



УДК 547.962.04

ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ЛЕЙЦИНСВЯЗЫВАЮЩЕГО
БЕЛКА

II. МОДИФИКАЦИЯ ОСТАТКОВ ЛИЗИНА И АРГИНИНА *

*Гаврилова Н. А., Гринкевич Х. А., Антонов В. К.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Исследована химическая модификация остатков лизина и аргинина ацетилацетоном в нативном лейцинсвязывающем белке (LIV-белке) и белке, освобожденном от «эндогенных» субстратов (с-LIV-белке). Показано, что ацетилацетон модифицирует в обоих случаях суммарно около 14 остатков лизина (из 29) и приблизительно 3 остатка аргинина (из 7). Модификация сопровождается полной потерей активности белка по связыванию лейцина и изолейцина. Активность полностью восстанавливается при удалении модификатора с остатков лизина гидроксилмином. Установлено, что потеря активности связана с модификацией одного остатка лизина. Показано, что падение активности по связыванию лейцина является следствием увеличения константы диссоциации комплекса белок-лейцин, тогда как потеря активности по изолейцину обусловлена снижением кажущегося числа активных центров. Остатки аргинина, по-видимому, участвуют в стабилизации олигомерной структуры LIV-белка.

Периплазматический белок кишечной палочки — лейцин, изолейцин, валинсвязывающий белок (LIV-белок) в широком интервале pH образует прочные комплексы с нейтральными аминокислотами (см. обзор [3]). Структура субстратов этого белка, являющихся биполярными ионами, позволяет предположить, что в связывании субстратов с белком наряду со специфическими взаимодействиями их боковых групп важную роль могут играть электростатические взаимодействия. Такие взаимодействия могут возникать между противоположно заряженными группами белка и субстрата. Носителями положительно заряженных групп в белке являются главным образом остатки лизина и аргинина. Представляло несомненный интерес выяснить, участвуют ли эти остатки в связывании субстратов.

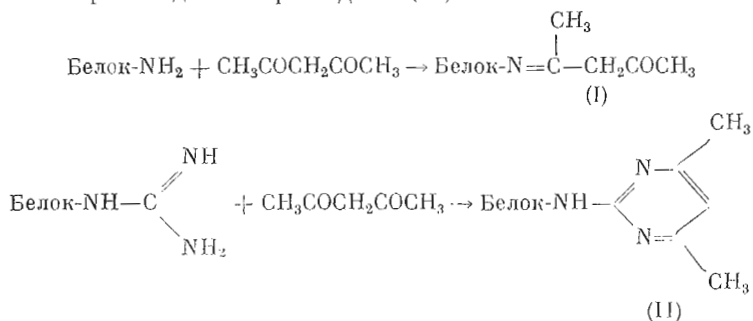
С этой целью мы исследовали влияние химической модификации остатков лизина и аргинина в LIV-белке на его активность. В качестве модификатора использовали ацетилацетон — реагент, легко модифицирующий ε-аминогруппы лизина и гуанидиновые группы аргинина [4]. Реагент может быть удален с остатков лизина действием гидроксилмина или снижением pH. При этом модифицированные остатки аргинина остаются незатронутыми.

Как известно [5], гомогенный LIV-белок содержит прочно связанные аминокислоты, так называемые эндогенные субстраты, главным образом

* Сообщение I см. [1]. Предварительные результаты данной работы сообщены в [2].

лейцин и изолейцин. Освободиться от них можно инкубацией LIV-белка в растворе 5 М мочевины с последующим диализом против воды. Такой освобожденный от «эндогенных» субстратов белок (с-LIV-белок) практически сохраняет активность по связыванию лейцина и изолейцина, а его спектр КД почти не отличается от спектра нативного белка. В опытах по модификации мы использовали как LIV-белок, так и с-LIV-белок.

