



УДК 577.17.07+547.962.03:535.37

ИССЛЕДОВАНИЕ ТИРЕОГЛОБУЛИНА МЕТОДОМ
СОБСТВЕННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

И.* ИОДИРОВАННЫЙ И АЦЕТИЛИРОВАННЫЙ ТИРЕОГЛОБУЛИН

*Ахмеджанов И. Г., Гуссаковский Е. Е., Бабаев Т. А.**Институт биохимии Академии наук УзССР, Ташкент*

Методом триптофановой и тирозиновой флуоресценции исследовали водные и водно-солевые растворы интактного, ацетилированного диацетиламиноциклогексеноном, иодированного, а также иодированного с предварительным ацетилированием бычьего тиреоглобулина. Отсутствие существенных сдвигов спектров флуоресценции на фоне изменения квантового выхода флуоресценции остатков триптофана и тирозина указывает на локальные перестройки при модификациях белка, которые происходят вследствие перераспределения зарядов в областях расположения триптофана, тирозина и диiodтирозина. Вероятно, подобные перестройки могут регулировать функциональную активность тиреоглобулина.

Образование гормона тироксина в молекуле тиреоглобулина (природный иодпротеин) во многом зависит от стерической близости иодтирозинных остатков [2], которая определяется конформационным состоянием макромолекулы белка. Дополнительное искусственное иодирование тиреоглобулина ведет к росту количества моно- и диiodтирозинных остатков, а также тироксина [2]. Это позволяет использовать иодирование как модель биосинтеза гормона. Ацетилирование тиреоглобулина 2-N-диацетиламиноциклогексен-2-оном приводит к уменьшению способности образования иодаминокислот при его последующем иодировании, т. е. к изменению его функциональной активности [3]. Поэтому в плане изучения структурно-функциональных отношений в молекуле тиреоглобулина представлялось целесообразным изучение влияния ацетилирования, иодирования и иодирования ацетилированного тиреоглобулина на параметры флуоресценции триптофановых и тирозиновых остатков с целью получения информации о структурных изменениях белка [4]. Спектрофлуоресцентные характеристики тиреоглобулина определены ранее [1]. Поскольку ацетилирование уменьшает число положительно заряженных групп, принимая во внимание электростатические взаимодействия ионов растворителя с белком [5], исследование проводили как для водных, так и для водно-солевых растворов (0,9% NaCl, $I=0,15$). Кроме того, измеряли зависимость параметров флуоресценции от pH раствора, так как в нейтральной области pH был обнаружен слабый конформационный переход [1], который, возможно, имеет некоторое функциональное значение [4, 6].

Спектры флуоресценции при возбуждении светом с λ 296,7 нм интактного и всех образцов модифицированного тиреоглобулина в водном и вод-

* Сообщение I см. [1].

Основные параметры флуоресценции растворов* интактного и модифицированного тиреоглобулина при pH 6,5 и возбуждении 296,7 нм

| Тиреоглобулин ** | Квантовый выход | | $\lambda_{\text{макс}}$, нм | | Полуширина спектра, нм | |
|--------------------------------|-----------------|-------------|------------------------------|-----|------------------------|----|
| | I | II | I | II | I | II |
| Интактный | 0,103±0,001 | 0,128±0,002 | 333 | 331 | 48 | 51 |
| Ацетилированный | 0,132±0,001 | 0,142±0,002 | 333 | 333 | 50 | 49 |
| Иодированный | 0,101±0,002 | 0,108±0,003 | 333 | 334 | 50 | 50 |
| Ацетилированный и иодированный | 0,081±0,003 | 0,117±0,001 | 331 | 331 | 51 | 51 |

* I — раствор в 0,9% NaCl, II — водный раствор.
 ** Условия модификации см. текст.

Таблица 2

Квантовый выход тирозиновой флуоресценции растворов интактного и модифицированного тиреоглобулина при pH 6,5

| Тиреоглобулин * | Водно-солевой раствор (0,9% NaCl) | Водный раствор |
|--------------------------------|-----------------------------------|----------------|
| Интактный | 0,0123±0,0013 | 0,0114±0,0009 |
| Ацетилированный | 0,0101±0,0016 | 0,0116±0,0010 |
| Иодированный | 0,0077±0,0003 | 0,0152±0,0020 |
| Ацетилированный и иодированный | 0,0077±0,0012 | 0,0063±0,0011 |

* Условия модификации см. текст.

