раствора без дополнительной очистки.

Мечение Нв с помощью ε-АТР. К 1 мкмольу Нв, очищенному аффинной хроматографией на АТР-сефарозе в 1 мл 0,1 М буфера трис-НСI (рН 7,2), добавляли 1 мкмоль окисленного периодата ε-АТР в 1 мл 0,1 М буфера трис-НСI (рН 7,2), и смесь инкубировали 1 ч при 3–5°. К раствору добавляли 10 мкмоль NaBH₄, предварительно растворенного в 1 мМ растворе NaOH. Через 30 мин не связавшуюся с Нв ε-АТР отделяли от белка гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-25. Препарат модифицированного ε-АТР Нв подвергали аффинной хроматографии на АТР-сефарозе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лихтенштейн Г. И. (1974). Метод спиновых меток в молекулярной биологии, «Наука», М.
2. Зеленин А. В. (1961). Взаимодействие аминокпроизводных акридина с клеткой, «Наука», М.
3. Борисова О. Ф., Суровая А. Н. (1973) Молекулярная биология. Физические методы в молекулярной биологии. Под ред. Волькенштейна М. В. и Болотина И. А., том I, стр. 141—196, ВИНТИ, М.
4. Benesch R. E., Benesch R., Chi Ing Yu (1969) *Biochemistry*, 8, 2567—2571.
5. Tyuma I., Imai K., Shimizu K. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 44, 682—686.
6. Alpert Y., Bomerjee R., Denis J. (1973) *Nature*, 243, 80—82.
7. Arnone A. (1972) *Nature*, 237, 146—148.
8. Lamed R., Levin Y., Walcheik M. (1973) *Biochem. et biophys. acta*, 304, 231—235.
9. Gilcham P. T. (1971) *Methods enzym.*, 21, 191—192.
10. Caldwell P. R. B., Nagel R. L., Jaffe E. R. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 44, 1504—1509.
11. Cuadrecasas P. (1972) *Advances in enzymol.*, 36, 29—89.
12. Benesch R. E., Benesch R., Renthal R. D., Maeda N. (1972) *Biochemistry*, 11, 3576—3582.
13. Пивоваров А. П., Ершов Ю. А., Луковников А. Ф. (1966) Пластические массы, № 10, 7—9.
14. Hanes C. S., Isherwood F. A. (1949) *Nature*, 164, 1107—1112.
15. Kochetkov N. K., Shibaev V. N., Kost A. A. (1971) *Tetrahedron Letters*, 1993—1996.

Поступила в редакцию
29.VII.1974

AFFINITY LABELING OF HUMAN HEMOGLOBIN BY FLUORESCENT ETHENE DERIVATIVE OF ATP

VOROB'EV L. V., KOTEL'NIKOV A. I., KOST A. A., GVOZDEV R. I.

*Branch of Institute of Chemical Physics, Academy of Sciences
of the USSR, Chernogolovka, N. D. Zelinsky Institute
of Organic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

A new method for covalent fluorescent labeling of human hemoglobin (Hb) has been devised. The label was found to attach exclusively at the regulatory site of Hb. Based on ATP covalently bound to Sepharose 4B, for affinity chromatography of Hb a carrier has been suggested. It was used for purification of Hb and for separation of native and modified Hb. This approach affords Hb completely modified at the regulatory site.