



УДК 577.052.6:577.112.3.088.3:543.544

РАЗДЕЛЕНИЕ ФОСФОРИЛИРОВАННЫХ АМИНОКИСЛОТ МЕТОДОМ
ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ*Кумарев В. П., Митина Р. Л., Морозова Т. М.**Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Академии наук СССР, Новосибирск*

Разработан метод разделения и количественного определения фосфорилированных аминокислот (фосфосерина, фосфотреонина и фосфотирозина) высокоэффективной жидкостной хроматографией на анионообменнике «Амниохром». Этот метод позволяет оценить фосфорилирование белков по отдельным аминокислотным остаткам, а также дает возможность получить точную количественную оценку фосфорилирования белков.

Для оценки вклада отдельных протеинкиназ, в частности тирозинкиназ, в фосфорилирование белков необходимо определить, по каким аминокислотным остаткам осуществляется фосфорилирование. В настоящее время для получения такой информации используют в основном метод, описанный в работе Хантера и Сефтона [1], согласно которому фосфоаминокислоты после гидролиза [^{32}P]белка и добавления маркеров фосфоаминокислот разделяют высоковольтным двумерным электрофорезом на тонкослойных целлюлозных пластинках или — во втором направлении — хроматографией в восходящем режиме. Фосфорилированные аминокислоты проявляют нингидрином и проводят автордиографию.

Рядом авторов были предложены некоторые модификации этого метода: изменение буферных систем, pH, напряжения и времени электрофореза, а также проведение электрофореза на бумаге и измерение радиоактивности идентифицированных нингидрином фосфоаминокислот в сцинтилляторе (например, [2–7]). Некоторые из этих модификаций дают возможность получить более точные количественные оценки фосфорилирования по отдельным аминокислотам, однако исходный метод не упрощают.

В настоящей работе предлагается новый количественный микрометод хроматографического разделения фосфорилированных аминокислот.

Поскольку фосфосерин и фосфотреонин не поглощают в ультрафиолетовой области спектра, а фосфотирозин имеет относительно невысокое поглощение, для их выявления при хроматографическом разделении получали динитрофенил-производные фосфоаминокислот, которые интенсивно поглощают в области 340–350 нм (коэффициенты молярного поглощения для ряда Dnp-производных аминокислот составляют $(1,58--1,75) \cdot 10^4$ [8, 9]).

Поскольку известно, что фосфосерин и фосфотреонин в щелочных условиях более лабильны, чем фосфотирозин [10], необходимо было проверить, устойчивы ли фосфоэфирные связи фосфоаминокислот в условиях получения их Dnp-производных. Для этого мы изучали влияние условий динитрофенилирования фосфоаминокислот (0,1 М NaHCO_3 , pH 9, 40°С, 80 мин) на содержание неорганического фосфата в растворах индивидуальных фосфоаминокислот. Оказалось, что эта процедура не вызывает разрыва фосфоэфирных связей фосфоаминокислот: прироста неорганического фосфата не было обнаружено.

Разделение Dnp-производных модельной смеси фосфоаминокислот, содержащей по 5 мкг фосфосерина, фосфотреонина и фосфотирозина, проводили в нескольких хроматографических системах. Был проведен подбор оптимальных условий (величины pH, элюирующего буфера,

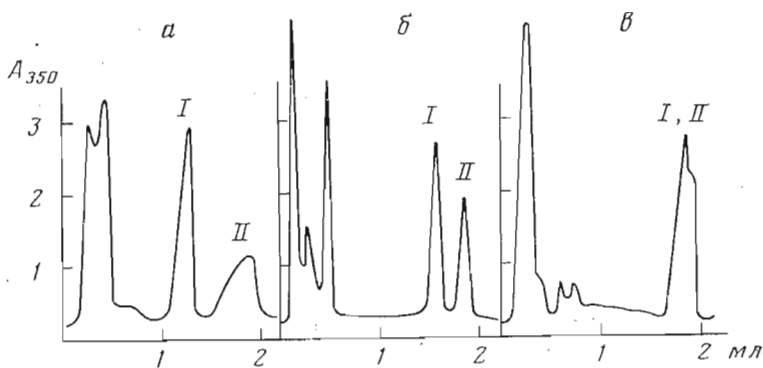


Рис. 1. Влияние pH элюирующего раствора на разделение Dnp-Ser(P) (I) и Dnp-Tyr(P) (II) на аминокроме в градиенте концентрации NaCl (0—0,2 М, 2,1 мл) в Na-ацетатном буфере, pH 4 (а), 3,5 (б), 3 (в). Размер частиц сорбента 10 мкм. Объем колонки 200 мл

