



УДК 547.963.2

ОБРАТИМАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ АЛЬДЕГИДАМИ

*Глинка А. В., Воронина А. С.**Институт биохимии им. А. Н. Баха Академии наук СССР, Москва*

Обработана методика снятия альдегидных модификаторов (формальдегида и глиоксала) с белков при инкубации их в растворах, содержащих гидроксилламин. В качестве модельных белков использован казеин и глицеральдегидофосфатдегидрогеназа. Взаимодействие белков с альдегидами тестировали по уменьшению гидролизваемости белка трипсином, по появлению высокомолекулярных полимеров белка, выявляемых методом электрофореза в полиакриламидном геле, или по появлению радиоактивности в белке после обработки его меченым ^{14}C -формальдегидом. О снятии альдегидных модификаторов с белка судили по восстановлению электрофоретической картины и степени гидролиза трипсином или по удалению радиоактивной метки с белка. Показано, что глиоксаль легко удаляется с белка в довольно мягких условиях (4° , 1М глицин, 1М гидроксилламин, 6М мочевины, pH 9,7—9,6). Удаление формальдегида наблюдалось в более жестких условиях, приводящих к частичному гидролизу пептидной связи, а удаление глутарового альдегида осуществить не удалось.

Взаимодействию белков и рибонуклеопротеидов с альдегидами посвящено много работ [1—11]. В частности, для фиксации рибонуклеопротеидов перед их анализом в градиенте плотности CsCl применяют обработку некоторыми альдегидами [1, 4]. Для дальнейшего изучения белков рибонуклеопротеидов необходимо разработать способ удаления фиксирующего агента из их состава. Мы предполагаем, что за устойчивость рибонуклеопротеидов в высокой ионной силе ответственны внутри- или межбелковые сшивки.

При взаимодействии альдегидов с белками может происходить ряд реакций, сопровождающихся модификацией одного или двух остатков аминокислот белка на одну молекулу альдегида. В первом случае происходит просто модификация, во втором — образование внутри- или межбелковых сшивок.

Реакции глутарового альдегида с гистидином и тирозином описаны в работе Хабиба [5]. Показано, что реакция остатков этих аминокислот протекает значительно медленнее, чем реакция с лизином, цистеином и N-концевой аминогруппой. Гистидин дает метильное производное, а тирозин, вероятно, включает оксиметиленовую группу в фенольное кольцо. Эти реакции могут быть отнесены к простой модификации, без образования сшивок. Реакции с лизином и цистеином [5] могут приводить к образованию сшивок. Продукт реакции с цистеином лабилен [10], и его вклад в фиксацию белка или рибонуклеопротеида мал по сравнению с лизином. Последний, реагируя с альдегидами при pH 7 и 20° , образует основания Шиффа [8, 9, 11], хотя в случае глутарового альдегида авторы предлагают и иные продукты [12].

Гидролиз трипсином модифицированного казеина

| Вид модификатора | Модифицированный казеин | | Смесь модифицированного и немодифицированного казеина (1:1) | | Уменьшение параметра модификации, $\frac{100\% - A_1}{100\% - A_2}$ |
|---------------------|-------------------------|-------------------------------------|---|-------------------------------------|---|
| | % гидролиза, A_1 | параметр модификации, $100\% - A_1$ | % гидролиза, A_2 | параметр модификации, $100\% - A_2$ | |
| Глутаровый альдегид | 43,5 | 56,5 | 68,5 | 31,5 | 1,79 |
| Глиоксаль | 49,5 | 50,5 | 73,0 | 27,0 | 1,87 |
| Формальдегид | 27,5 | 72,5 | 62,0 | 38,0 | 1,91 |

Известно, что гидролиз оснований Шиффа происходит обычно в растворах с низкими значениями рН ($\sim 2-3$), т. е. в условиях, не исключающих гидролиз пептидной связи. Поэтому для обращения альдегидной модификации лизина мы решили использовать гидроксиламинолиз оснований Шиффа в нейтральных средах. Обменные реакции этого типа изучались ранее, и в ряде работ [15—17] показано, что продуктами этих реакций являются исходный амин и оксим соответствующего карбонильного соединения.

Представляется возможным использовать обменные реакции для освобождения модифицированных аминокрупп белков. Отработке метода удаления альдегидных модификаторов с белков и посвящена наша работа.

