



УДК 577.152.04

ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ *L*-АСПАРАГИНАЗЫI. НИТРО- И АМИНОТИРОЗИЛАСПАРАГИНАЗЫ *E. COLI*

*Блума Р. К., Вина И. А., Кирстукас И. П., Милман И. А.,
Гейман И. И., Жагат Р. А.*

Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига

Методом последовательной модификации тирозиновых остатков *L*-аспарагиназы *E. coli* — нитрованием тетранитрометаном, восстановлением гидросульфитом натрия, комплексированием с Cu^{2+} — установлено участие одного протонированного тирозина в каталитическом действии фермента. Обсуждаются побочные явления, вызываемые этими модификациями. По данным исследования кинетических параметров K_m и V нативной и нитроаспарагиназ высказано предположение о роли тирозина в связывании субстрата в активном центре. Приводятся сравнительные данные изменений гидролазной и трансферазной активностей *L*-аспарагиназы при модифицировании тирозина.

Тетрамерная молекула *L*-аспарагиназы *E. coli* содержит 11 остатков тирозина на субъединицу. Из них, как известно [1], два остатка с pK 10,1, по-видимому, расположены на поверхности молекулы, остальные либо спрятаны внутри молекулы, либо образуют водородные связи с другими близлежащими аминокислотными остатками. Интерес представляет один остаток тирозина с необычно низким значением pK — 8,2, что, очевидно, обусловлено особым микроокружением данного остатка. Йодирование [2] и ацетилирование *L*-аспарагиназы ацетилимидазолом [3], а также нитрование тетранитрометаном [4] вызывают понижение активности фермента, однако ввиду возможного побочного действия реагентов нельзя было сделать определенные выводы о роли остатков тирозина в действии аспарагиназы. Поэтому представляло интерес более детально изучить влияние модификации тирозина на каталитическую активность *L*-аспарагиназы *E. coli*. С этой целью было проведено трехступенчатое последовательное модифицирование фермента: нитрование тетранитрометаном с образованием остатков 3-нитротирозина, последующее восстановление 3-нитротирозина гидросульфитом натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) до 3-аминотирозина и далее комплексирование 3-аминотирозиновых остатков с двухвалентными ионами меди ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Краткое сообщение о полученных результатах представлено нами ранее [5].

Изучено влияние возрастающих концентраций тетранитрометана на степень нитрования и инактивации аспарагиназы. Как видно из табл. 1,

Сокращения: ТНМ — тетранитрометан, ДСН — додецилсульфат натрия.

Таблица 1

Степень нитрования и активность *L*-аспарагиназы при разных концентрациях тетранитрометана

C(NO ₂) ₄ /Тур, моль/моль	Число остатков Тур(3NO ₂)/моль (M 33 000)	Активность [6]	
		МЕ/мг белка	%
0	0	220,0	100
2	0,4	49,1	22,3
5	2,2	20,0	9,1
10	2,8	22,0	9,5

Таблица 2

Активность *L*-аспарагиназы при последовательной модификации остатков тирозина

Фермент	Активность	
	МЕ/мг	%
<i>L</i> -Аспарагиназа	210,0	100
[Тур(3NO ₂)]аспарагиназа	25,2	12
[Тур(3NH ₂)]аспарагиназа	113,5	54
После комплексования с Cu ²⁺	17,0	8

двукратный относительно содержания остатков тирозина молярный избыток тетранитрометана модифицирует 0,4 остатка тирозина со снижением гидролазной активности на 77,7%. При увеличении избытка реагента до 10 число 3-нитротирозинов в субъединице молекулы возрастает до ~3, а активность фермента снижается на ~90%. Дальнейшее повышение концентрации реагента практически не увеличивает число модифицируемых остатков тирозина и не понижает каталитическую активность. Поэтому в последующих опытах был использован 10-кратный молярный избыток тетранитрометана.