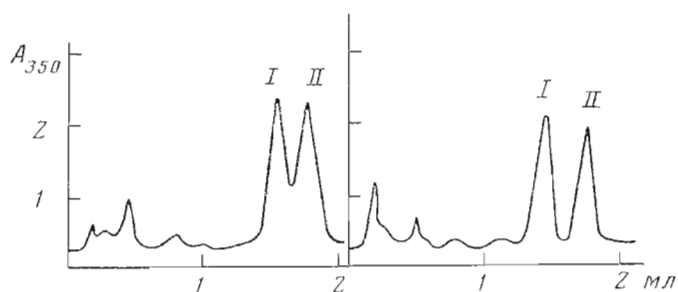


Рис. 2. Разделение Dnp-Ser(P) (I) и Dnp-Tyr(P) (II) на аминокроме с размером частиц 15 (а) и 10 мкм (б). Условия см. подпись к рис. 1, pH элюирующего буфера 3,5

размера частиц сорбента) (рис. 1, 2). Установлено, что Dnp-производные фосфоаминокислот достаточно хорошо разделяются при элюции их в градиенте концентрации NaCl (0—0,2 М) в Na-ацетатном буфере, pH 3,5—4; при pH 3 соединения не разделялись. Это можно объяснить тем, что при значениях pH более низких, чем 3,5, фосфомоноэфиры находятся в виде фосфомоноанионов и в этих условиях различия pK соответствующих Dnp-производных недостаточны для их разделения на анионообменных сорбентах, имеющих сильное сродство к фосфомоноэфирам [11]. Как видно из рис. 2, лучшее разделение происходит при использовании сорбента с меньшим размером частиц.

Хорошее разделение на модельной смеси Dnp-производных фосфоаминокислот было получено также и при их элюции в градиенте концентрации KH_2PO_4 (0—0,2 М), pH 4,2 (рис. 3).

На основании полученных результатов было проведено разделение меченных ^{32}P фосфотреонина, фосфосерина и фосфотирозина гидролизата ядерных белков опухолей молочных желез. После фосфорилирования ядерных белков эндогенными протеинкиназами в присутствии $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$, гидролиза белка и добавления немеченых фосфоаминокислот осуществляли процедуру динитрофенилирования и Dnp-производные разделяли на аминокроме в градиенте концентрации KH_2PO_4 (0—0,2 М) (рис. 4а). При этом Dnp-производные нефосфорилированных аминокислот гидролизата элюируются водой почти без удерживания. Определение радиоактивности отдельных хроматографических фракций показало, что происходит полное отделение получаемых Dnp-фосфоаминокислот от меченых полифосфатов и неорганического фосфора, которые образуются в условиях гидролиза белка (6 н. HCl, 110° С, 2 ч) из неизрасходованной $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$. Как видно из рис. 4а, б, меченые полифосфаты и неорганический фосфор

Рис. 3. Разделение 2,4-динитрофенил-производных Thr(P) (I), Ser(P) (II) и Tyr(P) (III) на аминохроме в ступенчатом градиенте концентрации KH_2PO_4 , pH 4,2 (H_2O — 700 мкл, 0,1 M — 700 мкл, 0,2 M — 700 мкл). Скорость элюции 100 мкл/мин. Размер частиц сорбента 5 мкм. Стрелки указывают смену буферного раствора.