Модификация белков альдегидами и количественное определение степени модификации. Для модификации глицеральдегидофосфатдегидрогеназы были использованы условия, применяющиеся при фиксации рибонуклеопротеидов, описанные в литературе для формальдегида [1]. В случае глутарового альдегида фиксацию производили по модифицированной методике Балтимора [4]. Для глиоксаля мы взяли условия, тождественные применявшимся в случае формальдегида [1].

Однако в этих условиях модифицируется лишь небольшое количество основных групп в белке, что затрудняет в дальнейшем количественную оценку удаления модификатора. Поэтому для модификации казеина нами были подобраны более жесткие условия обработки альдегидами, чем в случае с глицеральдегидофосфатдегидрогеназой. Это позволило использовать для количественного определения степени модификации основных аминокислот казеина метод трипсинового гидролиза.

Известно, что трипсин расщепляет пептидную связь только по остаткам лизина и аргинина. После обработки казеина альдегидами гидролизуемость его трипсином уменьшается (см. таблицу, стлб. 1). Степень гидролиза модифицированного казеина выражалась в процентах от гидролиза немодифицированного казеина. Поскольку процент гидролиза отражает количество доступных ферменту остатков лизина и аргинина, величину, дополняющую процент гидролиза до 100%, можно определить как «параметр модификации».

Ферментативный гидролиз проводили в стандартных условиях в течение 20 мин. За это время кривая гидролиза исходного казеина выходит на достаточно пологий участок (рис. 1).

Отсутствие примесей в альдегидах, которые могли бы вызвать ингибирование трипсина, было показано следующим образом. Казеин обрабатывали тремя альдегидами — глутаровым, глиоксалем и формальдегидом. После удаления альдегидов часть казеина гидролизовали трипсином сразу, а часть перед обработкой трипсином смешивали в отношении 1 : 1 с немодифицированным казеином. Если бы в процессе модификации в препарат вносились примеси, ингибирующие трипсин, они ингибировали бы также гидролиз исходного казеина. Если же нет, то в смеси процент модифицированных групп, т. е. параметр модификации, уменьшился бы в 2 раза за счет разбавления исходным казеином. Результаты этого опыта

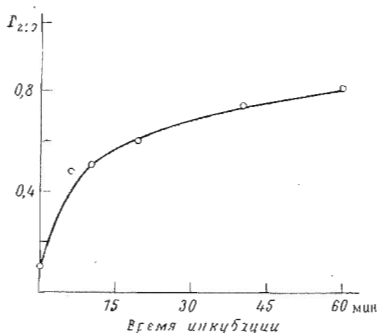


Рис. 1. Кинетика расщепления казеина трипсином при 37° в бикарбонатном буферном растворе

(таблица) показывают, что при разбавлении модифицированного казеина исходный параметр модификации уменьшается почти вдвое, что говорит об очень неблагоприятном ингибировании трипсина в условиях опыта.

Уменьшение гидролиземости казеина после фиксации можно объяснить тремя обстоятельствами:

1) модификацией остатков лизина и аргинина и вследствие этого уменьшением точек разрыва трипсином;

2) образованием {внутрибелковых сшивок, фиксирующих одну или несколько конформаций, в которых ферментативный гидролиз трипсином невозможен по стерическим причинам;

3) уменьшением растворимости пептидов при осаждении трихлоруксусной кислотой за счет модификации лизина и возможного увеличения их молекулярного веса в случае образования сшивок (см. «Экспериментальную часть»).

Для выяснения степени влияния вышеперечисленных факторов на уменьшение гидролиземости казеина трипсином после модификации альдегидами было изучено расщепление модифицированного казеина химотрипсином. Второй и третий факторы должны уменьшать гидролиземость казеина любым протеолитическим ферментом. К этому еще может добавиться частичная модификация остатков ароматических аминокислот.

Действительно, гидролиз химотрипсином казеина, модифицированного формальдегидом, составил 70% от величины гидролиза немодифицированного казеина. Проводился он в тех же условиях, что и гидролиз трипсином, поскольку форма кривой кинетики расщепления немодифицированного казеина химотрипсином практически не отличалась от соответствующей кривой в случае трипсина. Однако гидролиз казеина, модифицированного в этих же условиях, но расщеплявшегося трипсином, происходил лишь на 30% от гидролиза немодифицированного казеина.

Таким образом, первый фактор имеет определяющее влияние на степень гидролиза по сравнению с суммой второго и третьего факторов. Это позволяет нам считать, что данные, полученные методом трипсинового гидролиза, отражают степень модификации остатков основных аминокислот казеина.