Изучение зависимости степени нитрования и инактивации аспарагиназы от времени предынкубации фермента с тетранитрометаном (рис. 1) показывает, что максимальное число тирозиновых остатков (2—3 на субъединицу молекулы) модифицируется в течение 60 мин. Добавление субстрата *L*-аспарагина в 300-кратном молярном избытке по отношению к ферменту непосредственно перед его обработкой тетранитрометаном меняет скорость нитрования и инактивации аспарагиназы (рис. 1). В первые 20 мин число 3-нитротирозиновых остатков в молекуле и снижение ферментативной активности в ~5 раз меньше, чем в пробе без субстрата. В дальнейшем активность падает более резко и через 60 мин достигает 20% от исходной при нитровании 1,7 остатков тирозина (остаточная активность фермента в пробах без субстрата — 9%).

Таким образом, после 1 ч нитрования аспарагиназы наблюдаемая субстратная защита фермента незначительна, чему, по-видимому, способствует, с одной стороны, недостаток субстрата вследствие одновременно протекающей реакции гидролиза *L*-аспарагина, а с другой — чрезвычайно высокая реакционная способность тетранитрометана по отношению к остатку тирозина, имеющему низкое значение *pK*, каким является один тирозин в субъединице *L*-аспарагиназы [1]. Изменение скорости нитрова-

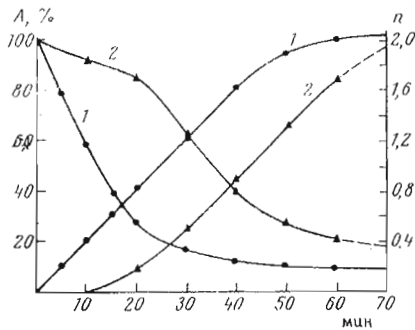


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость активности аспарагиназы (A) и числа модифицированных остатков тирозина в субъединице молекулы (n) от времени воздействия $C(NO_2)_4$ (пятикратный молярный избыток относительно Tyr) в отсутствие (1) и в присутствии субстрата (2)

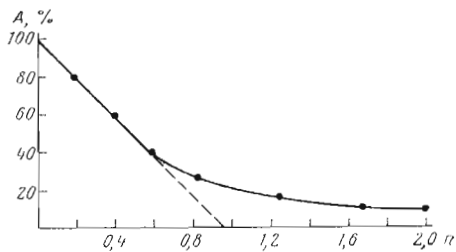


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость активности L -аспарагиназы от числа остатков $Tyr(3NO_2)$ в субъединице молекулы (M 33 000)

ния и инактивации аспарагиназы в присутствии субстрата говорит о локализации остатков тирозина в активном центре или в его близости. Экстраполяция кривой зависимости активности от числа 3-нитротирозиновых остатков показывает ответственность за каталитическую активность фермента одного остатка тирозина на субъединицу молекулы (рис. 2). Мы предполагаем, что это остаток с pK 8,2. Можно допустить, что три модифицируемых остатка тирозина представлены двумя остатками, находящимися на поверхности молекулы, и тирозином, характеризующимся низким значением pK . Однако такое предположение требует дополнительных экспериментальных доказательств.

Хэндшумахер [4] и Шифрин [2] при нитровании L -аспарагиназы наблюдали полимеризацию фермента вследствие образования ковалентных связей между субъединицами или отдельными молекулами, что независимо от нитрования тирозина снижает каталитическую активность. Это побудило нас проверить возможность образования ковалентных сшивок в условиях наших опытов. Диск-электрофорез нитроаспарагиназы в полиакриламидном геле показывает в отличие от электрофореза нативного фермента появление небольшого количества зон с замедленной подвижностью, но с сохранением основной зоны, соответствующей зоне нативного тетрамерного белка (рис. 3). Разделение модифицированной тетранитрометаном аспарагиназы на большее количество зон свидетельствует о неомогенности нитрофермента. Замедленная скорость движения мелких зон по сравнению с тетрамерной формой аспарагиназы позволяет предполагать, что они состоят из различной степени полимеризованных под влиянием тетранитрометана молекул фермента.

