



УДК 577.112.824.012

ВЛИЯНИЕ ОСТАТКА Arg⁷⁴ НА ФОРМИРОВАНИЕ СТРУКТУРЫ С-КОНЦЕВОГО ДОМЕНА ПАРВАЛЬБУМИНА III ЩУКИ*Медведкин В. Н., Митин Ю. В., Шерляков Е. А.***Институт белка Академии наук СССР, Пушкино Московской обл.;
Институт биофизики Академии наук СССР, Пушкино Московской обл.

С целью выяснения роли остатка Arg⁷⁴ парвальбумина III щуки в поддержании вторичной структуры С-концевого домена и изучения способности последнего связывать кальций получен полусинтетический фрагмент 74–108, содержащий остаток Arg на N-конце. Этот фрагмент имеет более высокую константу связывания кальция (1670 M⁻¹) и более выраженное изменение удельной эллиптичности, индуцированное связыванием Ca²⁺, чем фрагмент 75–108. Таким образом, добавление всего одной аминокислоты к С-концевому домену парвальбумина приводит к существенному изменению его свойств.

Парвальбумины — хорошо известный класс низкомолекулярных белков, способных связывать ионы Ca²⁺ и Mg²⁺ и содержащихся в большом количестве в саркоплазме позвоночных [1, 2]. Известны аминокислотные последовательности более чем 10 парвальбуминов, анализ которых выявляет высокую степень гомологии между ними [3]. Рентгеноструктурный анализ одного из них, парвальбумина карпа, рI 4,25 [4], показал, что молекула состоит из шести α -спиральных участков (A–F), две пары которых (CD и EF) вместе с соединяющими их петлями формируют два кальцийсвязывающих участка с очень высоким сродством к кальцию (CD- и EF-участки). Одним из наиболее важных участков, ответственных за формирование третичной структуры парвальбуминов, является инвариантный для всех парвальбуминов солевой мостик между Arg⁷⁵ и Glu⁸¹*, расположенный в EF-участке. Модификация этого единственного в молекуле остатка аргинина 1,2-циклогександионом приводит к значительному снижению способности белка связывать ионы кальция [5].

Известно несколько публикаций по изучению кальцийсвязывающих свойств фрагментов парвальбуминов [6–8]. Такие исследования дают информацию о структуре белка, взаимодействии между различными частями молекулы и структурных взаимодействиях внутри оставшейся недеградированной части нативной структуры. Установлено, что выделенный после расщепления трипсином EF-кальцийсвязывающий участок 76–108 парвальбуминов карпа, рI 4,25 и 4,47, имеет очень низкое сродство к ионам Ca²⁺ [6,7]. Методом ультрафильтрации определена константа связывания кальция фрагментом 76–108 парвальбумина карпа рI 4,25, которая составляет 330 M⁻¹ [8]. Однако расщепление парвальбумина трипсином по остатку Arg⁷⁵ приводит к разрушению функционально важного солевого мостика между остатками Arg⁷⁵ и Glu⁸¹. Можно предположить, что реконструкция инвариантной для всех парвальбуминов пары Arg⁷⁵ и Glu⁸¹ на N-конце EF-фрагмента парвальбумина существенно улучшит его кальцийсвязывающие свойства. Осуществить такую реконструкцию можно, присоединив к N-концу EF-фрагмента остаток аргинина, используя полусинтетические методы пептидной химии.

Настоящая работа посвящена сравнительному изучению кальцийсвязывающей способности EF-фрагмента парвальбумина III щуки, содержащего и не содержащего остаток аргинина на N-конце**.

* Нумерация остатков в парвальбумине карпа, рI 4,25. В парвальбумине III щуки остатки Arg⁷⁴ и Glu⁸⁰ ([3], с. 74–78).

** Предварительные данные опубликованы ранее [9, 10].

Для получения EF-фрагмента парвальбумин III щуки модифицировали по ϵ -аминогруппам остатков лизина* и расщепляли трипсином по единственному в молекуле остатку Arg⁷⁴. Полученную смесь разделяли на колонке с сефадексом G-75 на две фракции. N-Концевой анализ показал отсутствие аминокрупп в первой из них.