Модификацию белка ацетилацетоном проводили в 0,5 М натрий-бикарбонатном буферном растворе при pH 8,9, используя молярное соотношение белок — ацетилацетон = 1 : 7000 (молекулярный вес LIV-белка 36000). Реакция ε-аминогрупп остатков лизина с ацетилацетоном приводит к образованию оснований Шиффа (I), а гуанидиновые группы аргинина превращаются в производные пиримидина (II):



Основания Шиффа (I) имеют максимум поглощения в УФ-свете при 310 нм (ϵ $2 \cdot 10^4$ М⁻¹ см⁻¹), тогда как характерное для производных типа (II) поглощение наблюдается при 300 нм (ϵ $3,4 \cdot 10^3$ М⁻¹ см⁻¹). Для определения числа модифицированных остатков лизина и аргинина смесь после проведения реакции подвергали гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-50 и определяли поглощение при 310 нм. Затем белок обрабатывали 0,1 М раствором гидроксилamina при pH 6,0 в течение 15 мин и после гель-фильтрации определяли поглощение при 300 нм. Число модифицированных остатков определяли по формулам

$$n_{\text{Lys}} = D_{310} / c\epsilon_{310} \quad \text{и} \quad n_{\text{Arg}} = D_{300} / c\epsilon_{300},$$

где D — поглощение, c — молярная концентрация белка, ϵ — коэффициент молярной экстинкции.

Связывающую активность белка определяли методом равновесного диализа [6] и относили к активности контроля, имеющего приблизительно ту же концентрацию по белку, что и опытная проба, чтобы избежать ошибок, связанных с нелинейной зависимостью активности от концентрации белка [4].

На рис. 1а приведена кинетическая кривая модификации остатков лизина. Ход кривой для нативного LIV-белка и для с-LIV-белка совпадает. За 24 ч модифицируется 13–14 остатков лизина из 29, содержащихся в молекуле LIV-белка. За это время подвергаются модификации также около 3 остатков аргинина из 7 содержащихся в белке. Кинетическую кривую модификации LIV-белка можно аппроксимировать двумя участками (рис. 1б), когда реакция протекает по псевдопервому порядку с различными скоростями: $k_1 = 1,7 \cdot 10^{-3}$ и $k_2 = 4,0 \cdot 10^{-5}$ мин⁻¹. Первая, быстрая стадия соответствует модификации 5–6 остатков лизина и заканчивается за 3 ч. По-видимому, при этом модифицируются наиболее доступные реагенту остатки аминокислот.

На рис. 2 представлено изменение активности LIV-белка по связыванию лейцина и изолейцина. Изменение активности как нативного, так и с-LIV-белка одинаково по обоим субстратам, а для каждой из форм белка связывание как лейцина, так и изолейцина изменяется практически одинаковым образом. Из рисунка видно, что модификация первых 2–3 ос-

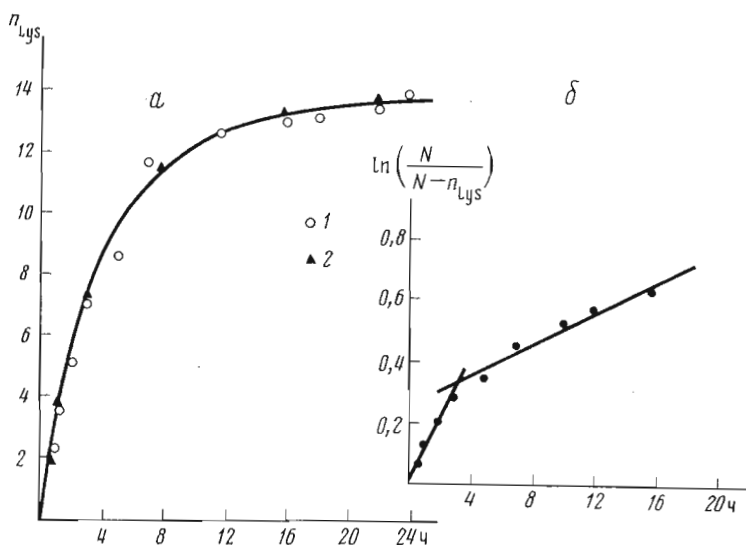


Рис. 1. Кинетические кривые модификации LIV-белка (1) и с-LIV-белка (2) ацетилацетоном в прямых координатах (а), в координатах уравнения реакции псевдопервого порядка (б). N — общее число остатков лизина (29), n_{Lys} — число модифицированных остатков лизина

татков лизина не изменяет относительной активности белка. Дальнейшая модификация приводит к падению активности, линейно коррелирующей с числом модифицированных остатков лизина.

