



УДК 577.15.02

**ИЗБИРАТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ
АСПАРТАТ-АМИНОТРАНСФЕРАЗЫ
1,5-ДИФТОР-2,4-ДИНИТРОБЕНЗОЛОМ****Деев С. М., Брага Э. А., Носиков В. В.,
Поляновский О. Л.***Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва*

Исследовано взаимодействие бифункционального реагента 1,5-дифтор-2,4-динитробензола с активным центром аспартат-аминотрансферазы. Показано, что при рН 7,0 карбоксиметилированный и ацилированный апофермент избирательно реагирует с дифтординитробензолом с образованием связи с остатком лизина, локализованного в активном центре. После повышения рН до 9,0 второй атом фтора бифункционального реагента замещается боковой цепью остатка цистеина или тирозина, стерически близких с ним. Расстояние между группами, вовлеченными в образование пространственного моста, составляет 5 Å.

Аспартат-аминотрансфераза из цитозоля сердечной мышцы свиньи (аспартат: 2-оксоглутарат-аминотрансфераза, КФ 2.6.1.1) — фермент, механизм действия которого весьма детально исследован, определены некоторые функционально важные группы и установлено их местоположение в первичной структуре белка [1]. Вместе с тем очевидно, что идентифицированы далеко не все группы активного центра и совершенно открытым остается вопрос о взаимном пространственном расположении функционально важных групп фермента. Одним из перспективных подходов к решению этой проблемы является использование бифункциональных реагентов. В настоящей работе предпринята попытка получения с помощью 1,5-дифтор-2,4-динитробензола ковалентных поперечных сшивок между аминокислотными остатками, находящимися в области активного центра фермента. Из ряда бифункциональных реагентов [2] дифтординитробензол более всего отвечает целям нашего исследования, поскольку размеры молекулы этого соединения не превосходят размеров пиридоксаль-5'-фосфата (пиридоксаль-*P*, кофермент аспартат-трансминазы), что благоприятствует введению реагента в активный центр. Продукты взаимодействия дифтординитробензола с различными аминокислотами поглощают в видимой области и имеют хорошо различающиеся спектры поглощения, что значительно облегчает их идентификацию.

Для модификации активного центра в холоферменте карбоксиметилировали внешние тиоловые группы [3], удаляли из него пиридоксаль-*P* и полученный апофермент инкубировали с 1,5-дифтор-2,4-динитробензолом. После удаления избытка реагента с помощью гель-фильтрации определяли остаточную ферментативную активность в присутствии избытка пиридоксаль-*P*. Как видно из рис. 1, апофермент при инкубации с дифтординитробензолом достаточно быстро терял способность реактивироваться,

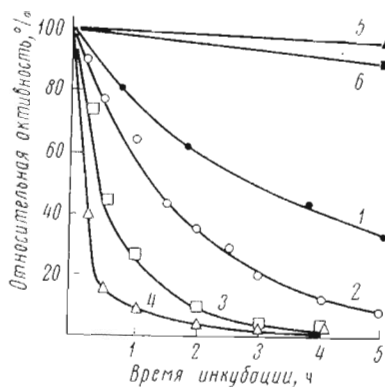


Рис. 1

Рис. 1. Инактивация карбоксиметилированной аспартат-трансминазы при обработке 1,5-дифтор-2,4-динитробензолом; концентрация фермента 0,6 мг/мл, 0,1 М фосфатный буфер.

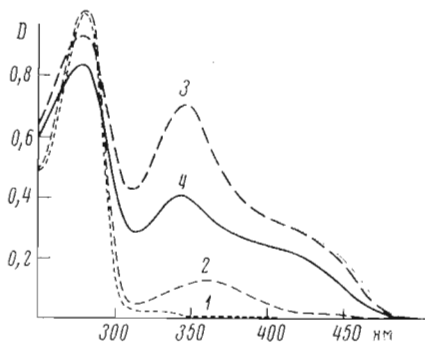


Рис. 2

Рис. 2. Спектры поглощения карбоксиметилированной аспартат-трансминазы (кривые 1,3 — апо-, 2,4 — холофермент до (1, 2) и после (3, 4) инкубации ее в течение 4,5 ч с 0,4 мМ дифтординитробензолом

Условия модификации:

Кривая	рН	Концентрация реагента, мМ
1	7,0	0,4
2	8,0	0,4
3	8,0	1,4
4	8,0	3,5
5	8,0	—
6	8,0	1,4

