



УДК 577.112.4:547.313.2'279.5.04

ДИВИНИЛСУЛЬФОН КАК СШИВАЮЩИЙ РЕАГЕНТ ДЛЯ ОЛИГОМЕРНЫХ БЕЛКОВ

© 2003 г. **Й. Серейкайте*[#], Д. Бассус*, Р. Бобнис**^{*},
Г. Денис**^{*}, Ж. Бумялене*, В.-А. Бумялис***

**Вильнюсский технический университет им. Гедиминаса,
Саулетекю ал., 11, 2040, Вильнюс, Литва;*

***Вильнюсский университет, Вильнюс, Литва*

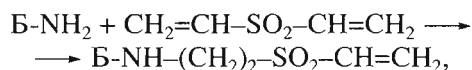
Поступила в редакцию 27.03.2002 г. Принята к печати 02.05.2002 г.

Исследована кинетика реакции нуклеофильного присоединения дивинилсульфона к аминокетам глицина и модельных белков в водном растворе при 30°C. Константы реакции для глицина, бычьего сывороточного альбумина и α_1 -казеина равны $(4.84 \pm 0.58) \times 10^{-1}$, $(2.97 \pm 0.31) \times 10^{-2}$ и $(2.38 \pm 0.49) \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ соответственно. Дивинилсульфон предложен в качестве сшивающего реагента для качественного доказательства присутствия ассоциатов белковых молекул в растворе. Проведено сравнение дивинилсульфона, как сшивающего реагента, с 1,3,5-триакрилоилгексагидро-с-триазином.

Ключевые слова: дивинилсульфон; 1,3,5-триакрилоилгексагидро-с-триазин; олигомерные белки, сшивающие реагенты для.

ВВЕДЕНИЕ

Дивинилсульфон (DVS) является гомобифункциональным реагентом. Его винильные группы в качестве электрофилов могут участвовать в реакциях нуклеофильного присоединения [1, 2], в том числе к нуклеофильным функциональным группам остатков аминокислот белков [3–6]. Основной мишенью при этом служат свободные аминокетты остатков лизина. Вначале в реакцию вступает одна винильная группа DVS по уравнению:



где B – белок.

Далее в зависимости от мишени реакции второй винильной группы могут образоваться разные продукты. При ее взаимодействии с той же аминокеттой происходит образование 1,4-сульфоназановых циклов [7]. Реакция же с аминокеттой второй остатка лизина, находящегося в составе либо той же самой, либо другой молекулы белка, приводит к продуктам внутримолекулярного или межмолекулярного сшивания.

Описанные свойства DVS находят применение в биотехнологии. Так, с его помощью получен конъюгат BSA и релизинг-фактора лютеинизирующего гормона для иммунологических целей [8].

Способность DVS сшивать полипептидные цепи была использована для получения димеров рибонуклеазы печени быка [9] и человека [10]. Описана также активация агарозы с помощью DVS с целью последующего присоединения лигандов для аффинной хроматографии [11–13].

Цель настоящей работы – детальное изучение реакции DVS с аминокеттами глицина и модельных белков (BSA и α_1 -казеина), а также исследование способности DVS к сшиванию субъединиц олигомерных белков в сравнении с ранее изученным реагентом 1,3,5-триакрилоилгексагидро-с-триазином (TAT) [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кинетика взаимодействия DVS с глицином (табл. 1) была изучена в интервале pH 7.5–8.9 (в этих условиях в растворе существует равновесие между протонированной и непротонированной формой аминокетты глицина). Эффективная константа скорости реакции (при использовании в расчетах полной концентрации глицина) возрастает при увеличении pH. Этот рост пропорционален увеличению концентрации формы глицина с непротонированной аминокеттой. Таким образом, как и в других реакциях присоединения аминов к электрофильной этиленовой связи [15–17], нуклеофильным реагентом в нашем случае является аминокетта в непротонированной форме. Истинная константа скорости реакции (при использовании в расчетах концентрации

Сокращения: BSA – бычий сывороточный альбумин; DVS – дивинилсульфон; TAT – 1,3,5-триакрилоилгексагидро-с-триазин.

[#] Автор для переписки (тел.: (370-5) 274-49-72; эл. почта: sjolanta@fm.vtu.lt).

глицина с непротонированной аминогруппой) равна $(4.84 \pm 0.58) \times 10^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, что говорит о более высокой реакционной способности DVS по сравнению с TAT (константа скорости реакции присоединения TAT к аминогруппе глицина равна $(9.15 \pm 0.59) \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [14]). Большая эффективность наблюдается и для реакций DVS с аминогруппами остатков лизина BSA и α_1 -казеина. Константы скорости реакции составляют $(2.97 \pm 0.31) \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ для BSA и $(2.38 \pm 0.49) \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ для α_1 -казеина (кинетические данные приведены на рис. 1), и практически в три раза превышают константы взаимодействия TAT с этими белками в аналогичных условиях (30°C, pH 9.2 [14]).