Удаление модифицирующих групп с белков. Для удаления модифицирующих групп с белков использовали растворы гидроксиламина, содержащие мочевины для предотвращения агрегации при значениях pH, близких к изоэлектрической точке белка. Казеин после модификации освобождали диализом от избытка альдегида, далее диализом же переводили в буферный раствор, содержащий гидроксиламин. После прогрева в присутствии гидроксиламина казеин переводили диализом в бикарбонатный буферный раствор, разбавляли до стандартной концентрации и гидролизовали трипсином, как описано в «Экспериментальной части».

Результаты обработки казеина, модифицированного глутаровым альдегидом и формальдегидом, буферным раствором, содержащим гидроксиламин, показывают (рис. 2 и 3), что гидроксиламин не снимает модификацию, вызванную глутаровым альдегидом. Это совпадает с данными Ф. М. Ричардса с соавт. [12]. Модификация, вызываемая формальдегидом, снимается за 60—80 мин. Из рис. 3 видно, что гидролиземость немодифицированного казеина почти не изменяется при этой обработке. Эффект снятия модификации вызывается именно гидроксиламином, так как в его от-

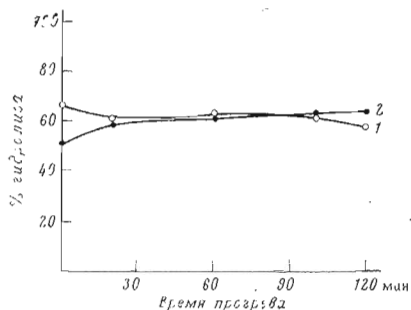


Рис. 2

Рис. 2. Влияние времени прогрева при 80° казеина, модифицированного глутаровым альдегидом, на его гидролизуемость трипсином. Процент гидролиза трипсином после прогрева в растворе А (1) и В (2)

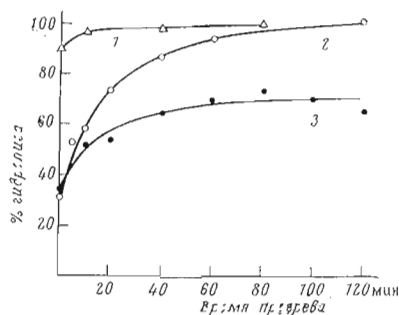


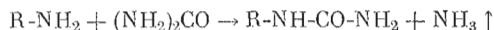
Рис. 3

Рис. 3. Влияние времени прогрева при 80° казеина, модифицированного формальдегидом, на его гидролизуемость трипсином. Процент гидролиза трипсином: 1 — немодифицированного казеина после прогрева в растворе А; 2 — казеина, модифицированного формальдегидом, после прогрева в растворе А; 3 — то же в растворе В

существование при тех же условиях удаление модифицирующих групп протекает значительно медленнее (рис. 3, 3).

При pH 7,25 освобождение модифицированных групп происходит медленнее и сопровождается некоторым снижением уровня гидролиза немодифицированного казеина, прогретого в течение 120 мин в тех же условиях (рис. 4, 2).

Этот эффект можно объяснить образованием производных мочевины по реакции



Освобождение модифицированных групп в случае формальдегида удалось показать также с помощью меченого ^{14}C -формальдегида. Обработка казеина, модифицированного ^{14}C -формальдегидом, буферным раствором А в течение 2 ч при 80° привела к снижению радиоактивности с 98 500 имп/мин в единице оптической плотности при λ 280 нм до 14 900 имп/мин. Таким образом, 85% модифицированных групп было освобождено. Остаток радиоактивности в 15% можно объяснить модификацией остатков ароматических аминокислот и наличием примесей в препарате формальдегида (например, сорбцией на белке полимеров формальдегида). Этот результат является прямым доказательством возможности освобождения групп, модифицируемых формальдегидом, и совпадает с результатами, полученными методом ферментативного гидролиза трипсином.

Модификация, вызываемая глиоксалем при наших условиях обработки белка, удаляется гидроксиламином еще легче, чем в случае формальдегида. Из рис. 5 видно, что наиболее быстро освобождение модифицированных групп происходит в буферном растворе В при pH 7,25 (80°). Медленнее этот процесс идет в буферном растворе А при pH 6 (80°). Удаление из состава буферного раствора гидроксиламина резко замедляет процесс освобождения модифицированных групп (рис. 5, 3). Диализ против буферного раствора В (pH 9,70—9,60; 4°) приводит к почти полному освобождению модифицированных групп.