Обработка модифицированного, неактивного белка гидроксиламином приводит к деблокированию всех остатков лизина. При этом активность LIV-белка по связыванию как лейцина, так и изолейцина практически полностью восстанавливается. Таким образом, модификация суммарно около 3 остатков аргинина не влияет на связывающие свойства LIV-белка.

Для того чтобы определить число важных для активности остатков лизина, мы воспользовались методом [7], в соответствии с которым доля остаточной активности (α), число важных для активности остатков (i) и доля немодифицированных остатков (χ) связаны уравнением

$$\alpha^{1/i} = \frac{N}{p} \chi - \frac{N - (p + s)}{p}, \quad (1)$$

где N — общее число остатков данного типа в белке; p — число медленно модифицируемых остатков, среди которых i остатков важно для активности; s — число быстро модифицируемых остатков, несущественных для активности.

Строя зависимости $\alpha^{1/i}$ от χ для разных значений i , можно определить число важных для активности остатков лизина. На рис. 3 приведены такие графики, построенные для значений $i=1, 2$ и 3 с использованием значений χ и α , соответствующих данным рис. 2. Экспериментальные точки по связыванию лейцина для $i=1, 2$ и 3 дают коэффициенты линейной регрессии соответственно 0,967; 0,960 и 0,942, для изолейцина — 0,979; 0,966 и 0,943. Таким образом, вид графиков и значения коэффициентов показывают, что один остаток лизина в LIV-белке важен для активности. Из значений наклона и отсечений можно определить величины p и s , которые для $i=1$ оказались равными соответственно 11 и 3.

То обстоятельство, что LIV-белок и с-LIV-белок в одинаковой степени снижают свою активность при модификации, означает, что «эндогенные»

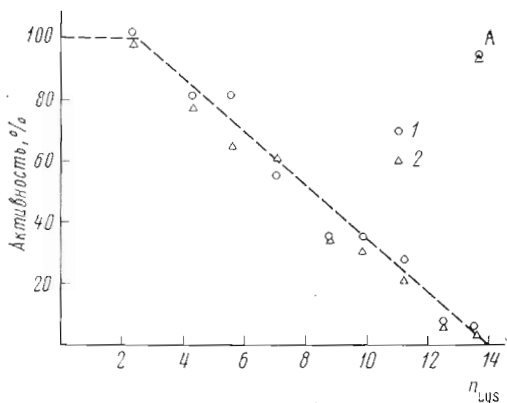


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость относительной активности LIV-белка по связыванию *L*-лейцина (1) и *L*-изолейцина (2) от числа модифицированных остатков лизина. Точка А соответствует активности белка после 24-часовой модификации и последующей обработки 0.1 M NH₂OH

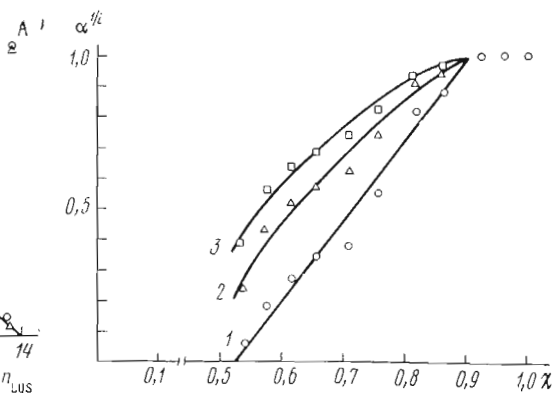


Рис. 3

Рис. 3. Графики зависимости $\alpha^{1/i}$ (α — доля остаточной активности, i — число важных для активности остатков лизина) от доли немодифицированных остатков лизина (χ) для значений $i=1$ (1), 2 (2) и 3 (3), построенные по данным рис. 2 для связывания лейцина