но-солевом растворе имеют максимум в области 331–334 нм и полуширину 48–51 нм, что является типичным для триптофансодержащих белков, в которых основная часть триптофановых остатков находится в гидрофобной области молекулы [4, 1]. Ацетилирование тиреоглобулина повышает квантовый выход флуоресценции остатков триптофана (табл. 1). Это могло бы свидетельствовать в пользу перехода остатков триптофана в ацетилированном белке в воднодоступную область, т. е. об изменении функционально определяющей конформации молекулы. Однако, как видно из табл. 1, повышение квантового выхода не сопровождается характерным для такой перестройки [4] изменением положения максимума и полуширины спектра. Многие боковые цепи аминокислот, в том числе лизина и аргинина, способны тушить флуоресценцию индола [7]. Отсюда можно заключить, что повышение квантового выхода, видимо, отвечает некоторым структурным перестройкам макромолекулы, уменьшающим эффективность такого тушения, либо свидетельствует об относительной пространственной близости остатков триптофана к аминокетильным группам лизина и аргинина, которые после ацетилирования теряют способность к тушению флуоресценции.

Для всех образцов тиреоглобулина повышение ионной силы раствора уменьшает значение квантового выхода флуоресценции триптофановых остатков также без изменения остальных спектральных характеристик. Вероятно, это связано с тем, что рост концентрации соли в растворе белка приводит к нейтрализации отрицательного заряда карбоксильных групп ионами Na^+ . Сооставление этого результата с повышением квантового выхода при ацетилировании подтверждает существенную роль электростатических взаимодействий в формировании микроокружения триптофановых остатков в тиреоглобулине.

Учитывая, что микроокружение тирозиновых остатков не влияет на форму и положение спектра их флуоресценции [8], при изучении всех

образцов тиреоглобулина оценивали только квантовый выход флуоресценции остатков тирозина. Ацетилирование в пределах разброса не изменяет выхода тирозиновой флуоресценции как водных, так и водно-солевых растворов тиреоглобулина (табл. 2). Поскольку гуанидиновая группа не является, по-видимому, тушителем тирозиновой флуоресценции, а $\epsilon\text{-NH}_3^+$ -группы остатков лизина эффективно ее тушат [7], эти результаты позволяют заключить, что модифицируемые остатки лизина, вероятно, не располагаются вблизи остатков тирозина.

Квантовый выход тирозиновой флуоресценции водного раствора иодированного тиреоглобулина превышает таковой для интактного белка; для водно-солевого раствора иодированного белка наблюдается обратный эффект. Остатки тирозина, расположенные внутри глобулы, дают значительно меньший квантовый выход, чем поверхностные [8]. Отсюда можно предположить, что иодирование остатков тирозина на поверхности определяет общее понижение квантового выхода в водно-солевом растворе. В таком случае рост квантового выхода в отсутствие электролита означает по крайней мере локальную перестройку молекулы тиреоглобулина в области тирозиновых остатков, при которой либо в их микроокружении ослабевают тушащие эффекты, либо некоторые внутренние остатки тирозина выходят на поверхность. Иодирование ацетилированного тиреоглобулина не влияет на выход флуоресценции остатков тирозина для водно-солевых растворов, тогда как для водных растворов выход заметно понижается. Последнее, видимо, также является следствием молекулярных перестроек. Заметим, что умеренная концентрация электролита как бы демпфирует действие ацетилирования ϵ -аминогрупп на структуру тиреоглобулина в областях расположения тирозидов.

Приведенные результаты соответствуют рН 6,5 растворов. Однако квантовый выход флуоресценции всех образцов сильно зависит от рН.

На рис. 1 и 2 представлены зависимости от рН квантового выхода и отношения интенсивностей на склонах спектра (которое весьма чувствительно к слабым спектральным сдвигам) триптофановой флуоресценции водных и водно-солевых растворов интактного и модифицированного тиреоглобулинов. Большинство кривых характеризуются переходами в области рН 6–8 (спектральный сдвиг на 1–2 нм). Аналогичные переходы наблюдались ранее [4] и были интерпретированы как конформационные изменения, в результате которых происходит изменение эффективности переноса энергии возбуждения между триптофановыми и иодаминокислотными остатками тиреоглобулина. Эти небольшие переходы с позиции теории трех флуоресцентных классов остатков триптофана в белках [4] не отражают их перераспределения между «поверхностными» и «внутренними». Поэтому изменения квантового выхода (рис. 1) могут означать только локальные перестройки молекулы тиреоглобулина, при которых изменяются перенос энергии и условия, способствующие тушению триптофановой флуоресценции соседними аминокислотными остатками.