Кривая 1 рис. 5 начинается с 90% гидролиза, а после модификации глиоксалем гидролиз обычно составляет 60—70%.

Электрофоретическое изучение белков, подвергавшихся модификации. Данные о степени модификации белков альдегидами, полученные при помощи трипсинового метода, подтверждены нами методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия.

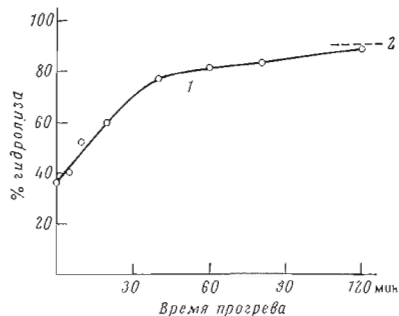


Рис. 4

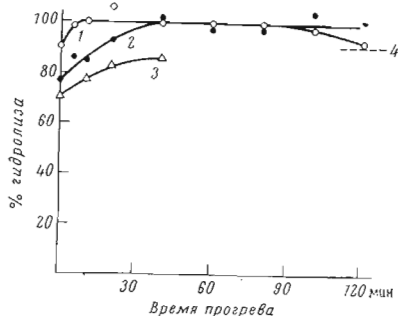


Рис. 5

Рис. 4. Влияние времени прогрева при 80° казеина, модифицированного формальдегидом, на его гидролизуемость трипсином. Процент гидролиза трипсином: 1 — казеина, модифицированного формальдегидом после прогрева в растворе В; 2 — немодифицированного казеина после прогрева в течение 120 мин в растворе В

Рис. 5. Влияние времени прогрева при 80° казеина, модифицированного глиоксалем, на его гидролизуемость трипсином. Процент гидролиза трипсином казеина, модифицированного глиоксалем после прогрева в растворах В (1), А (2), Г (3), немодифицированного казеина после прогрева в растворе В в течение 120 мин (4)

В качестве модельного белка использовалась глицеральдегидофосфатдегидрогеназа. После модификации этого белка глутаровым альдегидом, глиоксалем и формальдегидом в геле появляются полосы, отвечающие димеру, тримеру и более высокомолекулярным полимерам исходного белка (см., например, рис. 6 б), что совпадает с данными Ховвуда [6—8, 13] *.

Оказалось, что образование межбелковых сшивок идет гораздо интенсивнее при осаждении белка спиртом из избытка альдегида. Если же избыток альдегида удалялся диализом или обработкой боргидридом натрия, доля высокомолекулярной фракции сильно уменьшалась и старт геля был почти чист.

Удаление модифицирующих групп должно сопровождаться восстановлением электрофоретической картины исходного белка. Восстановление электрофоретической картины в случае глиоксалия происходит после диализа в раствор В (рис. 6в), в случае же формальдегида — при более жестких условиях: прогрев при 80° в растворе А в течение 1 ч (рис. 7з), причем через 1 ч ниже полосы глицеральдегидофосфатдегидрогеназы появляется ряд диффузных полос. Возможно, это результат частичного гидролиза белка до крупных пептидов.

В случае глутарового альдегида восстановления электрофоретической картины не происходило.

Экспериментальная часть

Использовали буферные растворы: А — 1 М гидроксилламин, 6 М мочевины, 0,5 М Трис, рН 6 при 80° , рН 7,50 при 20° ; В — 0,50 М Трис, 6 М мочевины, рН 6 при 80° , рН 7,50 при 20° ; В — 1 М гидроксилламин, 1 М глицин, 6 М мочевины, рН 7,25 при 80° , рН 9,70—9,60 при 4° ; Г — 1 М глицин, 6 М мочевины, рН 7,25 при 80° , рН 9,70—9,60 при 4° . Бикарбонатный буфер — 0,3 М бикарбонат натрия, рН 7,50—7,60. Фосфатный буфер — 0,1 М фосфат натрия, рН 7—7,10.

Для модификации белков применяли глутаровый альдегид в виде 25% раствора (Мерск, ФРГ), глиоксаль в форме 40% раствора тримера (Мерск, ФРГ), 40% формальдегид отечественного производства. Содержание альде-

* В случае использования методики [18] проведения электрофореза полосы полимеров в случае глиоксалия исчезают.