Ковалентную сшивку молекул нитроаспарагиназы в условиях наших опытов доказывают результаты гель-фильтрации через сефадекс G-100 с последующим электрофорезом отдельных фракций в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия. Нитроаспарагиназа при гель-фильтрации элюируется в виде двух пиков (рис. 4), показывая деление белка на фракции с различным молекулярным весом. Фракции I и II, а также нативный фермент (III, на рис. 4) в отдельности обрабатывали в течение 12 ч 1% раствором додецилсульфата натрия, вызывающим разрыв связей между субъединицами, за исключением ковалентных, образованных под влиянием тетранитрометана. Электрофорез в полиакриламидном геле с 1% концентрацией додецилсульфата, проведенный по методу Шапиро [8], показывает, что белок типа II, так же как нативный фермент, состоит из мономерной формы аспарагиназы, а белок пика I образует несколько

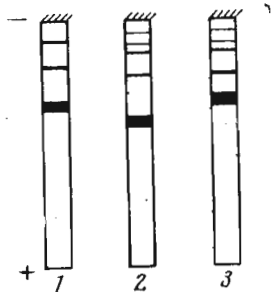


Рис. 3

Рис. 3. Электрофорез в 8% полиакриламидном геле по методу Дэвиса [7] нативной (1), $\text{Tyr}(3\text{NO}_2)$ (2) и $\text{Tyr}(3\text{NH}_2)$ (3) аспарагиназы (рН 8,3)

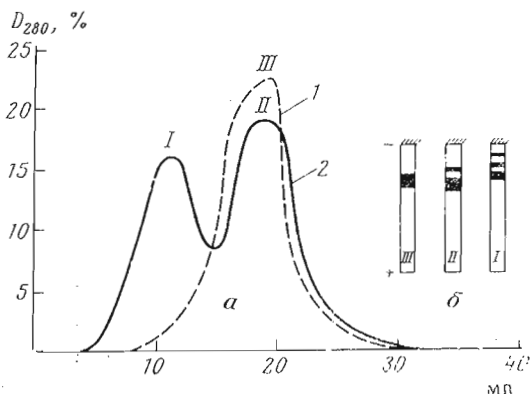


Рис. 4

Рис. 4. Гель-фильтрация (а) через колонку (2×50 см) с сефадексом G-100 нативной (1) и $[\text{Tyr}(3\text{NO}_2)]$ - (2) аспарагиназы в 0,03 М трис-НСl-буфере, рН 8,0. Нанесено 1,5 мл раствора, содержащего 5 мг белка. б — электрофорез в полиакриламидном геле по Шапиро [8] белков пиков I—III, обработанных 1% додецилсульфатом натрия (см. «Экспер. часть»)

зон со значительно меньшей подвижностью по сравнению с мономером нативного фермента, что доказывает ковалентную поперечную сшивку субъединиц аспарагиназы (рис. 4). Изучение активности и степени нитрования фермента, отвечающего пику I, содержащему полимеризованную аспарагиназу, и пику II, образованному в основном тетрамерной формой аспарагиназы, показало, что число 3-нитротирозиновых остатков в молекулах белка этих фракций почти одинаковое (1,8 и 2,1) и разница в ферментативной активности небольшая (8 и 12% соответственно). Следовательно, первостепенное значение в инактивации аспарагиназы в условиях наших опытов имеет нитрование остатков тирозина.

В результате обработки нитроаспарагиназы гидросульфитом натрия остатки 3-нитротирозина восстанавливаются до 3-аминотирозина, о чем свидетельствует исчезновение полосы поглощения фермента при 428 нм и увеличение абсорбции в районе 288 нм, характерной для аминотирозина в области рН 7,4—9,0 (рис. 5). Ферментативная активность при этом повышается на 40%, составляя 50—55% от активности нативной аспарагиназы (табл. 2).

Воздействие на $[\text{Tyr}(3\text{NH}_2)]$ аспарагиназу раствором $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в концентрации 1 мМ снижает активность фермента на 85%. Контроль показывает, что данный реагент на нативный фермент не оказывает инактивирующего влияния.