Результаты, приведенные на рис. 1 и 2, показывают, что как иодирование, так и ацетилирование изменяет положение перехода на 1–1,5 единицы рН. При этом наблюдается влияние электролита. Поскольку падение квантового выхода (рис. 1) частично происходит вследствие увеличения эффективности переноса энергии при депротонировании гидроксидов иодаминокислот [4], при ацетилировании тиреоглобулина, видимо, увеличивается pK_a диссоциации гидроксила дииодтирозидовых остатков на ~ 1 ед. рН для водно-солевого раствора (рис. 1А, б). Водный же раствор ацетилированного белка имеет соответствующее pK_a , равное pK_a для водно-солевого раствора интактного тиреоглобулина (рис. 1А,а и Б,б). Если действие рН на макромолекулу тиреоглобулина вызывает только ее локальные перестройки, можно ожидать, что в водно-солевом растворе ацетилированного тиреоглобулина вблизи остатков дииодтирозина появятся анионные группировки (отрицательный заряд рядом с ионогенной

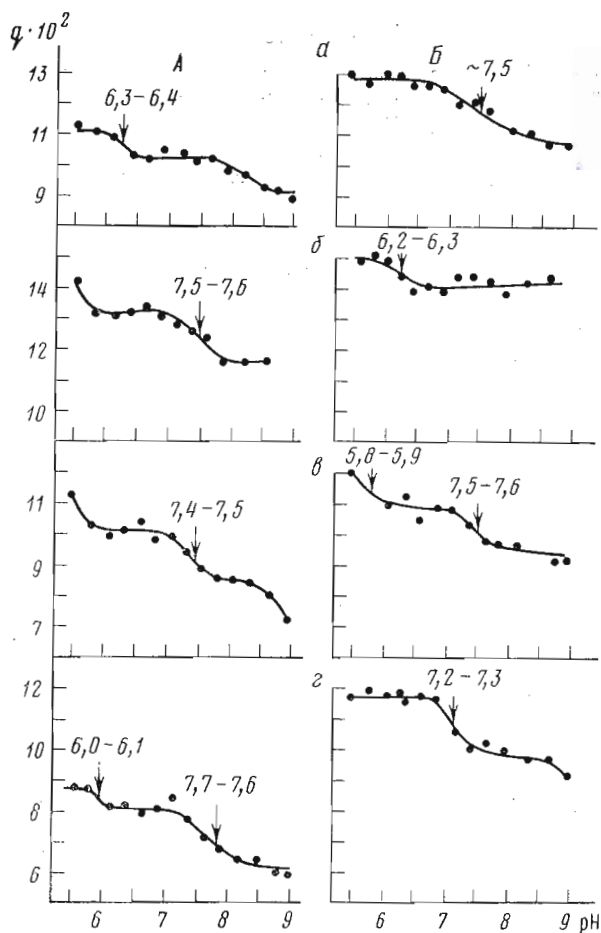


Рис. 1. Зависимость квантового выхода триптофановой флуоресценции от pH водно-солевых (А) и водных (Б) растворов интактного (а), ацетилированного (б), иодированного (в) и иодированного с предварительным ацетилированием (г) бычьего тиреоглобулина

группой повышает pK_a диссоциации — см., например, [9]). Если же ϵ -аминогруппы ацетируются в непосредственной близости к дииодтирозиновым остаткам, то не исключено, что кислород ацетильной группы образует водородную связь с водородом гидроксила дииодтирозина, затрудняя диссоциацию. Падение квантового выхода триптофановой флуоресценции в области pH 7,5 для иодированного интактного и ацетилированного тиреоглобулина, видимо, отвечает переносу энергии от остатков триптофана на вновь образованные дииодтирозиновые остатки, pK_a диссоциации гидроксила которых повышено присутствием вблизи них анионных групп. В условиях существования переноса энергии возбуждения от остатков триптофана на дииодтирозиновые остатки можно ожидать их относительную пространственную близость [1].