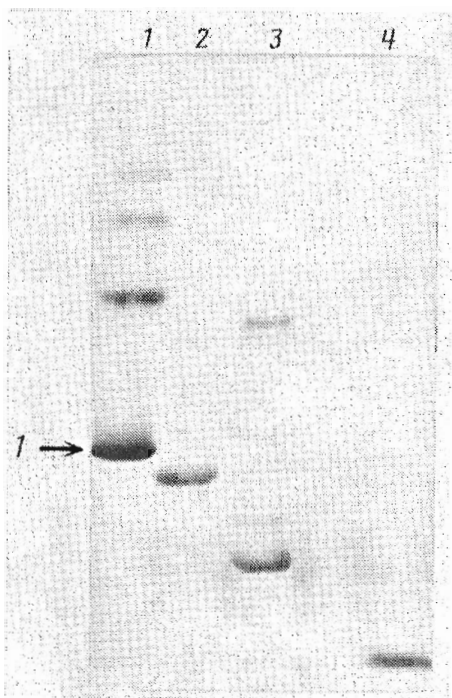


Рис. 1. Гель-электрофорез в присутствии SDS Вос₁₈-парвальбумина III щуки (2) и продуктов его трипсинолиза: Вос₁₄-фрагмента 1-74 (3) и ϵ -Вос₄-фрагмента 75-108 (4). 1 - маркер M_r 14 000, положение указано стрелкой

нилаланиновой флуоресценции фрагментов и белков с использованием методики, описанной в работе [12].

Парвальбумин III щуки содержит 9 фенилаланиновых остатков на молекулу белка и не имеет ни остатков триптофана, ни остатков тирозина [11]. Собственная флуоресценция белка и его фрагментов обусловлена исключительно эмиссией остатков фенилаланина. Их спектры флуоресценции практически совпадают со спектрами флуоресценции фенилаланина. Увеличение концентрации ионов кальция приводит к росту квантового выхода флуоресценции фрагментов 74-108 и 75-108 (рис. 2). Совершенно очевидно, что кривая титрования фрагмента 74-108 достигает плато при более низких концентрациях Ca²⁺, чем аналогичная кривая для фрагмента 75-108.

Изменения флуоресценции имеют место при миллимолярных концентрациях Ca²⁺, хотя концентрация фрагментов была 0,4-0,5 мМ. Это означает, что константы связывания ионов кальция для этих фрагментов низки. Эти константы, рассчитанные по простейшей одноступенчатой схеме, составляют 1670 ± 100 и 220 ± 50 М⁻¹ для фрагментов 74-108 и 75-108 соответственно, т. е. добавление единственного остатка аргинина к фрагменту 75-108 увеличивает его сродство к иону кальция примерно на порядок.

Из спектров КД пептидов в присутствии и в отсутствие ионов кальция видно (рис. 3), что эллиптичность при 222 нм, характеризующая степень спиральности, имеет большее абсолютное значение для пептида 74-

Это, а также результаты электрофоретического анализа (рис. 1) и анализа аминокислотного состава в сравнении с данными [6] позволили идентифицировать продукт как ϵ -Вос₁₄-фрагмент 1-74. Продукт второго (меньшего) пика имел на N-конце остаток аспарагиновой кислоты и по аминокислотному составу соответствовал ϵ -Вос₄-фрагменту 75-108 парвальбумина III щуки [6]. Полученный фрагмент 75-108 был наращен с N-конца с помощью Z-Arg(Z₂)-ONSu с получением Z-Arg(Z₂)-Вос₄-фрагмента 74-108. Снятием защитных групп были получены требуемые для сравнительного изучения фрагменты 1-74, 75-108 и 74-108.

Кальцийсвязывающие свойства полученных фрагментов сравниваются с кальцийсвязывающими свойствами исходного белка и белка, модифицированного 1,2-циклогександионом по остатку аргинина. Такое сравнение позволяет определить порядок изменения кальцийсвязывающих свойств в результате тех или иных структурных изменений в молекуле парвальбумина и его фрагментах. Привлекать результаты, представленные в работах [5-8], сложно, так как константы связывания кальция в этих работах определены разными методами. В настоящем сообщении эти константы измерены одним методом - по фенилаланиновой флуоресценции фрагментов и белков с использованием

* α -Аминогруппа белка ацетилирована [11].