Тетранитрометан и гидросульфит в условиях данных экспериментов избирательно модифицируют остатки тирозина, не затрагивая другие, важные для активности фермента аминокислотные остатки. Об этом свидетельствуют данные аминокислотного анализа и отсутствие поглощения при 305 нм, характерного для триптофана, модифицированного тетра-нитрометаном (рис. 5).

Гидроксильная группа свободного тирозина имеет рК 10,1. Нитрование тирозина снижает рК до 7,2, а восстановление вновь повышает до 10,0 [9, 10]. По-видимому, это обстоятельство определяет изменение активности L-аспарагиназы при ее последовательном нитровании и восстановлении гидросульфитом, что подтверждается изучением зависимости активности нативной, нитро- и аминокислотаспарагиназ от рН. Нативная аспа-

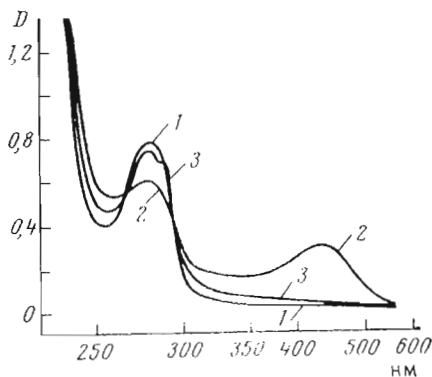


Рис. 5

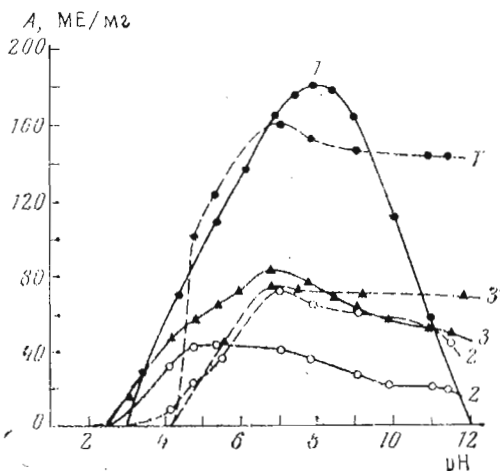


Рис. 6

Рис. 5. Спектры поглощения нативной (1), [Tyr(3NO₂)]- (2) и [Tyr(3NH₂)]- (3) аспарагиназ

Рис. 6. Зависимость от pH гидролазной (сплошная линия) и трансферазной (пунктир) активностей нативной (1), нитро- (2) и аминок- (3) аспарагиназ

рагиназа имеет оптимальную активность в диапазоне pH 7,5—8,5. Максимум активности нитроаспарагиназы смещается в сторону кислых значений pH и при pH 5,0 составляет 20% от активности нативного фермента при pH 8,0. Максимум активности аминокаспарагиназы наблюдается при pH 7,0, т. е. приближается к оптимуму для нативного фермента (рис. 6). Эти данные свидетельствуют в пользу того, что для каталитического действия аспарагиназы необходим тирозин в протонированной форме.

Данные исследования кинетических параметров K_m и V аспарагиназы показывают, что под влиянием нитрования K_m фермента возрастает почти в 10 раз. При этом V меняется незначительно (табл. 3). Это может говорить об участии тирозина в связывании субстрата в активном центре *L*-аспарагиназы.