Таким образом, изменение зарядового состояния окружения дииодтирозинов при ацетилировании, вероятно, определяет влияние такой модификации на образование тироксина [3].

Зависимость квантового выхода тирозиновой флуоресценции всех образцов тиреоглобулина от pH, так же как и для триптофановой флуоресценции, характеризуется переходами в области pH 6—8 (рис. 3). Поскольку эффективность переноса энергии возбуждения с тирозина на иод-аминокислоты слабо зависит от состояния ионизации их гидроксила [1],

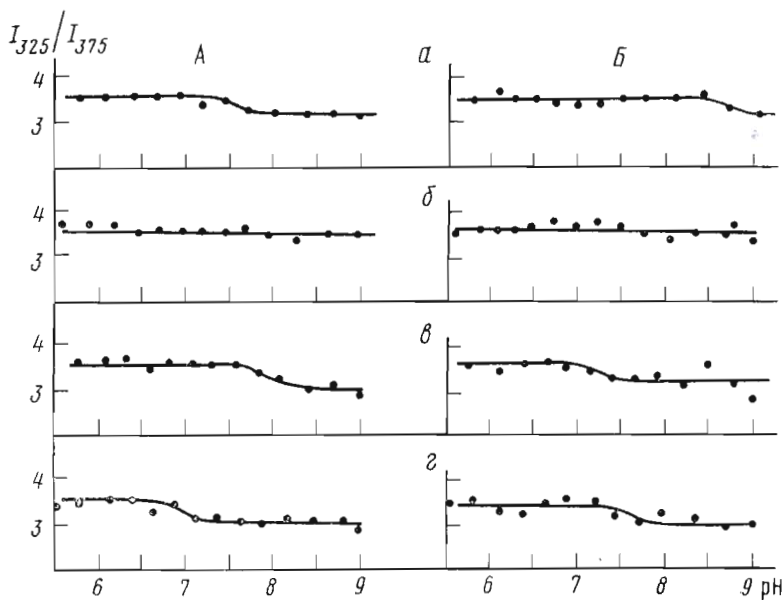


Рис. 2. Зависимость отношения интенсивностей флуоресценции при 325 и 375 нм от рН (возбуждение 296,7 нм) водно-солевых (А) и водных (Б) растворов intactного (а), ацетилированного (б), иодированного (в) и иодированного с предварительным ацетилированием (г) бычьего тиреоглобулина

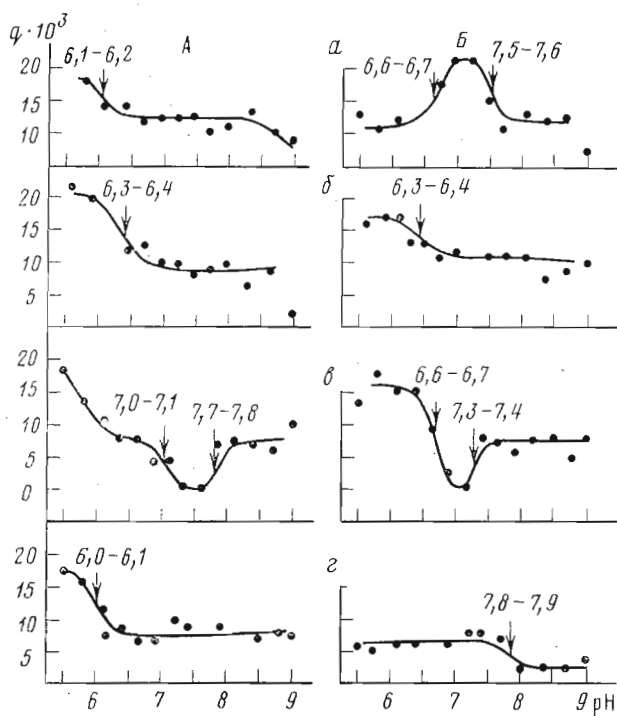


Рис. 3. Зависимость квантового выхода тирозиновой флуоресценции от рН водно-солевых (А) и водных (Б) растворов intactного (а), ацетилированного (б), иодированного (в) и иодированного с предварительным ацетилированием (г) бычьего тиреоглобулина

отмеченные изменения квантового выхода не могут быть следствием изменения эффективности переноса, а должны отвечать локальным перестройкам в микроокружении тирозиновых остатков, сопровождающимся изменением эффективности тушения соседними группировками.