Рис. 2. Спектры поглощения карбоксиметилированной аспартат-трансминазы (кривые 1,3 — апо-, 2,4 — холофермент до (1, 2) и после (3, 4) инкубации ее в течение 4,5 ч с 0,4 мМ дифтординитробензолом

причем скорость инактивации уменьшалась по мере снижения рН реакционной смеси или концентрации реагента. Аналогичная обработка холофермента практически не изменяла его активности. Сравнение спектров исходных препаратов белка и модифицированных при рН 8,0 (рис. 2), а также спектров производных дифтординитробензола, выделенных из кислотных гидролизатов, со спектрами синтезированных модельных соединений и литературными данными [4] показало, что и в апо- и в холоферменте взаимодействуют главным образом лизиновые остатки. Посредством измерения приростов поглощения при 345 нм после взаимодействия препаратов белка с реагентом и отнесения их к удельному поглощению белка (280 нм) было установлено, что в холоферменте реагируют приблизительно два эквивалента лизиновых остатков на субъединицу, а в апоферменте взаимодействует еще один лизин или другая группа. Таким образом, неспецифическое связывание реагента в этих условиях было весьма значительным.

Чтобы повысить избирательность модификации, были блокированы ε-аминогруппы лизиновых остатков, находящиеся на поверхности белка. Для этого карбоксиметилированный фермент до отделения пиридоксаль-Р обрабатывали дикетеном или уксусным ангидридом. Эти реагенты блокируют аминогруппы ацетоацетильными или ацетильными остатками соответственно, не вводя отрицательных зарядов в молекулу белка (как в случае ангидридов дикарбоновых кислот) и, следовательно, не вызывая значительных структурных изменений. Реакция с 2,4,6-тринитробензолсульфокислотой [5] показала, что в этих условиях блокируется 8—10 ε-аминогрупп лизина. Активность таким образом модифицированного фермента остается достаточно высокой и составляет 70% от исходной при использовании дикетена и около 60% в случае уксусного ангидрида.

Из карбоксиметилированного и ацилированного белка получали апофермент и изучали его взаимодействие с 1,5-дифтор-2,4-динитробензолом

Условия модификация карбоксиметилированных и ацетоацетилованных препаратов холо- и апотрансаминазы и их характеристики

pH *	Концентрация $F_2(NO_2)_2Vz$, mM	Продолжительность инкубации, ч	Остаточная активность (после добавления пиримидоксаль-Р), %	$\lambda_{\text{макс}}$ (для апофермента), нм	$A = \frac{\Delta D_{330}}{D_{230}}$ (для холофермента)	$B = \frac{\Delta D_{330}}{D_{230}}$ (для апофермента)	Неспецифическое связывание (A/B), %
6,5	3,5	4	20	345 335 **	0,11	0,33	33
7,0	1,4	3,5	20	345 335 **	0,08	0,29	27
8,0	0,7	3,0	20	335	0,12	0,26	45
9,0	0,07	2,3	30	335	0,09	0,20	45

* Указано значение pH первой стадии модификации. На второй стадии белок после удаления избытка $F_2(NO_2)_2Vz$ инкубировали в течение 24 ч при pH 9,0.