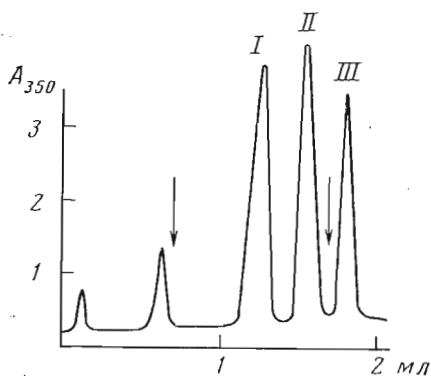


Рис. 3

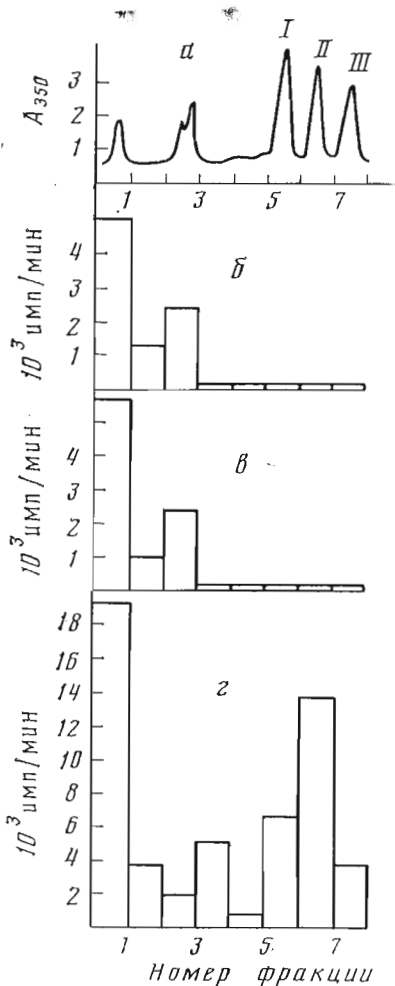


Рис. 4

Рис. 4. Хроматографический анализ динитрофенилированного гидролизата [^{32}P]белков ядер опухолевых клеток на аминохроме (условия см. рис. 3, объем фракции 250 мкл): хроматограмма Dnp-производных фосфоаминокислот; пики I—III отвечают соответственно Thr(P), Ser(P) и Tyr(P), добавленным в гидролизат до динитрофенилирования (см. «Экспер. часть») (а); профили радиоактивности гидролизата инкубационной смеси в отсутствие белка (б); гидролизата полной инкубационной смеси без проведения реакции фосфорилирования белков (в); после проведения реакции фосфорилирования белков (г)

элюируются в первых фракциях (1—3), а радиоактивность фракций 6—8, в которых элюируются Dnp-производные фосфоаминокислот, не превышает фона. Введение в инкубационную смесь белка (без проведения реакции фосфорилирования) не изменяет профиль радиоактивности: радиоактивность фракций фосфоаминокислот (6—8) в этом случае также не превышает фона (рис. 4в). Только после проведения реакции ферментативного фосфорилирования белков [γ - ^{32}P]АТФ обнаруживается высокая радиоактивность (10^3 — 10^4 имп/мин) во фракциях 6—8, где элюируются Dnp-производные фосфосерина, фосфотреонина и фосфотирозина (рис. 4г).

Таким образом, предложенный метод позволяет быстро и эффективно разделять фосфорилированные аминокислоты и дает возможность получать точную количественную оценку общего фосфорилирования белков и количественно определить, по каким аминокислотным остаткам (серина, треонина или тирозина) происходит фосфорилирование белка.

Экспериментальная часть

В работе использовали фосфосерин, фосфотреонин, фосфотирозин (Sigma, США); 2,4-динитро-1-фторбензол синтезирован в ИЦиГ СО АН СССР; сорбент «Аминохром» на основе микропористых силикохромов С-80 (размер частиц 5–10 мкм, размер пор 8 нм) изготовлен в НГУ и ИЦиГ СО АН СССР; [γ - 32 P]АТР (ВПО, Изотоп, СССР, уд. акт. 1000 Ки/ммоль); остальные реактивы отечественного производства квалификации х.ч. и ч.д.а.

Применяли фильтры GF/C (Whatman, Англия); хроматограф «Милихром» (НПО, Научприбор, СССР), радиометр Minibeta (ЛКВ, Швеция). Мыши линии GR разведения вивария ИЦиГ СО АН СССР.

1. *Анализ стабильности фосфоэфирной связи.* Растворы фосфоаминокислот (0,2 мг в 0,5 мл 0,1 М NaHCO_3 , pH 9) выдерживали 80 мин при 40° С и измеряли количество свободного фосфата по методике [12]. Контролем служили такие же растворы фосфоаминокислот, в которых свободный фосфат определяли без предварительной инкубации.

2. *Фосфорилирование белков, гидролиз и получение Dnp-производных фосфоаминокислот.* Ядра клеток опухолей молочных желез мышей линии GR и экстракт ядерных белков 0,35 М NaCl получали по методу, приведенному в работе [13].

Фосфорилирование ядерных белков эндогенными протеинкиназами проводили в буферном растворе 25 мМ KH_2PO_4 (pH 6,8), 10 мМ MgCl_2 , содержащем в 200 мкл 15 мкКи [γ - 32 P]АТР и 40 мкг белка, в течение 5 мин при 30° С со встряхиванием. Реакцию останавливали добавлением 1 мл охлажденной 30% трихлоруксусной кислоты, через 5 мин осажденные белки отделяли центрифугированием в течение 15 мин при 2500 g. Осадки промывали 1 мл ацетона и центрифугировали 10 мин при 2500 g.