Способность DVS к межмолекулярному сшиванию субъединиц олигомерных белков мы изучали на примере рекомбинантного гормона роста человека (известно, что гормон роста димеризуется в присутствии ионов цинка [18, 19]). Как видно из рис. 2, в ходе реакции DVS с белком действительно происходит образование химически сшитого димера, однако эффективность этой реакции по сравнению с TAT (рис. 3) гораздо ниже (несмотря на то, что DVS, как было показано выше, существенно более реакционноспособное соединение в реакциях с аминогруппами как глицина, так и модельных белков). Более того, увеличение концентрации DVS привело к практически полному исчезновению димера гормона роста. Напротив, уменьшение концентрации DVS позволило повысить выход сшитого димера (табл. 2).

По-видимому, из-за высокой реакционной способности DVS его присоединение к аминогруппам белка происходит довольно быстро. Однако вторая винильная группа (ввиду более короткого расстояния между электрофильными функциональными группами в молекуле DVS по сравнению с TAT) не успевает прореагировать с аминогруп-

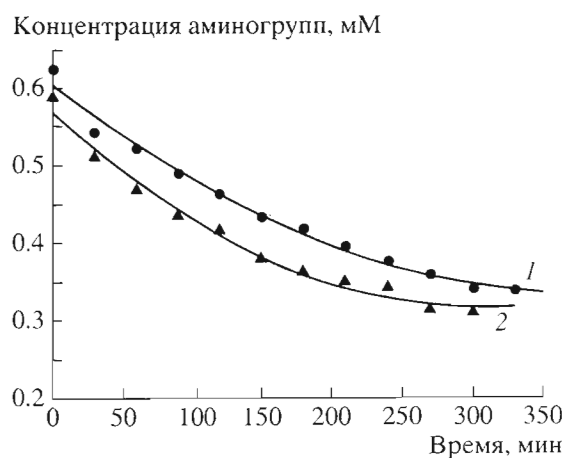


Рис. 1. Изменение концентрации аминокислот α_1 -казеина (1) и BSA (2) в ходе реакции с DVS.

Таблица 1. Константы скорости реакции глицина с DVS*

pH	$k_{\text{эфф}} \times 10^2, \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1**}$	$k_{\text{ист}}, \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1***}$
8.9	6.72 ± 0.67	0.405 ± 0.04
8.5	3.73 ± 0.37	0.51 ± 0.05
8.0	1.17 ± 0.12	0.48 ± 0.05
7.5	0.416 ± 0.083	0.54 ± 0.11
		Средняя 0.484 ± 0.058

* Рассчитано для одной $\text{CH}_2=\text{CH}$ -группы; приведены значения со стандартным отклонением, рассчитанным из результатов трех параллельных опытов.

** Рассчитано для полной концентрации глицина.

*** Рассчитано для концентрации формы глицина с непротонированной аминогруппой.

пой другой субъединицы и поэтому при равных молярных отношениях белок/DVS или белок/TAT выход димера в случае DVS ниже (рис. 2). В то же время повышенная реакционная способность DVS позволяет получать химически сшитые димеры белковых молекул в более мягких условиях (pH 8.0, табл. 2).

Резюмируя изложенное, можно предложить использовать DVS для качественного доказательства присутствия ассоциатов белковых глобул в растворе. Для полного сшивания ассоциатов более предпочтительным реагентом является TAT.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали дивинилсульфон, α_1 -казеин (Merck, Германия), 2,4,6-тринитробензолсульфоокислоту, бычий сывороточный альбу-

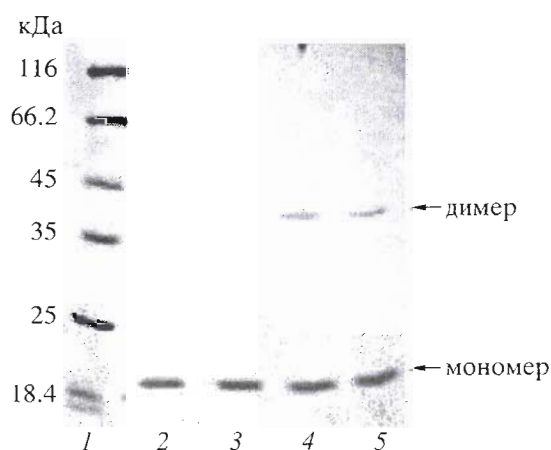


Рис. 2. SDS-гель-электрофорез рекомбинантного гормона роста человека (0.014 mM, 2) в ходе его реакции с DVS (2.7 mM; молярное соотношение аминокислот белка и винильных групп сшивающего агента 1/12) через 0.5 (3), 1 (4) и 3 (5) ч при pH 9.2; 1 — стандарты молекулярной массы.