Рис. 2. Флуориметрическое титрование ионами Ca^{2+} фрагментов 74–108 (1) и 75–108 (2) парвальбумина III щуки. Концентрация фрагментов 0,4–0,5 мМ; 50 мМ трис-НСl; рН 7,5; 20° С. q – квантовый выход флуоресценции

Рис. 3. КД-спектры фрагментов парвальбумина III щуки 74–108 (а) и 75–108 (б) в присутствии (1) (10 мМ Ca^{2+}) и в отсутствие (2) (5 мМ EGTA) ионов кальция. Концентрация фрагментов 0,08 мМ; 50 мМ трис НСl; рН 7,3; 20° С

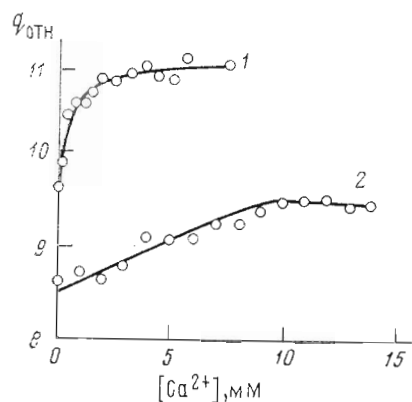


Рис. 2

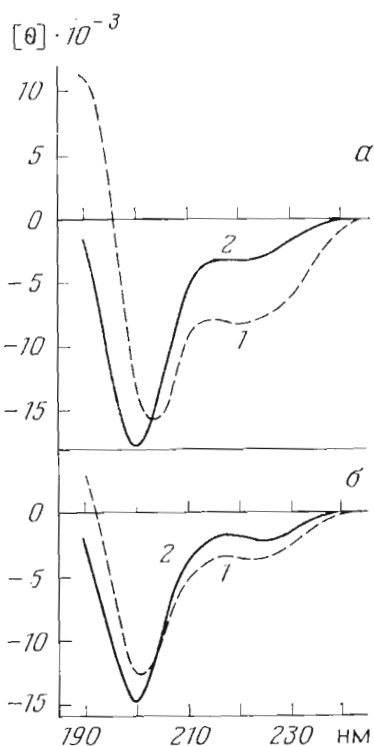


Рис. 3

108, чем для пептида 75–108. Более того, изменение эллиптичности, индуцированное связыванием Ca^{2+} , имеет для пептида, содержащего остаток аргинина, более выраженный характер.

Любое изменение в нативной структуре парвальбумина ведет к понижению его сродства к ионам кальция (таблица). Даже фрагмент 38–108*, который содержит интактные CD- и EF-кальцийсвязывающие участки, как было показано и ранее [13], связывает Ca^{2+} с гораздо более низкой константой, чем нативный белок. Этим фрагменты парвальбумина отличаются от некоторых фрагментов тропонина С [14], содержащих два кальцийсвязывающих участка и имеющих более высокую константу связывания кальция, чем исходный белок. Фрагменты парвальбумина, содержащие только один кальцийсвязывающий участок, имеют наименьшее сродство к ионам Ca^{2+} .

Результаты нашей работы ясно показывают, что остаток Arg^{74} парвальбумина III щуки играет важную структурную роль даже в коротком EF-фрагменте. Добавление остатка аргинина к фрагменту 75–108 приводит к увеличению степени спиральности EF-фрагмента. Можно предположить, что такое изменение свойств EF-фрагмента вызвано взаимодействием положительно заряженной гуанидиновой группировки Arg^{74} с отрицательно заряженным карбоксил-ионом остатка Glu^{80} .

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали трипсин, обработанный 1-тозиламидо-2-фенилхлорметилкетон (Worthington, США); диэтилопропилфторфосфат, EGTA, EDTA, *трет*-бутилкарбазат, 1,2-дихлороэтанон (Fluka, Швейцария), трикарбобензоксикарбонин (Reanal, Венгрия), дихлороэксилкарбодимид и N-гидроксисукцинимид (Fluka, Швейцария), необходимые для получения Z-Arg(Z_2)-ONSu.

Для осуществления хроматографических процессов применяли сорбенты фирмы Pharmacia (Швеция), реагенты для гель-электрофореза – производства Bio-Rad (США).

Все органические растворители и жидкие органические реагенты использовали свежеперегнанными.

Буферные растворы готовили из соединений квалификации х.ч. и перед исполь-

* Получен нами по методике работы [13]; эксперимент не приведен.