Осажденный белок гидролизовали 300 мкл 6 н. HCl в течение 2 ч при 110° С в атмосфере аргона. Гидролизат белка упаривали досуха при 40° С в вакууме.

Для получения Dnp-производных пробы растворяли в 40 мкл 0,1 М NaHCO_3 (pH 9) и добавляли по 5 мкл раствора немеченых фосфоаминокислот с концентрацией 1 мг/мл в 0,1 М NaHCO_3 (pH 9) и 15 мкл 4% раствора 2,4-динитро-1-фторбензола (20-кратный избыток) в абсолютном спирте. Пробы встряхивали в темноте в течение 80 мин при 40° С, затем в реакционную смесь добавляли 100 мкл ледяной уксусной кислоты до прекращения выделения CO_2 и установления pH около 3. Избыток 2,4-динитро-1-фторбензола экстрагировали хлороформом 3 раза по 200 мкл. Полученные растворы Dnp-производных фосфоаминокислот хранили в темноте. Так же получали и Dnp-производные фосфоаминокислот модельной смеси, внося в инкубационную смесь по 5 мкг фосфосерина, фосфотреонина и фосфотирозина и 15 мкл 2% спиртового раствора 2,4-динитро-1-фторбензола.

3. *Высокоэффективную жидкостную хроматографию* проводили на колонках (2×60 мм) объемом 200 мкл с использованием хроматографа «Милихром». Колонки заполняли 1% водной суспензией анионообменника «Аминохром» под давлением 200 атм, затем последовательно промывали 300 мкл 0,2 М KH_2PO_4 и 300 мкл H_2O . На колонки в объеме 50–60 мкл наносили или модельную смесь Dnp-производных фосфоаминокислот, или Dnp-производные гидролизата белка вместе с модельной смесью. Элюцию Dnp-фосфоаминокислот осуществляли в ступенчатом градиенте KH_2PO_4 (700 мкл H_2O ; 700 мкл 0,1 М KH_2PO_4 и 700 мкл 0,2 М KH_2PO_4) со скоростью 100 мкл/мин. Все растворы предварительно фильтровали через фильтры GF/C.

Определение радиоактивности во фракциях производили в диоксановом сцинтиляторе с эффективностью счета 93%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hunter T., Sefton B. M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, № 3, p. 1311–1315.
2. Chang W. C., Lee M. L., Chou C. K., Lee L. C. Anal. Biochem., 1983, v. 132, № 2, p. 342–344.

3. Carlin C. R., Knowles B. B. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1982, v. 79, № 16, p. 5026-5030.
4. Carpenter G., King L., Cohen S. J. Biol. Chem., 1979, v. 254, № 11, p. 4884-4891.
5. Ghosh-Dastidar P., Fox C. F. J. Biol. Chem., 1984, v. 259, № 6, p. 3864-3869.
6. Cooper J. A., Sefton B. M., Hunter T. Meth. in Enzymol., 1983, v. 99, p. 387-402.
7. Kasuga M., Zick Y., Blith D. L., Karlsson F. A., Haring H. U., Kahn C. R. J. Biol. Chem., 1982, v. 257, № 17, p. 9891-9894.
8. Schroeder W. A. J. Amer. Chem. Soc., 1952, v. 74, № 20, p. 5118-5124.
9. Acaruanu B. C. Новые методы биохимической фотометрии. М.: Наука, 1965, с. 175.
10. Cooper J. A., Hunter T. Mol. Cell Biol., 1981, v. 1, № 2, p. 165-178.
11. Ошевский С. И., Грачев М. А., Мустаев А. А. Биоорг. химия, 1983, т. 9, № 7, с. 958-965.
12. Fiske C. H., Subbarow Y. J. Biol. Chem., 1925, v. 66, № 2, p. 375-400.
13. Mednieks M. I., Jungmann R. A. Arch. Biochem. and Biophys., 1982, v. 213, № 1, p. 127-138.

Поступила в редакцию
26.II.1985

После доработки
3.VII.1985

SEPARATION OF PHOSPHORYLATED AMINO ACIDS BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

KUMAREV V. P., MITINA R. L., MOROZOVA T. M.]

*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the
Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

A HPLC method which makes possible the measurement of ^{32}P incorporation into specific amino acid residues (Ser, Thr, Tyr) is described. The method is simpler than the wide-spread two-dimensional electrophoretic analysis of phosphoamino acids. It can be used for studying various protein kinases, first of all tyrosin kinases, in phosphorylation of proteins, obtaining exact data on overall protein phosphorylation, and estimating quantitatively the phosphorylation of each amino acid residue.