** Значения относятся к препаратам белка после второй стадии модификации.

при различных значениях pH. При pH 6 и 6,5 взаимодействие шло медленно. Ускорение реакции за счет значительного повышения концентрации реагента приводило к снижению специфичности модификации. Для значений pH 7, 8 и 9 были подобраны такие концентрации реагента, при которых скорости инактивации были близки и достаточно высоки. Ввиду того что главной целью работы было возможно более избирательное введение реагента в активный центр, реакцию с ферментом не доводили до конца, останавливая ее, когда инактивация достигала 70—80%, так как дальнейшая инкубация вела к снижению специфичности модификации. Чтобы реакция между образующимся вначале монозамещенным производным дифтординитробензола и близлежащими функциональными группами с более высокими значениями pK прошла наиболее полно, избыток реагента удаляли, значение pH раствора повышали до 9,0 и инкубацию продолжали при этом значении pH. Эту инкубацию проводили при низкой концентрации белка (0,2 мг/мл), чтобы предотвратить образование межмолекулярных связей. Условия модификации и спектральные параметры полученных продуктов приведены в таблице. Для определения степени неспецифического связывания дифтординитробензола сравнивали удельный прирост оптической плотности при 330 нм в препаратах апо- и холофермента, модифицированных в идентичных условиях. Ввиду того что для производных дифтординитробензола характерны полосы поглощения вблизи этой длины волны и их экстинкции близки, соотношение удельных приростов оптической плотности являлось простым и достаточно четким критерием для оценки избирательности модификации. Из сопоставления степени неспецифического связывания и остаточной активности видно, что наиболее избирательно реакция протекает при pH 7,0. Кроме того, было замечено, что спектр белка, модифицированного при pH 7,0, претерпевал дальнейшие изменения при инкубации в более щелочном растворе (pH 9,0): максимум поглощения смещался от 345 к 333 нм и несколько возрастала его удельная экстинкция. Ни апо-, ни холофермент, модифицированные дифтординитробензолом при pH 8 и 9, никаких дополнительных спектральных изменений при последующей обработке (pH 9,0) не претерпевали. Причем апофермент, модифицированный при pH 8 или 9, сразу приобретал максимум поглощения при 335 нм. Из этих данных следует, что при pH 7,0 дифтординитробензол взаимодействует, по-видимому, с одной наиболее реакционной группой активного центра и только при повышении pH реакционной смеси реагирует с другой близлежащей группой с образованием сшивки. Таким образом, только при pH 7,0 и ниже взаимодействие реагента с апоферментом удалось остановить на стадии образования монозамещенного производного дифтординитробензола и разбить тем самым реакцию на две стадии. При более высоких значениях pH количе-

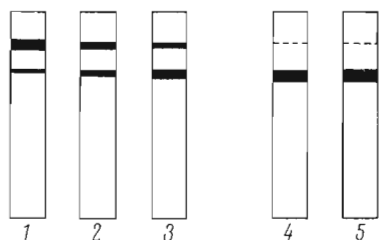


Рис. 3. Электрофорез в полиакриламидном геле в 1% растворе додецилсульфата натрия препаратов аспарат-трансаминазы, модифицированных 1,5-дифтор-2,4-динитробензолом при рН 8,0 (1-3) и при рН 7,0 (4, 5). 1, 2 и 4 — пробы содержат апофермент, 3 и 5 — холофермент. Концентрации белка в пробах (мг/мл): 1 — 0,6; 2 — 0,2; 3 — 0,2; 4 — 0,6; 5 — 0,6. Верхняя полоса соответствует димеру, нижняя — мономеру (свободной субъединице)

тельных количеств димера. Существенно, что димер содержится в продуктах модификации как апо-, так и холофермента.

Для выяснения характера функциональных групп, вовлеченных в образование пространственных мостов, модифицированный белок подвергали кислотному гидролизу. Очистку образовавшихся соединений осуществляли с помощью бумажной хроматографии и высоковольтного электрофореза. Желтый материал количественно элюировали с бумаги и изучали спектры его поглощения. Сопоставление хроматографических подвижностей и спектров поглощения производных дифтординитробензола, выделенных из кислотных гидролизатов белков, с хроматографическими и спектральными параметрами синтезированных стандартов показало, что главным продуктом взаимодействия карбоксиметилированного и ацилированного апофермента, с дифтординитробензолом при рН 7,0 является N^{ϵ} -(5-фтор-2,4-динитрофенил)лизин (рис. 4, б). Из кислотного гидролизата белка, прошедшего вторую стадию модификации (выкубания при рН 9, рис. 4, б), были выделены продукты, которые по значениям R_f и УФ-спектрам были охарактеризованы как 1-(O-тирозил)-5-(N^{ϵ} -лизил)-2,4-динитробензол (кривая 2) и 1-(S-цистеил)-5-(N^{ϵ} -лизил)-2,4-динитробензол (кривая 3), а также некоторое количество монозамещенного производного — N^{ϵ} -(5-фтор-2,4-динитрофенил)лизина (кривая 1). В кислотных гидролизатах препаратов холофермента, модифицированных в аналогичных условиях, было обнаружено незначительное количество желтого материала, не обладавшего характерными спектрами.

Таким образом, было показано, что только при рН 7,0 карбоксиметилированный и ацилированный апофермент достаточно избирательно реагирует с динитродифторбензолом с образованием (при повышении рН) только внутримолекулярных сшивок. При этом на первой стадии реакции (при рН 7,0) дифтординитробензол реагирует монофункционально с ϵ -аминогруппой лизина, локализованного в области активного центра, а затем второй атом фтора бифункционального реагента замещается боковой цепью остатков цистеина или тирозина, стереохимически близких с ним. Расстояние между ϵ -аминогруппой лизина и тиоловой группой цистеина или фенольным гидроксилом тирозина, вовлеченными в образование замещенного фенилепоного моста, составляет 5 Å.