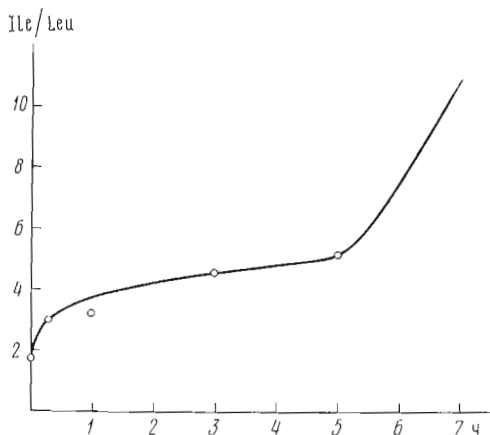


Рис. 4

Рис. 4. Изменение соотношения «эндогенных» изолейцина и лейцина в LIV-белке в ходе его модификации ацетилацетоном

субстраты практически не защищают белок от действия реагента. Отсюда, однако, не следует, что модификация не затрагивает групп активного центра. Как оказалось, модификатор способствует удалению «эндогенных» субстратов из молекулы LIV-белка, причем лейцин удаляется значительно быстрее, чем изолейцин (рис. 4). В исчерпывающе модифицированном белке «эндогенные» субстраты практически не обнаруживаются. Эти данные были получены сравнением интенсивностей пятен дансильных производных «эндогенных» *L*-лейцина и *L*-изолейцина на хроматограммах дансильрованных нативного и модифицированного LIV-белка. Резкое снижение количества *L*-лейцина в белке начинает обнаруживаться еще тогда, когда белок сохраняет около 40% остаточной активности. По-видимому, удаление лейцина обусловлено не только модификацией самого белка, но и взаимодействием ацетилацетона с аминогруппой субстрата. Разная скорость выхода «эндогенных» субстратов указывает на различное расположение лейцина и изолейцина в молекуле LIV-белка.

Для того чтобы выяснить, связана ли потеря активности LIV-белка с изменением его третичной структуры в ходе модификации или с прямым воздействием реагента на активный центр белка, мы изучили влияние модификации на константу связывания (K_D) и кажущееся число активных центров ($r_{\text{макс}}$) в отношении как лейцина, так и изолейцина. В таблице приведены эти значения для с-LIV-белка, интактного, при различной глу-

Влияние модификации с- LIV-белка ацетилацетоном на константу диссоциации его комплексов с лейцином и изолейцином и кажущееся число связывающих центров

Время модификации, ч	n_{Lys}	n_{Arg}	Лейцин			Изолейцин		
			Активность, % к контролю	$K_D \cdot 10^6$, М	r_{max}	Активность, % к контролю	$K_D \cdot 10^6$, М	r_{max}
0	0	0	100	1,3	0,35	100	0,7	0,27
3	7	2	55	3,0	0,30	60	0,7	0,16
12,5	11	2,7	14	13,0	0,30	20	0,8	0,035
24+обработка 0,1 М NH ₂ OH	0	2,7	95	2,5	0,50	92	1,4	0,35

бине модификации ацетилацетоном и обработанного (после модификации) гидроксилмином, т. е. содержащего лишь модифицированные остатки аргинина. На рис. 5 приведены соответствующие графики в координатах $[S]_{св}/[ES]$ от $[S]_{св}$, где S — субстрат, E — LIV-белок.

Оказалось, во-первых, что одновременная модификация остатков лизина и аргинина по-разному влияет на связывание лейцина и изолейцина. Связывание лейцина ухудшается при сохранении неизменного кажущегося числа активных центров и увеличении константы диссоциации комплекса белок — лейцин, тогда как константа диссоциации комплекса белок — изолейцин остается постоянной в ходе модификации, а уменьшается кажущееся число активных центров. Во-вторых, модификация только остатков аргинина несколько увеличивает константы диссоциации как по лейцину, так и по изолейцину и заметно увеличивает кажущееся число активных центров. Последнее обстоятельство, возможно, связано с тем, что один или более остатков аргинина играют роль в стабилизации олигомера LIV-белка, в котором, как было показано нами ранее [8], часть активных центров маскирована. Модификация этого остатка способствует диссоциации олигомера и появлению новых участков связывания субстрата.

Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что модификация остатков лизина затрагивает непосредственно активный центр, связывающий изолейцин, тогда как изменение сродства к лейцину происходит скорее всего за счет изменения пространственной организации белка. Интересно, что изучение термодинамических параметров связывания

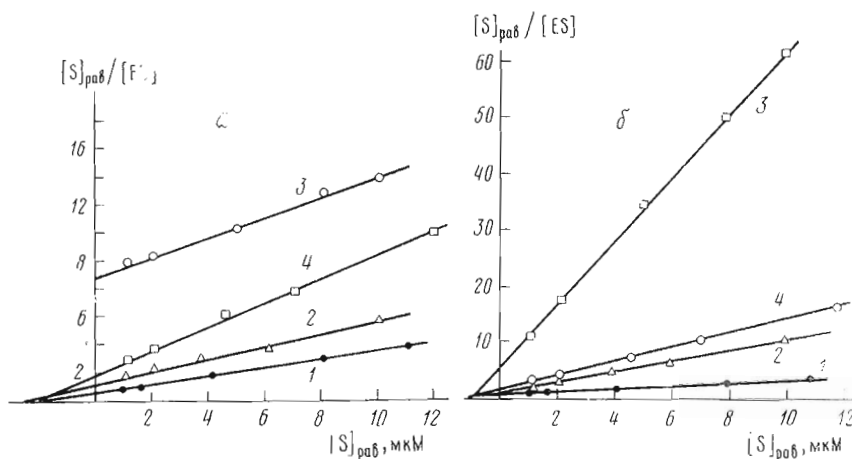


Рис. 5. Связывание L-[¹⁴C]лейцина (а) и L-[¹⁴C]изолейцина (б) немодифицированным с-LIV-белком (1), с-LIV-белком, модифицированным ацетилацетоном в течение 3 (2), 12,5 (3) и 24 ч с последующей обработкой 0,1 М NH₂OH (4). Начальная концентрация белка [E]₀: 11,4 (1), 8 (2), 4,9 (3) и 2,5 мкМ (4)

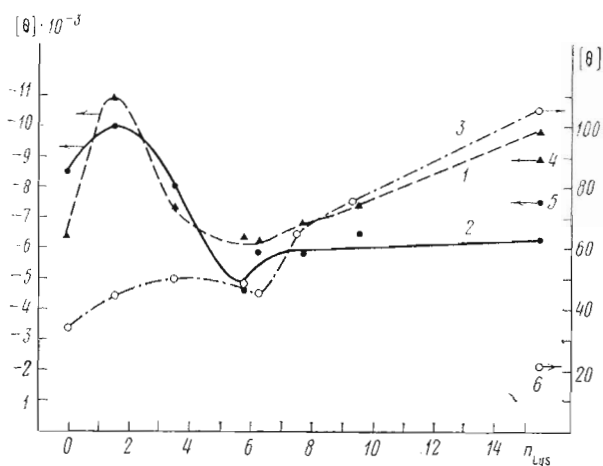


Рис. 6. Изменение эллиптичности полос при 205 (1), 220 (2) и 290 нм (3) в спектрах КД с-LIV-белка в зависимости от числа модифицированных остатков лизина. Точки 4, 5 и 6 соответствуют $[\theta]_{205}$, $[\theta]_{220}$ и $[\theta]_{290}$ после удаления модификатора с остатков лизина действием NH_2OH

LIV-белком лейцина и изолейцина [9] также выявило существенные различия в комплексообразовании этого белка с обоими субстратами.