**Равновесные константы связывания кальция нативного и модифицированного
1,2-циклогександионом парвальбумина III щуки и его фрагментов при 20° С,
измеренные по фенилаланиновой флуоресценции ***

Белок (фрагмент)	CD-участок K_1 , М ⁻¹	EF-участок K_2 , М ⁻¹	Буферный раствор
Парвальбумин III щуки	$3,4 \cdot 10^8$	$6,3 \cdot 10^8$	А, Б
Белок после модификации 1,2-цикло- гександионом	$5,8 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^2$	Б
Фрагмент 75-108	—	220	А
74-108	—	1670	А
38-108	$3,9 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^6$	А, Б
1-74	$4,0 \cdot 10^3$	—	А

* Измерены в 0,05 М трис-НСl-буфере, рН 7,5 (А); 0,05 М Na-борате, рН 7,4 (Б).

зованием фильтровали через мембранные фильтры Sinpor № 3 (Чехословакия). В работе использовано хроматографическое оборудование производства LKB (Швеция). Детектирование осуществляли при λ 220 и 256 нм.

Выделение и очистку парвальбумина III из белых мышц щуки и аминокислотный анализ белка и фрагментов проводили как описано ранее [13, 15]. Константы связывания кальция определяли методом фенилаланиновой флуоресценции [12]. Концентрации белков и фрагментов определяли спектрофотометрически. Для парвальбумина III щуки $\epsilon_{259} = 1810 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, для фрагментов использовали расчетные значения молярного коэффициента поглощения, исходя из количества остатков фенилаланина. В Na-боратном буфере концентрацию определяли, кроме того, исходя из содержания азота в растворе белка или фрагмента, при этом получили хорошую сходимость значений концентраций, измеренных двумя методами. Спектры КД измеряли при 20° С на спектрополяриметре JASCO J-41A (Япония).

Градиентный SDS-диск-электрофорез проводили по методу [16].

Анализ N-концевых аминокислот осуществляли с помощью дансилхлорида по методике, описанной в работе [17].

Образцы обессоливали на колонке (1,6×50 см) с сефадексом G-25, уравновешенным 0,05 М NH_4HCO_3 , рН 8,0.

Ионы кальция удаляли из образцов по методике, описанной в работе [2].

Обработку экспериментальных данных и расчет констант связывания кальция проводили с использованием ЭВМ М-4030 (Marquardt's-алгоритм) [18] с использованием набора констант связывания Ca^{2+} -EGTA [19].

Модификация ϵ -аминогрупп остатков лизина парвальбумина III щуки Вос-азидом *. 600 мг парвальбумина III щуки (50 мкмоль, 900 мкмоль по ϵ -аминогруппам) растворили в 70 мл 50% пиридина в воде. Добавили 1 мл 0,1 М EGTA, 1 мл триэтиламина и 1 мл Вос-азиды. Через 24 ч ϵ -аминогруппы остатков лизина полностью модифицируются (контроль с помощью дансилхлорида). Реакционную смесь перенесли на колонку (5×50 см) с сефадексом G-75, уравновешенным 0,05 М NH_4HCO_3 , рН 8,0, и элюировали со скоростью 120 мл/ч. Модифицированный белок выходит почти со свободным объемом колонки. После лиофилизации получили 470 мг белка.

Расщепление модифицированного белка трипсином. 60 мг (5 мкмоль) модифицированного парвальбумина III щуки растворили в 10 мл 0,2 М NaHCO_3 , рН 8,5, добавили 1 мг трипсина и инкубировали 4 ч при 36,5° С. Процесс расщепления контролировали, отбирая аликвоты по 100 мкл, которые дебиологизовали 200 мкл безводной трифторуксусной кислоты. Аликвоты лиофилизировали, растворяли в 200 мкл 0,05 М NH_4HCO_3 , добавляли 2 мл ацетона и центрифугировали при 5000 об/мин. Ацетон сливали, пленку образца растворяли в электродном буфере в течение 1 ч при 60° С и проводили электрофорез в стандартных условиях. По окончании трипсинолиза в реакционную смесь добавили 1 мкл диизопропилфторфосфата, инкубировали еще 30 мин и затем хроматографировали на колонке (1,5×90 см) с сефадексом G-75, уравновешенным 0,05 М NH_4HCO_3 , рН 8,0. Собирали фракции по 3 мл. Получили две объединенные фракции. Первая (42 мг) не имела α -аминогруппы, аминокислотный состав полностью соот-

* Методика является усовершенствованным вариантом методики введения Вос-группы в белки, описанной в работе [20].