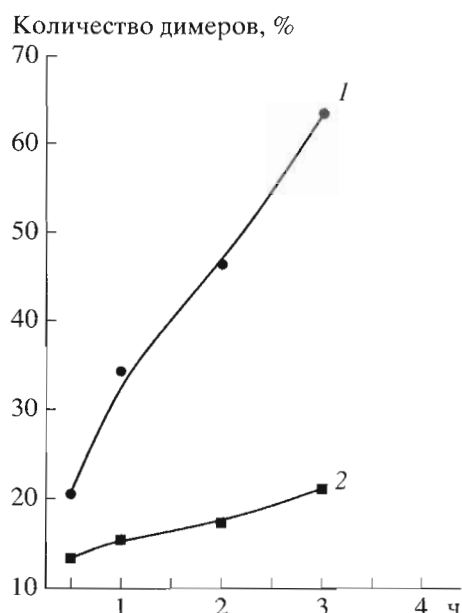


Рис. 3. Выход химически сшитого димера рекомбинантного гормона роста человека (0.014 мМ) при pH 9.2 в ходе реакции с TAT (1.8 мМ, 1) и DVS (2.7 мМ, 2); молярное соотношение аминокрупп белков и винильных групп сшивающего агента 1/12.

мин (Serva, Германия), хлорид цинка, дитиотреит, SDS, глицин (Fluka, Швейцария), акриламид и *N,N'*-метиленбисакриламид (Biorad, США), рекомбинантный гормон роста человека (Biotechna UAB, Литва). 1,3,5-Триакрилоилгексагидро-*c*-триазин синтезировали по методу [20].

Взаимодействие глицина с DVS изучали в термостатируемой кювете при $30 \pm 0.1^\circ\text{C}$. Реакционную смесь (11 мл) готовили в 0.025 М боратном буфере (pH 8.9–7.5). Варьировали концентрацию глицина от 6.95×10^{-4} до 7.56×10^{-4} М и концентрацию DVS от 9.05×10^{-4} до 181×10^{-4} М. В процессе реакции отбирали пробы (0.5 мл) каждые

Таблица 2. Выход химически сшитого димера рекомбинантного гормона роста человека в зависимости от pH среды и молярного соотношения аминокрупп белка и винильных групп DVS

pH	Соотношение концентраций $[-\text{NH}_2 \text{ белка}]/[\text{CH}_2 = \text{CH}-]$	Время реакции, ч	Выход димера*
9.2	1/4	1	37
	1/12		15
	1/35		0
8.0	1/4	1	0
		2	6
		4	12

* В процентах от общего количества белка.

30 мин и определяли концентрацию аминокрупп титрованием тринитробензолсульфокислотой [21]. Эффективную константу реакции $k_{\text{эфф}}$ при различных значениях pH среды рассчитывали из начальных скоростей процесса, аппроксимируя экспериментальные данные полиномом третьей степени [22].

Взаимодействие DVS с аминокруппами белков изучали в термостатируемой кювете при $30 \pm 0.1^\circ\text{C}$. К 10 мл раствора α -казеина (1.8 мг/мл) или BSA (1.5 мг/мл) в 0.05 М боратном буфере (pH 9.2, предварительно термостатировали в течение 5 мин) добавляли 1 мл раствора DVS в том же буфере до конечной концентрации 9.05×10^{-4} М. В процессе реакции отбирали пробы (0.5 мл) каждые 30 мин и измеряли концентрацию аминокрупп белка титрованием тринитробензолсульфокислотой [21]. Константу скорости реакции аминокрупп белка с DVS рассчитывали из начальных скоростей, аппроксимируя экспериментальные данные полиномом третьей степени [22]. Стандартное отклонение рассчитано из трех параллельных опытов.