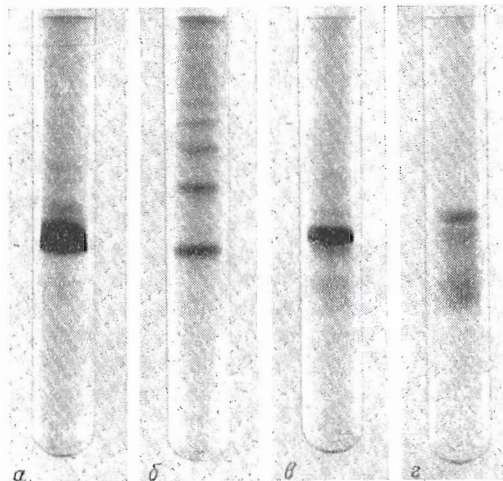


Рис. 6. Электрофоретическое распределение глицеральдегидо-фосфатдегидрогеназы до модификации глиоксалем (а), после модификации (б), после диализа модифицированного белка при 4° в буферном растворе В (в) и после прогрева модифицированного белка в буферном растворе В в течение 60 мин (г)

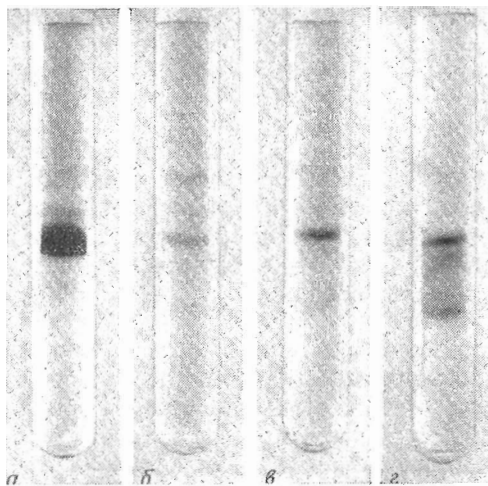


Рис. 7. Электрофоретическое распределение глицеральдегидо-фосфатдегидрогеназы до модификации формальдегидом (а), после модификации (б), после прогрева при 80° в растворе А в течение 15 мин (в) и 60 мин (г)

гидов в продажных препаратах контролировали титрометрически [19]. Гидроксиламин (Reanal, Венгрия) перекристаллизовывали из водно-спиртовой смеси, Трис (Reanal, Венгрия) — из воды. Для приготовления буферных растворов брали реактивы квалификации ч.д.а. и ос.ч.

В работе использовали казеин по Гаммарстену квалификации х.ч. (Reanal, Венгрия), кристаллические химотрипсин и трипсин (производство Института биологической и медицинской химии АМН СССР), глицеральдегидофосфатдегидрогеназу (Reanal, Венгрия).

Глицеральдегидофосфатдегидрогеназу перед употреблением переводили диализом в нужный буфер, освобождаясь при этом от сульфата аммония. Казеин растворяли в фосфатном буфере и прогревали 2 ч на кипящей водяной бане.

Модификация белков альдегидами. Глицеральдегидофосфатдегидрогеназу, растворенную в фосфатном буфере, обрабатывали 17 ч при 4° при концентрации белка 5 мг/мл. Казеин, растворенный в фосфатном буфере, обрабатывали 1 ч при 37° при концентрации белка 15 мг/мл. Концентрация глицероаля и формальдегида при модификации составляла 4%, глутарового альдегида — 0,1%. После модификации белки диализом освобождали от избытка фиксатора и переводили в буферный раствор нужного состава.

Модификация казеина меченым ¹⁴C-формальдегидом. Для модификации использовали отечественный препарат ¹⁴C-формальдегида с общей активностью 1 мКи в 0,67 мл 14,3% раствора. Модификацию казеина ¹⁴C-формальдегидом осуществляли в фосфатном буфере при 37° в течение 2 ч. Непрореагировавший избыток формальдегида удаляли многократным диализом против буферного раствора, содержащего 6 М мочевины и 0,1 М бикарбонат (рН 7,80). Диализ вели до тех пор, пока вокруг диализного мешка не регистрировались фоновые значения радиоактивности. Далее белок переводили диализом в буферный раствор А. Радиоактивность измеряли до и после прогрева на сцинтилляционном счетчике SL-40 (Inter-technique, Франция).