ветствует фрагменту 1—74 [6]. Вторая имела на N-конце остаток Asp и аминокислотный состав: Asp 6,3 (6); Glu 4,4 (4); Thr 2,8 (3); Gly 3,1 (3); Ala 5,2 (5); Val 1,0 (1); Leu 2,8 (3); Ile 1,9 (2); Phe 2,0 (2); His 0,8 (1); Lys 4,2 (4). Продукт второго пика подвергли дополнительной очистке на колонке (1×8 см) с DEAE-сефадексом А-25, уравновешенным 0,015 М трис-НСl, рН 7,3, в градиенте 0—3,0 М КСl. После обессоливания и лиофилизации получили 10 мг пептида, представляющего собой ε-Вос₄-фрагмент 75—108 парвальбумина III щуки.

Присоединение Z-Arg(Z₂)-ONSu к ε-Вос₄-фрагменту 75—108 парвальбумина III щуки. 20 мг модифицированного фрагмента растворили в 2 мл 0,1 М NaHCO₃, охладили до 4°С и добавили 150 мг Z-Arg(Z₂)-ONSu [21] в 2 мл диоксана. Реакционную смесь перемешивали 12 ч и затем обессолили. Обессоленный фрагмент отделили, фракцию низкомолекулярных продуктов сконцентрировали лиофилизацией и повторно обессолили, так как из-за высокой вязкости реакционной среды значительная часть фрагмента не отделяется от низкомолекулярных веществ. После лиофилизации единичных фракций пептида получили 16 мг Z-Arg(Z₂)-ε-Вос₄-фрагмента 75—108 парвальбумина III щуки.

Деблокирование полусинтетического фрагмента. 15 мг Z-Arg(Z₂)-ε-Вос₄-фрагмента 75—108 в 5 мл 50% трифторэтилового спирта деблокировали гидрированием над палладием в присутствии 0,5 г формиата аммония в течение 36 ч. Частично деблокированный пептид выпадает в виде геля, поэтому перед отделением палладия пептид разбавили 0,05 М NH₄НСO₃ до растворения геля (~50 мл), отфильтровали, фильтрат лиофилизовали и снимали Вос-защиту в 1 мл свежеперегнанной трифторуксусной кислоты при 0°С в течение 40 мин. Разбавили 50 мл 0,25 М NH₄НСO₃, лиофилизовали, обессолили, нанесли на колонку (1×7 см) с SP-сефадексом С-25, уравновешенным 0,025 М глицин-НСl, рН 2,5, и хроматографировали в градиенте 0—0,5 М КСl. Пептид выходит во фракции 0,25 М КСl. После обессоливания фракции и лиофилизации получили 4,5 мг фрагмента 74—108 парвальбумина III щуки. Пептид имеет единственную α-аминогруппу аргинина и не содержит даже следовых количеств аспарагиновой кислоты на N-конце. По аминокислотному составу пептид соответствует фрагменту 74—108, соотношение Arg — Val 0,95 : 1,00.

Деблокирование ε-Вос₄-фрагмента 75—108 парвальбумина III щуки. 10 мг пептида деблокировали в 1 мл трифторуксусной кислоты при 0°С в течение 40 мин. Затем реакционную смесь разбавили 50 мл 0,05 М NH₄НСO₃, рН 8,0, лиофилизовали и обессолили. Полученный препарат хроматографировали на колонке (1×7 см) с DEAE-сефацелом А-25, уравновешенным 0,015 М трис-НСl, рН 7,3, в градиенте 0—0,7 М ацетата натрия. Основную фракцию обессолили и хроматографировали на колонке (1×7 см) с SP-сефадексом С-25 как описано выше. В этих условиях пептид выходит до начала формирования градиента. Фракцию, соответствующую пептиду, обессоливали и лиофилизовали. Получили 5,5 мг фрагмента 75—108 парвальбумина III щуки, гомогенного по N-концевому анализу.

Модификация остатка Arg⁷⁴ в парвальбумине III щуки 1,2-циклогександионом. 25 мг (2 мкмоль) парвальбумина III щуки растворили в 2 мл 0,2 М Na-боратного буфера, рН 7,4, и добавили 45 мг (0,4 ммоль) 1,2-циклогександиона и 0,2 мл 0,1 М Na₂-EDTA. Перемешивали 20 ч при 20°С. Белок отделили от избытка циклогександиона на колонке (1,5×50 см) с сефадексом G-25, уравновешенным 0,2 М Na-боратным буфером, рН 7,4 (см. [22]). Фракции, соответствующие белку, объединили, разбавили тем же буфером до требуемой концентрации и использовали для измерения спектров флуоресценции. Для сравнения параллельно производились измерения немодифицированного белка в том же буфере.