Чтобы убедиться в наличии конформационных изменений белка при модификации, были получены спектры КД образцов с-LIV-белка, содержащего разное число модифицированных остатков лизина и аргинина. Из рис. 6 видно, что эллиптичность полос при 205 и 220 нм в начальный период несколько увеличивается, затем падает в ходе модификации в белке около 6—7 остатков лизина. Дальнейшая модификация не изменяет эллиптичности полос при 220 нм, но полоса 205 нм увеличивает свою эллиптичность. Первоначальное увеличение θ_{205} и θ_{220} , возможно, отражает влияние модификации остатков аргинина и лизина на межглобулярные взаимодействия в олигомере LIV-белка. Заметное, хотя и не очень большое (по сравнению с исходными значениями $[\theta]$), падение эллиптичности полос при 205 и 220 нм, наблюдаемое при модификации суммарно 6—7 остатков лизина, примерно совпадает с завершением первой, быстрой стадии модификации (рис. 1б). При этом белок почти наполовину теряет свою активность по обоим субстратам (см. рис. 2). Эти явления, очевидно, связаны с модификацией доступных и относительно быстро реагирующих остатков лизина. Постоянство θ_{220} при дальнейшей модификации указывает на отсутствие заметных изменений конформации белка. Характер КД-спектра после удаления модификатора с остатков лизина действием NH_2OH очень сходен со спектром немодифицированного белка, т. е. модификация около 3 остатков аргинина практически не влияет на конформацию белковой глобулы. То обстоятельство, что величина θ_{290} резко уменьшается при переходе от исчерпывающе модифицированного белка к белку, содержащему лишь модифицированные остатки аргинина, указывает на то, что рост θ_{290} при модификации ацетилацетоном, возможно, связан с появлением индуцированной оптической активности модификатора.

Поскольку лейцин и изолейцин конкурируют друг с другом в связывании с LIV-белком [10], а белок, по нашим данным [8], имеет более чем один активный центр по каждому субстрату, представляется вероятным, что активные центры LIV-белка, хотя и могут связывать оба субстрата каждый, обладают различным сродством к лейцину и изолейцину. Это предположение, конечно, нуждается в дополнительных доказательствах.

Остатки лизина, по-видимому, участвуют в связывании аминокислот путем образования ионных пар с карбоксилат-ионом аминокислоты. Что

касается модифицируемых остатков аргинина, то есть все основания полагают, что они (или, по крайней мере, один из них) участвуют в стабилизации олигомера LIV-белка.

Экспериментальная часть

LIV-белок получали модифицированным методом Аираку [10].

Для обработки белка использовали мочевины марки ОП-3, ос. ч. Все другие реагенты были марки х. ч. с-LIV-белок получали диализом в течение суток 10 мл раствора нативного LIV-белка (1 мг/мл) против 1 л 5 М мочевины, затем еще сутки против 1 л 2,5 М мочевины и, наконец, против 2 л воды (несколько раз).

При модифицировании к 10 мл раствора белка (~1 мг/мл) в 0,5 М натрий-бикарбонатном буфере, pH 8,9, приливали 0,2 мл ацетилацетона. Раствор интенсивно перемешивали и оставляли стоять при 20° С. Через определенные интервалы времени отбирали аликвоты реакционной смеси и подвергали их гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-50, предварительно уравновешенной 0,05 М натрий-бикарбонатным буфером, pH 8,9. Элюцию проводили тем же буфером. В объединенной белковой фракции определяли связывающую активность и число модифицированных остатков лизина по поглощению при 310 нм.

Для определения числа остатков аргинина, подвергшихся модифицированию, белковую фракцию после гель-фильтрации обрабатывали 15 мин гидроксиламином при pH 6,0 (NH₂OH добавляли до конечной концентрации в растворе 0,1 М). Затем реакционную смесь наносили на колонку с сефадексом G-50 и элюировали водой. В объединенной белковой фракции определяли связывающую активность и поглощение при 300 нм.

Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре Gilford (США).

Связывающую активность модифицированного белка и контрольных проб определяли методом равновесного диализа, как описано в работе [6], используя L-[¹⁴C]лейцин и L-[¹⁴C]изолейцин (Amersham, 324 и 330 мКи/ммоль соответственно). Радиоактивность проб измеряли на счетчике SL-30 (Intertechnique, Франция).