Известно, что *L*-аспарагиназа кроме гидролазной обладает также трансферазной активностью, т. е. катализирует реакцию переноса аспартил-радикала на гидросиламин с образованием β -гидроксиамида аспарагиновой кислоты [11]. О механизме этой реакции мало известно. В связи с этим было интересно проверить влияние модификации тирозина на трансферазную активность *L*-аспарагиназы. Изучена pH-зависимость активностей нативной, нитро- и аминокаспарагиназ. Найдено, что трансферазная активность всех трех форм фермента начинает проявляться в районе pH 4, резко возрастает до pH 7,0, достигая в этой точке максимума. В щелочной области pH активность снижается незначительно (рис. 6). Таким образом, pH-зависимость трансферазной активности как нативной, так и модифи-

Таблица 3

Кинетические характеристики нативной и нитроаспарагиназ

pH	Нативная <i>L</i> -аспарагиназа		[Tyr(3NO ₂)]аспарагиназа	
	K_m , мМ	V , мМ/мин	K_m , мМ	V , мМ/мин
5,5	0,040	0,12	0,180	0,16
8,0	0,008	0,15	0,080	0,08

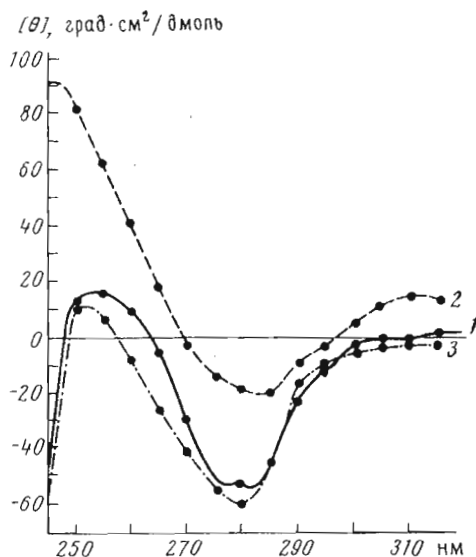


Рис. 7. Спектры КД нативной (1), нитро- (2) и аминок- (3) тирозиласпарагиназ (рН 8,0; 20°).

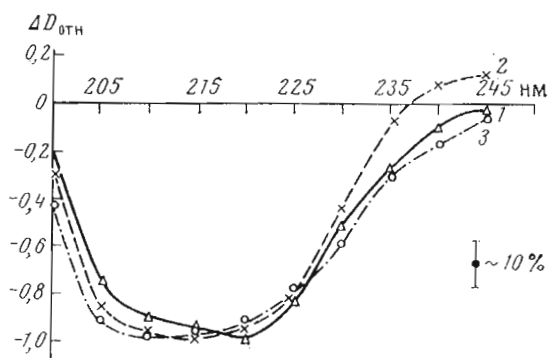


Рис. 8. Спектры КД нативной (1), нитро- (2) и аминок- (3) тирозиласпарагиназ (рН 8,0; 20°). Использованы нормализованные кривые, полученные путем деления всех отсчетов кривой по ординате на показание ординаты при главном максимуме

цированных форм аспарагиназы отличается от таковой для гидролазной активности фермента. Снижение трансферазной активности при оптимальном рН 7 вследствие нитрования аспарагиназы значительно уступает торможению гидролазной активности фермента в районе рН 8 (соответственно на 60 и 80—90%). Восстановление нитрофермента до триаминоаспарагиназы не приводит к повышению трансферазной активности в отличие от гидролазной (табл. 4). Отсюда, а также из неординаковой рН-зависимости гидролазной и трансферазной активностей как нативной, так и модифицированных аспарагиназ следует предположение о возможном различии механизмов катализа этих двух реакций.

L-Аспарагиназа *E. coli* катализирует реакцию гидролизного дезамидирования не только *L*-аспарагина, но и в незначительной степени *L*-глутамина. Глутаминазная активность нативного фермента составляет 3% от аспарагиназной. У нитро- и аминок-аспарагиназ глутаминазная активность в условиях наших опытов не наблюдается.