ство реакционноспособных групп в молекуле белка больше и бифункциональный реагент может быстро взаимодействовать с двумя группами фермента. При этом возможно также образование неспецифических, в том числе и межмолекулярных, мостов, в результате чего образуются димеры, наличие которых было обнаружено с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в растворе додецилсульфата натрия. Схема электрофоретического разделения препаратов апо- и холофермента, обработанных дифтординитробензолом в различных условиях (рис. 3), показывает, что белок, который модифицировали сначала при рН 7, представляет собой в основном мономер (свободную субъединицу). Проведение же реакции при рН 8 даже при низкой концентрации белка приводит к образованию значи-

Экспериментальная часть

Аспаргат-трансминазу выделяли как описано ранее [6], ее апофермент получали по модифицированному методу Вада и Свелла [7]. Реактивацию апофермента проверяли после добавления пиридоксаль-*P* по появлению трансминазной активности, которую определяли по методу [8]. Карбоксиметилирование «внешних» тиоловых групп иодацетатом проводили в стандартных условиях [3].

Ацетоацетилирование «внешних» аминогрупп осуществляли по модифицированной методике [9, 10]. Раствор фермента (3—5 мг/мл) инкубировали со 100-кратным избытком свежеперегнанного дикетена при pH 8,5 в ячейке титратора ТТТ-11 (Radiometer, Дания) в течение 40—50 мин, после чего реакцию прекращали быстрым обессоливанием на колонке с сефадексом G-25 (средний).

Ацетилирование доступных аминогрупп проводили аналогично работе [11]. Раствор аспаргат-трансминазы (5—8 мг/мл) при 2° и интенсивном перемешивании инкубировали со 100-кратным избытком уксусного ангидрида при pH 7,8 в ячейке титратора ТТТ-11 в течение 15 мин, после чего обессоливали на колонке с сефадексом G-25 (средний).

Количество аминогрупп определяли по методу [5].

Условия модификации белка 1,5-дифтор-2,4-динитробензолом и его концентрации приведены в таблице. При всех модификациях препаратов