Расщепление казеина трипсином. Расщепление казеина проводили в течение 20 мин при 37° [20]. Исследуемый образец казеина разводили бикарбонатным буфером до оптической плотности 4,5 ед. при λ 280 нм и к 1 мл этого раствора добавляли 1 мл 0,05% раствора трипсина в 0,001 М HCl. Через 20 мин приливали 2 мл 6% трихлоруксусной кислоты и через 1 ч осадок отфильтровывали, а в фильтрате измеряли оптическую плотность при λ 280 нм, которую принимали за величину гидролиземости казеина. При изучении кинетики гидролиза казеина трипсином варьировалось время гидролиза до добавления трихлоруксусной кислоты.

Электрофорез белков в полиакриламидном геле. Белки осаждали тремя объемами этанола из растворов, предварительно отдиализованных от альдегидов. В некоторых случаях, специально оговоренных выше, белок осаждали, не удаляя альдегид из раствора. Подготовку белков к электрофорезу и электрофорез в полиакриламидном геле проводили по методике [21] с той лишь разницей, что использовали 5% гели.

Авторы выражают глубокую благодарность А. С. Спирину, А. А. Богданову и Э. И. Будовскому за внимание к работе и обсуждение результатов, а также И. В. Федоровой и А. И. Родионовой за помощь в работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Spirin A. S., Belitsina N. V., Lerman M. N. (1965) J. Mol. Biol., 14, 611—615.
2. Ruschman E. (1965) Р. ж. Биохимия, 4, 244.
3. Wold G. (1967) in Methods in Enzymology (Wold G., ed.), v. XI, pp. 617—640, Acad. Press, N. Y.—London.
4. Baltimore D., Huang A. S. (1968) Science, 162, 572.
5. Habeeb A. F. S. A., Hiramoto R. (1963) Arch. Biochem. and Biophys., 126, 16—26.
6. Hopwood D. (1969) Histochemie, 17, 151—161.
7. Hopwood D. (1970) Histochem. J., 2, 137—156.
8. Hopwood D. (1970) Histochem. J., 3, 201—205.
9. Нехорошев С. А., Прессман Е. К., Сандакчиев Л. С. (1971) Биохимия, 36, 586—591.
10. Ruschman E., von (1964) Z. Naturforsch., 19b, 337—343.
11. Троицкий Г. В., Ажикский Г. Ю. (1971) Биохимия, 36, 915—920.
12. Richards F. M., Knowles J. R. (1968) J. Mol. Biol., 37, 231.
13. Hopwood D. (1972) Histochem. J., 4, 267—303.
14. Порай-Кошиц Б. А., Познанская Э. М., Шевченко В. С., Павлова Л. А. (1947) Ж. орган. химии, 17, 10.
15. Kochler K., Sandstrom W. (1964) J. Amer. Chem. Soc., 86, 2413—2419.
16. Green R. W., Alexander P. W., Sleet R. J. (1973) Austral. J. Chem., 26, 1653—1661.
17. Константинова Н. В., Баскаков Ю. А. (1975) Р. ж. Химия, 8, 388 деп.
18. Шеняудко Н. С. (1975) Цитология, 17, 1148—1154.

19. Губен И., Вейль Т. (1967) Методы органической химии, 2, с. 452, «Химия», М.
20. Нортрон Д., Кунитц М., Херриот Р. (1950) Кристаллические ферменты, с. 303, «Мир», М.
21. Weber K., Osborn M. (1969) J. Biol. Chem., 244, 4406—4412.

Поступила в редакцию
15.III.1977

REVERSIBLE MODIFICATION OF PROTEINS BY ALDEHYDES

GLINKA A. V., VORONINA A. S.

*A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

A procedure was worked out for removing aldehydes (formaldehyde and glyoxal) from modified proteins, which involved incubation with hydroxylamine and was exemplified with casein and glyceraldehyde phosphate dehydrogenase. The aldehyde modification of proteins was monitored by decrease in extent of trypsin-catalyzed protein cleavage, by formation of polymers as judged from the electrophoresis in polyacrylamide gel, or by appearance of radioactivity in the proteins after their treatment with [¹⁴C]-formaldehyde. Glyoxal was shown to be removed under relatively mild conditions (1 M hydroxylamine, 1 M glycine, 6M urea, 4°, pH 9.6-9.7); to remove formaldehyde more drastic treatment was necessary which resulted in partial hydrolysis of peptide bonds. The attempts at removing glutaric aldehyde proved unsuccessful.