Сшивание субъединиц рекомбинантного гормона роста человека проводили в 0.05 М боратном буфере при pH 9.2 (0.028 мМ Zn^{2+} , 0.014 мМ белок, 0.9–8.1 мМ DVS или 1.8 мМ TAT). Реакционную смесь (1 мл) термостатировали при $30 \pm 0.1^\circ\text{C}$, пробы отбирали через 0.5, 1, 2 и 3 ч, охлаждали до 5°C и интенсивно диализовали. Сшивание субъединиц гормона роста в 0.05 М боратном буфере pH 8.0 проводили аналогично при концентрации DVS 0.9 мМ в течение 4 ч. Пробы анализировали методом SDS-гель-электрофореза в 15% ПААГ на аппарате фирмы Biometra (Германия) [23]. Для восстановления S–S-связей образцы готовили с 100 мМ дитиотреитом. Гели окрашивали Кумасси ярко-голубым и денситометрировали на денситометре CS 930 фирмы Shimadzu (Япония).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ford-Moore A.H. // J. Chem. Soc. 1949. P. 2433–2440.
2. Stahmann M.A., Golumbic C., Stein W.H., Fruton J.S. // J. Org. Chem. 1946. V. 11. P. 719–735.
3. Friedman M., Wall J.S. // J. Org. Chem. 1966. V. 31. P. 2888–2894.
4. Friedman M., Finley J.W. // Int. J. Pept. Protein Res. 1975. V. 7. P. 481–486.
5. Masri M.S., Friedman M. // J. Protein Chem. 1988. V. 7. P. 49–54.
6. Morpurgo M., Veronese F.M., Kachensky D., Harris J.M. // Bioconjugate Chem. 1996. V. 7. P. 363–368.
7. Banks T.E., Bourns J.C., Francis G.E., Hopwood F.L., Wormald A. // Biochem. J. 1946. V. 40. P. 734–736.
8. Houen G., Jensen O.M. // J. Immunol. Methods. 1995. V. 181. P. 187–200.

9. Ciglic M.I., Jackson P., Raillard S.A., Haugg M., Jermann T.M., Opitz J.G., Trabesinger-Ruf N., Benner S.A. // *Biochemistry*. 1998. V. 37. P. 4008–4022.
10. Russo N., Antignani A., D'Alessio G. // *Biochemistry*. 2000. V. 39. P. 3585–3591.
11. Lihme A., Schafer-Nielsen C., Larsen K.P., Muller K.G., Bog-Hansen T.C. // *J. Chromatogr.* 1986. V. 376. P. 299–305.
12. Berna P.P., Porath J. // *J. Chromatogr. A*. 1996. V. 753. P. 57–62.
13. De Pauw P., Neyt C., Vanderwinkel E., Wattiez R., Falmagne P. // *Protein Expr. Purif.* 1995. V. 6. P. 371–378.
14. Dienys G., Sereikaite J., Gavėnas G., Kvederas R., Bumelis V.-A. // *Bioconjugate Chem.* 1998. V. 9. P. 744–748.
15. Денис Г., Кунскайте Л., Вайткевичюс А. // *ДАН*. 1974. Т. 216. С. 1300–1301.
16. Денис Г., Кунскайте Л., Вайткевичюс А., Климавичюс А. // *Реакцион. способн. орган. соедин.* 1975. Т. 12. С. 275–280.
17. Данилевичюте М., Адоменене О., Денис Г. // *Реакцион. способн. орган. соедин.* 1981. Т. 66. С. 212–219.
18. Cunningham B.C., Mulkerrin M.G., Wells J.A. // *Science*. 1991. V. 253. P. 545–548.
19. Dienys G., Sereikaite J., Lukša V., Jarutienė O., Mištinienė E., Bumelis V.-A. // *Bioconjugate Chem.* 2000. V. 11. P. 645–651.
20. Gresham T.L., Steadman T.R. // *J. Am. Chem. Soc.* 1949. V. 71. P. 1872–1873.
21. Йонушене З., Денис Г., Степонавичус Ю. // *Журн. анал. химии*. 1988. Т. 43. С. 536–540.
22. Dagys R., Pauliukonis A., Kazlauskas D., Mankevicius M., Simutis R. // *Biochem. J.* 1986. V. 237. P. 821–825.
23. Laemmli U.K. // *Nature*. 1970. V. 227. P. 680–685.

Divinyl Sulfone as a Cross-linking Reagent for Oligomeric Proteins

J. Sereikaite^{*,#}, D. Bassus^{*}, R. Bobnis^{**}, G. Dienys^{**}, Z. Bumeliene^{*}, and V.-A. Bumelis^{*}

[#] Phone: (370-5)-274-4972, e-mail: sjolanta@fm.vtu.lt

^{*} Faculty of Fundamental Sciences, Gediminas Technical University, Vilnius, Sauletekio al. 11, Vilnius, 2040 Lithuania

^{**} Faculty of Chemistry, Vilnius University, Naugarduko 24, Vilnius, 2006 Lithuania

The kinetics of the nucleophilic addition reactions of divinyl sulfone to amino groups of glycine and model proteins was studied in aqueous solution at 30°C. The rate constants for glycine, bovine serum albumin, and α_1 -casein were $(4.84 \pm 0.58) \times 10^{-1}$, $(2.97 \pm 0.31) \times 10^{-2}$, and $(2.38 \pm 0.49) \times 10^{-2} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectively. Divinyl sulfone was proposed as a cross-linking reagent for the qualitative detection of protein association in solution. The cross-linking capacity of divinyl sulfone was compared to that of 1,3,5-triacryloylhexahydro-s-triazine. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 3; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: divinyl sulfone, oligomeric proteins, protein cross-linking, 1,3,5-triacryloylhexahydro-s-triazine