Гидролазная и трансферазная активности нативной и модифицированных аспарагиназ

Фермент	Трансферзная активность		Гидролазная активность		Отношение трансферзной и гидролазной активностей
	МЕ/мг	%	МЕ/мг	%	
<i>L</i> -Аспарагиназа	108	100	125	100	0,9:1
[Тур(3NO ₂)]аспарагиназа	47	43	26	20	1,7:1
[Тур(3NH ₂)]аспарагиназа	48	44	40	40	0,9:1

Для контроля за конформационными изменениями на уровне вторичной структуры фермента, а также в непосредственном окружении ароматических аминокислотных остатков были получены спектры КД нативной и модифицированных аспарагиназ. В области поглощения полипептидной цепи (220—240 нм) использованы нормализованные кривые. Их сходство (в пределах ошибки измерения) для нативной, нитро- и аминокислотной аспарагиназ показывает, что эти модификации не влияют на вторичную структуру фермента, что могло бы послужить причиной снижения активности (рис. 7). В области поглощения ароматических хромофоров (250—300 нм) отрицательная дихроичная полоса (265—300 нм) нитроаспарагиназы значительно меньше таковой для нативного фермента и в областях ниже 260 и выше 300 нм переходит в положительную вследствие усиления поглощения 3-нитротирозина при данных длинах волн. Спектр КД аминокислотной аспарагиназы мало отличается от соответствующего спектра нативного фермента (рис. 8).

Экспериментальная часть

В работе использовали $1,9 \cdot 10^{-5}$ М раствор *L*-аспарагиназы Рижского завода медпрепаратов в трис-НСI-буфере (рН 8,0). Гидролазную активность аспарагиназы определяли методом прямой нессеризации продукта реакции — аммиака [6], трансферзную — по методике, отработанной в нашей лаборатории [12]. Концентрацию белка в растворах определяли по методу Лоури [13].

Нитрование фермента проводили 10% (по объему) раствором тетранитрометана (Serva, ФРГ) в 96% этаноле в течение 1 ч при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Реакцию нитрования прекращали, отделяя избыток реагента гель-фильтрацией через колонку с сефадексом G-25 (1,5 × 35 см). Пробы для определения активности и числа 3-нитротирозинов в ферменте отбирали через каждые 10 мин. Реакцию нитрования в пробах останавливали подкислением раствора 1 н. НСI до рН 6,0. Молярную концентрацию 3-нитротирозиновых остатков определяли по поглощению раствора при 428 нм (ϵ_{428} 4100 [14]).

Для восстановления 3-нитротирозиновых остатков до 3-аминотирозинов к раствору нитроаспарагиназы добавляли $5,8 \cdot 10^{-2}$ М раствор гидросульфита натрия в трис-НСI-буфере (рН 8,0) с расчетом получения 5-кратного молярного избытка данного реагента относительно 3-нитротирозинов и выдерживали 10 мин. Избыток гидросульфита отделяли гель-фильтрацией через сефадекс G-25.

Комплексообразование [Тур(3NH₂)]аспарагиназы проводили с помощью CuSO₄ · 5H₂O (1 мМ), перемешивая раствор в течение 10 мин при комнатной температуре. Для контроля таким же образом обрабатывали нативный фермент.

При исследовании рН-зависимости активности аспарагиназы и ее модифицированных форм использовали 0,04 М универсальный буфер из смеси фосфорной, уксусной и борной кислот и 0,2 М NaOH.

Электрофорез аспарагиназы в полиакриламидном геле проводили по методу Дэвиса [7]. Образец содержал ~100 мкг белка в 20% растворе сахарозы. Использовали трис-глициновый электродный буферный раствор (рН 8,3). Электрофорез по методу Шаширо [8] проводили в полиакриламидном геле, содержащем в 1% концентрации додецилсульфат натрия. Белок предварительно обрабатывали в течение 12 ч 1% раствором додецилсульфата натрия. В кинетических исследованиях скорость реакции гидролиза *L*-аспарагина измеряли определением концентрации иона NH₄⁺ фенолгипохлоритным методом [15] на спектрофотометре СФ-4. Параметры *K_m* и *V* в уравнении Михаэлиса — Ментен определяли методом наименьших квадратов согласно [16].