Для определения соотношения «эндогенных» изолейцина и лейцина в LIV-белке в ходе его модификации ацетилацетоном аликвоту раствора нативного или модифицированного белка (1 нмоль) вносили в ампулу (2×70 мм), упаривали в вакууме и к остатку добавляли 10 мкл приготовленной непосредственно перед опытом смеси дансилхлорида в ацетоне (10,8 мг/мл) и 0,2 М NaHCO₃ (pH 8,6) в отношении 6 : 4. Реакционную смесь инкубировали 45 мин при 37° С, затем упаривали в вакууме. Остаток обрабатывали 2 мкл ацетона при встряхивании и аликвоту ацетонового раствора (0,1 мкл) наносили на полиамидную пластинку (5×7 см) (Schleicher und Schüll, ФРГ). Хроматографию проводили в двух взаимно перпендикулярных направлениях в системах: 1) вода — муравьиная кислота — пропанол (100 : 2 : 5); 2) бензол — уксусная кислота — бутанол (90 : 10 : 5) [11]. После высушивания пластинок осуществляли сканирование хроматографических зон «эндогенных» Dns-аминокислот и последующий отчет результатов с помощью автоматической системы [12].

Спектры КД получали на дихрографе J. Yvon mark III (Франция).

Авторы выражают свою благодарность Н. А. Алдановой за полезные обсуждения и помощь в работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гаврилова Н. А., Антонов В. К. (1977) Биоорг. химия, 3, 768–774.
2. Гаврилова Н. А., Антонов В. К. (1977) IV Всес. симпозиум по химии белков и пептидов. Минск, сентябрь 1977 г. тез. докл., с. 90.
3. Антонов В. К., Александров С. Л. (1977) Биоорг. химия, 3, 581–599.

4. Gilbert H. F., O'Leary M. H. (1975) *Biochemistry*, **14**, 5194-5198.
5. Amanuma H., Itoh J., Anraku Y. (1976) *J. Biochem.*, **79**, 1167-1182.
6. Anraku Y. (1968) *J. Biol. Chem.*, **243**, 3116-3122.
7. Tsou Chen-Lu (1962) *Scientia Sinica*, **11**, 1535-1558.
8. Антонов В. К., Воротынцева Т. И., Александров С. Л., Гаврилова Н. А., Арсеньева Е. Л. (1975) *Докл. АН СССР*, **221**, 1215-1218.
9. Gaudin C., Marty B., Belaich A., Sari J. C., Belaich J. P. (1977) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **78**, 377-382.
10. Amanuma H., Anraku Y. (1978) *J. Biochem.*, **76**, 1165-1173.
11. Арутюнян А. А., Шляпников С. В., Северин Е. С. (1975) *Биоорганич. химия*, **1**, 1188-1196.
12. Афанасенко Г. А., Нисанов В. Я., Шляпников С. В., Каминир Л. Б., Северин Е. С. (1977) *Биохимия*, **42**, 2178-2185.

Поступила в редакцию
26.I.1979

CHEMICAL MODIFICATION OF THE LEUCINE BINDING PROTEIN. II. MODIFICATION OF LYSINE AND ARGININE RESIDUES

GAVRILOVA N. A., GRINKEVICH Kh. A., ANTONOV V. K.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

Chemical modification of the lysine and arginine residues by acetylacetone (AA) in the native leucine-binding protein (LIV-protein) and in the protein free from the «endogeneous» substrates (c-LIV-protein) has been studied. In both cases AA modified about 14 lysine residues (from 29) and about 3 arginine residues (from 7). Modification caused a complete loss of the leucine and isoleucine binding activity. Treatment of the modified protein by NH_2OH which removes the modifier from lysine residues completely restored the binding activity. One lysine residue was shown to be responsible for the loss of activity. The decrease in the leucine binding activity was found to be the consequence of the increase in the dissociation constant of the leucine-protein complex, whereas the decrease in the isoleucine binding was due to the diminution of the apparent number of the protein active sites. The arginine residues are presumably involved in the stabilization of the LIV-protein oligomeric structure.