Таким образом, на основании полученных данных можно предположить, что ацетилирование и иодирование тиреоглобулина, а также наличие электролита в растворе влекут за собой локальные перестройки молекулы белка, следствием которых является изменение его функциональной активности [3]. Эти перестройки происходят, вероятно, в результате перераспределения зарядов в областях расположения ароматических аминокислот. Можно предположить, что этот процесс лежит в основе регуляции гормонообразования в тиреоглобулине.

Экспериментальная часть

Гомогенный при аналитическом ультрацентрифугировании тиреоглобулин получали из щитовидной железы быка фракционированием солевых экстрактов тиреоидной ткани на колошке с сефадексом G-200 [10, 11]. Концентрацию тиреоглобулина определяли спектрофотометрически ($A_{1\text{см}}^{1\%} = 10,0$). Ацетилирование тиреоглобулина проводили в 0,1 М фосфатном буфере (рН 9,0) добавлением к раствору белка 1,5–2 моль 2-N-диацетиламиноциклогексен-2-она на 1 моль (Lys, Arg) [12]. Инкубацию осуществляли в течение 1 ч при 37° С. Затем для освобождения от непрореагировавшего диацетиламиноциклогексена и ацетиламиноциклогексена тиреоглобулин подвергали диализу против дистиллированной воды в течение 15–18 ч. Тиреоглобулин иодировали в 0,1 М фосфатном буфере при рН 9,0 и температуре 30° С [13]. К 1 мл 1% раствора интактного или ацетилированного тиреоглобулина при постоянном перемешивании добавляли иодирующий реагент (0,48 М KI+0,04 M I₂) из расчета 200 моль I₂ на 1 моль белка и инкубировали 30 мин при 30° С. Удаление непрореагировавшего с белком иода и обессоливание проводили диализом против дистиллированной воды в течение 15–18 ч. Ионную силу до 0,15 М доводили добавлением в водные растворы белка соответствующего количества NaCl малыми порциями при интенсивном перемешивании (концентрационное равновесие устанавливалось в течение 1–2 с). Конечный раствор содержал 0,9% NaCl. Изменение рН осуществляли с помощью 0,01–0,5 н. NaOH и HCl (х. ч.). Изменение ионной силы растворов белка при этом не превышало 0,002. Величину рН растворов измеряли на рН-метре «рН-121» с точностью ±0,03 ед. рН.

Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре EPS-3T (Hitachi, Япония); при измерении поглощения растворов белка светорассеяние [14] учитывали при помощи попограммы [15]. Спектры флуоресценции измеряли на флуориметре модели 203 (Hitachi, Япония) с автоматической регистрацией на самопишущем потенциометре КСП-4 (ширина щели 0,1–0,2 мм). Все спектры исправляли на спектральную чувствительность регистрирующей системы [16]. Квантовый выход белка при возбуждении 296,7 нм рассчитывали относительно флуоресценции водного раствора триптофана [16], квантовый выход которого принимали равным 0,20 [7], с учетом вклада в поглощение иодтирозиновых и тироксिनных остатков (детали см. [1]). Среднеквадратичные ошибки при измерении квантового выхода (табл. 1 и 2) включают в себя все ошибки, связанные с измерением квантового выхода относительным способом (вычисление интеграла полосы, измерение оптической плотности, учет вклада светорассеяния). Изменение квантового выхода тирозиновой флуоресценции определяли согласно соотношению [17]:

$$\Delta = \left[\left(\frac{I_{370}}{I_{375}} \right)^{280} - \left(\frac{I_{310}}{I_{375}} \right)^{296,7} \right] \cdot I_{310}^{296,7},$$

где I_j^i — интенсивность флуоресценции при длине волны наблюдения j и длине волны возбуждения i , а значение выхода для интактного тиреоглобулина в водно-солевом растворе без учета вклада иодаминоокислот в поглощение при pH 6,5 принимали равным 0,004 [1]. При построении зависимостей квантового выхода от pH учитывали эффекты экранировки и реабсорбции и иодтирозинами и тироксинном [16].