Авторы выражают благодарность С. В. Вережке (Институт биохимии АН УССР) за помощь в работе по модификации белка 1,2-циклогександионом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Baron G., Demaille J., Dutrige E. FEBS Lett., 1975, v. 56, № 1, p. 156-160.
2. Blum H. E., Lehky P., Kohler L., Stein E. C., Fischer E. H. J. Biol. Chem., 1977, v. 252, № 9, p. 2834-2838.
3. Пермяков Е. А. Парвальбумины и родственные кальцийсвязывающие белки. М.: Наука, 1985. 191 с.
4. Kreltsinger R. H., Nockolds C. E. J. Biol. Chem., 1973, v. 248, № 9, p. 3313-3326.
5. Gosselin-Rey C., Bernard N., Gerday Ch. Biochim. et biophys. acta, 1973, v. 303, № 1, p. 90-104.
6. Maximov E. E., Mitin Yu. V. Studia biophys., 1976, v. 60, № 2, p. 149-156.
7. Coffe C. J., Solomo C. Biochim. et biophys. acta, 1976, v. 453, № 1, p. 67-80.
8. Detancourt J., Haicsh J., Pechere J. F. Biochim. et biophys. acta, 1978, v. 532, № 2, p. 373-375.
9. Медведекин В. Н., Митин Ю. В., Пермяков Е. А. Тез. 16 конф. ФЕБО. М., 1984, с. 328.
10. Медведекин В. Н., Митин Ю. В., Пермяков Е. А. Тез. VI Всесоюз. симп. химии белков и пептидов. Рига, 1983, с. 116-117.
11. Frankenne F., Joassin L., Gerday Ch. FEBS Lett., 1973, v. 35, № 1, p. 145-147.
12. Permyakov E. A., Burstein E. A., Sawada Y., Jamazaki J. Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 491, № 1, p. 149-154.
13. Maximov E. E., Mitin Yu. V. Biochemic, 1979, B. 61, № 7, p. 751-754.
14. Gusev N. B., Barskaya N. V. Biochem. J., 1984, v. 220, № 2, p. 315-320.
15. Bhushani Rao K. S. P., Gerday Ch. Comp. Biochem. and Physiol., 1973, v. 44B, p. 931-937.
16. Loemmler U. K. Nature, 1970, v. 227, № 5259, p. 680-685.
17. Gray W. R. Meth. Enzymol., 1972, v. 25, p. 121-138.
18. Reich J. G., Wangerman G., Falk M., Rohde K. Eur. J. Biochem., 1972, v. 26, № 2, p. 368-379.
19. Schwarzenbach G., Flaschka H. Die komplexometrische Titration. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag, 1965, S. 20.
20. Ledden D. J., Nix P. T., Warne P. K. Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 578, № 2, p. 401-412.
21. Anderson G. W., Zimmerman J. E., Callahan F. M. J. Amer. Chem. Soc., 1964, v. 86, № 9, p. 1839-1842.
22. Patty L., Smith F. L. J. Biol. Chem., 1975, v. 250, № 3, p. 565-569.

Поступила в редакцию
10.III.1986
После доработки
3.VI.1986

INFLUENCE OF THE Arg⁷⁴ RESIDUE ON THE STRUCTURAL FORMATION OF EF-DOMAIN IN PIKE PARVALBUMIN III

MEDVEDKIN V. N., MITIN Yu. V., PERMYAKOV E. A.*

*Institute of Protein Research,*Institute of Biological Physics,
Academy of Sciences of the USSR, Pushchino, Moscow Region*

Trypsinolysis of Boc-modified pike parvalbumin III results in two fragments; comprising residues 1-75 and 75-108. The fragment 75-108, after treatment with excess of Z₃ArgONSu, deblocking and purification, was transformed into semisynthetic fragment 74-108 of pike parvalbumin III. The apparent calcium binding constant of the fragment 74-108 is almost one order of magnitude higher than that of the fragment 75-108. Possible role of Arg⁷⁴ in the structural formation of EF-domain in pike parvalbumin III is discussed.