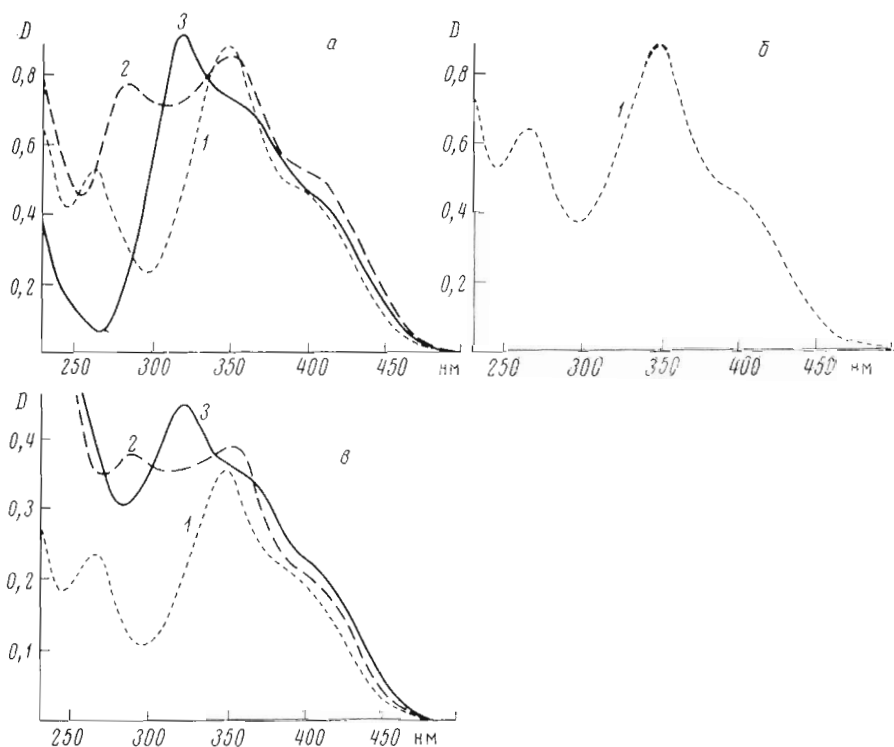


Рис. 4. Спектры поглощения в 0,01 н. HCl: а — синтетических модельных соединений N^ε-(5-фтор-2,4-динитрофенил)лизина (1), 1-(О-тирозил)-5-(N^ε-лизил)-2,4-динитробензола (2), 1-(S-цистеил)-5-(N^ε-лизил)-2,4-динитробензола (3); концентрация соединений (мг/мл): 0,027 (1, 2) и 0,025 (3); б — производных дифтординитробензола, выделенных из кислотного гидролизата карбоксиметилированного и ацилированного апофермента, модифицированного при pH 7,0; в — выделенных из кислотного гидролизата белка, прошедшего обе стадии модификации (при pH 7,0 и 9,0). Кривые на рис. 4, б, в пронумерованы в соответствии с их совпадением со спектрами модельных соединений, 4, а)

апофермента ставили параллельные опыты с холоферментом. Во всех экспериментах с дифтординитробензолом и его производными материал защищали от действия света.

N^{ϵ} -(5-фтор-2,4-динитрофенил)лизин, 1-(O -тирозил)-5-(N^{ϵ} -лизил)-2,4-динитробензол, 1-(S -цистеил)-5-(N^{ϵ} -лизил)-2,4-динитробензол были получены из соответствующих N^{α} -защищенных L -аминокислот и охарактеризованы УФ-, ИК- и ПМР-спектрами.

Производные дифтординитробензола из кислотного гидролизата белка (5,7 н. HCl, 96°, 15 ч) выделяли с помощью препаративного электрофореза (рН 6,5; 80 В/см, 40 мин) и восходящей хроматографии на бумаге (ватман 3 ММ; *втор*-бутанол — 85% муравьиная кислота — вода, 750 : 135 : 115). Соединения количественно элюировали 0,01 н. HCl. Спектры поглощения регистрировали на приборах Specord UV-Vis (ГДР) и Hitachi EPS-3T (Япония).

Авторы выражают глубокую признательность акад. А. Е. Браунштейну за постоянный интерес к данной работе и обсуждение ее результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Braunstein A. E. (1973) *The Enzymes*, pp. 379—481, Acad. Press, Inc., New York — London.
2. Wold F. (1972) In *Methods in Enzymol.*, XXV, pp. 623—651, Acad. Press, New York — London.
3. Носиков В. В., Гришин Е. В., Деев С. М., Поляновский О. Л., Браунштейн А. Е., Овчинников Ю. А. (1974) *Молекулярн. биология*, 9, 406—415.
4. Zahn H., Meienhofer J. (1958) *Makromol. Chem.*, 26, 126—152.
5. Fields R. (1972) In *Methods in Enzymol.*, XXV, pp. 464—468, Acad. Press, New York — London.
6. Поляновский О. Л., Телегди М. (1965) *Биохимия*, 30, 174—182.
7. Wada H., Snell E. E. (1962) *J. Biol. Chem.*, 237, 127—132.
8. Jenkins W. T., Yphantis D. A., Sizer J. W. (1959) *J. Biol. Chem.*, 234, 51—57.
9. Marzotto A., Pajetta P., Galrigna L., Scoffone E. (1968) *Biochim. et biophys. acta*, 154, 450—456.
10. Lindsay D. F., Shall S. (1969) *Biochem. J.*, 115, 587—595.
11. Turano C., Giartosio A., Riva F., Baroncelli V. (1967) *Biochem. J.*, 104, 970—977.

Поступила в редакцию
3.VI.1976

SELECTIVE MODIFICATION OF ASPARTATE AMINOTRANSFERASE BY 1,5-DIFLUORO-2,4-DINITROBENZENE

DEYEV S. M., BRAGA E. A., NOSIKOV V. V.,
POLYANOVSKY O. L.

*Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

The interaction between bifunctional reagent 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene (I) and the aspartate aminotransferase has been investigated. It was shown that at pH 7.0 carboxymethylated and acylated apoenzyme reacts selectively with (I) through one ϵ -amino group of a lysine residue situated within the active site. On increase in pH up to 9,0, the second fluorine atom of bifunctional reagent is substituted by a side chain of sterically adjacent cysteine or tyrosine residue. The distance between the cross-linked groups is estimated to be about 5Å.