Спектры поглощения измеряли на спектрофотометре Specord UV-VIS (ГДР), спектры КД — на дихрографе типа П Roussel-Joan CD-185 (Франция). При регистрации спектров КД в области 250—320 и 250—200 нм образцы помещали в термостатированные кварцевые кюветы с длиной оптического пути 1 и 0,1 см соответственно. Корректированную молярную эллиптичность $[\theta']$ рассчитывали по формуле [17]:

$$[\theta'] = [\theta] \cdot 3/(\pi^2 + 2),$$

$$\text{где } [\theta] = M\psi/10cl, \text{ а } \psi = 33 \cdot \Delta D,$$

$[\theta]$ — молярная эллиптичность (град·см²/дмоль), ψ — измеренная молярная эллиптичность (град), ΔD — разность дихроических оптических плотностей анализа и контроля, *c* — концентрация белка (мг/мл), *l* — длина оптического пути, *M* — усредненный молекулярный вес одного аминокислотного остатка (для *L*-аспарагиназы *M* = 106,4), π — коэффициент преломления для растворителя (для водных буферов $\pi = 1,333$).

ЛИТЕРАТУРА

1. Makino H., Takenaka O., Inada I. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, **263**, 477—481.
2. Shifrin S., Solis B. G. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 4121—4125.
3. Shifrin S., Solis B. G. (1972) *Molec. Pharmacol.*, **8**, 561—564.
4. Liu I. P., Handschumacher R. E. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 66—68.
5. Жагат Р. А., Вина И. А., Блума Р. К., Кирстукас И. П. (1976) Тезисы Советско-американского симпозиума по химии и физике белка, с. 79.
6. Жагат Р. А., Эйдусс И. В., Шпрунка И. К., Вина И. А., Дайя Д. А. (1972) *Изв. АН ЛатвССР. Сер. хим.*, № 1, 73—76.
7. Davis B. I. (1964) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404—410.
8. Shapiro A. L., Vinuela E., Maizel J. V. (1967) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **28**, 815—820.
9. Sokolovsky M., Riordan J. F., Vallee B. L. (1967) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **27**, 20—25.
10. Christen Ph., Vallee B. L., Simpson R. (1971) *Biochemistry*, **10**, 1377—1383.
11. Meister A., Sober H. A., Tice S. V., Fraser P. E. (1952) *J. Biol. Chem.*, **197**, 319.
12. Бука М. П., Жагат Р. А., Кирстукас И. П., Чешука Л. Я. (1975) *Ж. мед. химии*, № 5, 548—552.
13. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265—275.
14. Sokolovsky M., Riordan J. F., Vallee B. L. (1966) *Biochemistry*, **5**, 3582—3589.
15. Kaplan A. (1969) *Methods of biochemical analysis*, **17**, 313—316.
16. Sakoda M., Hiromi K. (1976) *J. Biochem.*, **80**, 547—555.
17. Краббе П. (1974) *Применение хироптических методов в химии*, с. 139, «Мир», М.

Поступила в редакцию
17.II.1978

CHEMICAL MODIFICATION OF *L*-ASPARAGINASE. I. NITRO- AND AMINOTYROSYLASPARAGINASE FROM *E. COLI*

BLUMA R. K., VINA I. A., KIRSTUKAS I. P., MILMAN I. A.,
GEĪMAN I. I., ZHAGAT R. A.

*Institute of Organic Synthesis, Academy of Sciences
of the Latvian SSR, Riga*

Chemical modification of *L*-asparaginase through nitration with tetranitromethane, reduction with sodium hydrosulphite and subsequent complexing of aminotyrosylasparaginase with Cu^{2+} ions showed that a protonated tyrosine residue was involved in the catalytic activity of the enzyme. According to the absorption and CD-spectra, along with the amino acid analysis, no other amino acid residues essential for the activity manifestation were affected and no conformational change took place. Tetranitromethane induced cross-linking in asparaginase was detected. Based on measuring the kinetic parameters K_m and V for the native enzyme and nitroasparaginase, tyrosine implication in the substrate binding in the active site was suggested. The effect of tyrosine modification on the hydrolase and transferase activity of *L*-asparaginase was also explored.