Авторы признательны А. А. Налбандян (Институт биохимии АН УзССР, Ташкент) за помощь при получении тиреоглобулина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гуссаковский Е. Е., Бурштейн Э. А., Бабаев Т. А. Исследование тиреоглобулина методом анализа собственной флуоресценции.— *Биофизика*, 1981, т. 26, № 2, с. 204—210.
2. Туракулов Я. Х., Бабаев Т. А., Саатов Т. Иодпротенины щитовидной железы. Ташкент: ФАН, 1974, с. 6—42.
3. Бабаев Т. А., Ахмеджанов И. Г., Гуссаковский Е. Е., Ермолаев К. М. Влияние ацетилирования на подирование тиреоглобулина и образование тироксина.— *Хим. природн. соед.*, 1978, № 4, с. 485—488.
4. Бурштейн Э. А. Собственная люминесценция белка. Природа и применение. Итоги науки и техники. Биофизика, т. 7. М.: ВИНТИ, 1977, с. 11—39, 143—158.
5. Хиппель П., Шлейх Т. Структура и стабильность биологических макромолекул. М.: Мир, 1973, с. 320—480.
6. Wenzel K. W., Rotzsch W. Die Iodierung von Thyreoglobulin.— *Acta biol. med. Germa.*, 1967, v. 19, № 6, p. 803—809.
7. Бурштейн Э. А. Люминесценция белковых хромофоров. Модельные исследования. Итоги науки и техники. Биофизика, т. 6. М.: ВИНТИ, 1976, с. 114—142.
8. Cowgill R. W. The application on natural fluorescence of proteins at the investigation of structure and conformational changes.— *Fluorescence News*, 1969, v. 4, № 5, p. 1—3.
9. Бернхард С. Структура и функция ферментов. М.: Мир, 1971, с. 173—174.
10. Mouriz Y., Stanbury Y. B. Purification of human 19S thyroglobulin by gel filtration.— *Can. J. Biochem.*, 1968, v. 46, № 1, p. 51—54.
11. Бабаев Т. А., Аванесова А. А., Гуссаковский Е. Е., Усманов Т. Внутримолекулярные связи тиреоглобулина.— *Биохимия*, 1972, т. 37, № 6, с. 1306—1309.
12. Ермолаев К. М., Попова Н. А., Точилкин А. И. Ацетилирование α , ω -диаминокислот 2-N-диацетиламиноциклогексен-2-оном.— *Ж. Всес. хим. о-ва*, 1969, т. 14, № 3, с. 357—358.
13. Edelhoch H. The properties of thyroglobulin. VIII. The iodination of thyroglobulin.— *J. Biol. Chem.*, 1962, v. 237, № 9, p. 2778—2787.
14. Winder A. F., Gent W. L. G. Correction of light-scattering errors in spectrophotometric protein determination.— *Biopolymers*, 1971, v. 10, № 7, p. 1243—1251.
15. Гуссаковский Е. Е., Абрамов А. А. Номограмма для быстрого определения вклада рассеянного света в спектр поглощения растворов биополимеров.— *Хим. природн. соед.*, 1979, № 5, с. 740—741.
16. Паркер С. Фотолюминесценция растворов. М.: Мир, 1972, с. 246—253.
17. Туроверов К. К., Щелчков Б. В. Исследование тепловой денатурации белков с помощью двухволнового метода регистрации измененный спектра их ультрафиолетовой флуоресценции.— *Биофизика*, 1970, т. 15, № 6, с. 965—972.

Поступила в редакцию
13.X.1980

STUDY OF THYROGLOBULIN BY INTRINSIC FLUORESCENCE TECHNIQUE. II. IODINATED AND ACETYLATED THYROGLOBULIN

AKHMEDZHANOV I. G., GUSSAKOVSKY E. E., BABAIEV T. A.

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Uzbek SSR, Tashkent

Tyrosine and tryptophan fluorescence was studied for aqueous and aqueous-salt solutions of intact bovine thyroglobulin, as well as acetylated with diacetylaminocyclohexenone, iodinated, or acetylated and then iodinated protein. The absence of substantial spectral shifts as compared to the changes in tryptophan and tyrosine fluorescence quantum yields suggests local conformational changes evoked by protein modifications as a result of a charge redistribution in microenvironment of tryptophan, tyrosine and diiodotyrosine residues. These rearrangements might be implicated in the regulation of the thyroglobulin functional activity.