

УДК 577.16/17

БИОХИМИЯ

Л. В. НАГОРНАЯ, Ф. Ю. РЫШКА, Н. В. САНЖАК,
член-корреспондент АН СССР А. С. ХОХЛОВ

ВЛИЯНИЕ МОДИФИЦИРОВАНИЯ ОСТАТКОВ ТИРОЗИНА И ТРИПТОФАНА НА НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА ЛАКТОСОМАТОТРОПНОГО И ЛАКТОГЕННОГО ГОРМОНОВ

Лактосоматотропный гормон (ЛСТГ) чрезвычайно близок по своим физико-химическим свойствам к лактогенному гормону (ЛТГ), но в отличие от последнего обладает значительной ростовой активностью (¹). Представляло интерес сравнить значение отдельных аминокислотных остатков этих гормонов для проявления их биологических функций. В настоящем сообщении представлены результаты химического модифицирования остатков тирозина и триптофана ЛСТГ и ЛТГ.

Таблица 1

Модифицирование ЛСТГ и ЛТГ тетранитрометаном
(число нитрующихся аминокислотных остатков)

Модифицированные и модифицирующиеся аминокислотные остатки	ТНМ, моли на 1 моль белка							
	0	1	4	64	0	1	4	64
	ЛСТГ				ЛТГ			
3-Нитротирозин	—	0,8	1,7	7	—	0,7	1,0	6
3,5-Динитротирозин	—	—	—	0,3	—	—	—	0,3
Тирозин	8	7	6	—	8	7	7	1
1/2-Цистин	6	6	6	1	6	6	6	5
Цистеиновая кислота	—	—	—	5	—	—	—	1
Триптофан	2	2	2	0,8	2	2	2	1,5
Биологическая активность								
Лактогенная активность, ед/мг	9	9	Не опр.	3	18	16		3
Ростовая активность, ед/мг	1,5	1,5	Не опр.	0,5	0	0	0	0

ЛСТГ и ЛТГ выделяли из гипофизов быка и очищали, как описано ранее (^{1, 2}). Модифицирование остатков тирозина гормонов проводили в 0,05 M трис-HCl-буфере, pH 8, в течение 1 и 2 час. (³), используя различный молярный избыток тетранитрометана (ТНМ). 3-Нитротирозильные остатки восстанавливали до 3-аминотирозильных 10-кратным молярным избытком гидросульфита натрия (⁴). Модификацию остатков триптофана осуществляли 2-окси-5-нитробензилбромидом в 9 N растворе уксусной кислоты (⁵). Во всех случаях после завершения реакций модифицированные белки отделяли от низкомолекулярных продуктов реакции гельфильтрацией на сефадексе Г-25. В случае нитрованных препаратов агрегированную часть вещества удаляли гелевой хроматографией через сефадекс Г-75, уравновешенный 0,05 M раствором бикарбоната аммония (¹). Триптический гидролиз препаратов проводили при pH 8 с соотношением трипсин — белок 1 : 30. Пептидные карты получали в тонком слое целлюлозы МН-300 на пластинках 20×20 см. Пептид, содержащий 3-нитротирозин, обнаруживали по желтому окрашиванию, появляющемуся после выдерживания пластины в парах аммиака. Число остатков тирозина и цистеиновой кислоты

определяли методом аминокислотного анализа, триптофан определяли спектрофотометрически после окисления до глиоксиловой кислоты ⁽⁶⁾. Число остатков 3-нитротирозина рассчитывали из данных спектрофотометрии и аминокислотного анализа ⁽⁴⁾. Ростовую активность определяли по тибиа-тесту ⁽⁷⁾ и лактогенную — по увеличению зоны пролиферации зуба голубей при локальном введении препарата ⁽⁸⁾.

Как видно из табл. 1, при использовании 64-кратного молярного избытка ТНМ нитруются все 8 остатков тирозина ЛСТГ и 7 остатков тирозина ЛТГ. Более того, нитрование большим избытком ТНМ сопровождается частичным окислением цистина до цистеиновой кислоты и модифицированием остатков триптофана, причем, как видно из табл. 2, эти реакции очень значительны в случае ЛСТГ.

Рис. 1. Пептидная карта триптического гидролизата нитрованного ЛСТГ. Хроматография в системе: *n*-бутанол — пиридин — уксусная кислота — вода (15:12:3:12); электрофорез в 0,1 М пиридин-ацетатном буфере рН 6,5. Проявлена 0,5% раствором пингидрина в этаноле. *м,м* — место нанесения; *ж* — окрашивается в желтый цвет после выдерживания пластинки в парах аммиака

ЛСТГ и ЛТГ свидетельствуют о значительных структурных различиях этих гормонов. Так, легкость модифицирования остатков триптофана в ЛСТГ указывает на различие в химическом окружении, по крайней мере одного из них, в ЛСТГ и ЛТГ. С другой стороны, как видно из табл. 2, модифицирование 2-окси-5-нитробензилбромидом изменяет оба остатка триптофана в ЛСТГ и ЛТГ.

Таблица 2

Влияние модифицирования 2-окси-5-нитробензилбромидом на биологические свойства ЛСТГ и ЛТГ

	Число остатков триптофана		Лактогенная активность	Ростовая активность, ед/мг
	не модифицированные	модифицированные		
ЛСТГ	2	—	9	1,5
Модифицированный ЛСТГ	0	2	0	0,75
ЛТГ	2	—	18	—
Модифицированный ЛТГ	0	2	0	—

Биологическое тестирование показывает, что лактогенная активность обоих гормонов полностью исчезает, однако ростовая активность ЛСТГ в значительной мере сохраняется. Приведенные данные указывают на существование двух участков в молекуле ЛСТГ, ответственных за разные биологические функции гормона.

Для избирательного модифицирования остатков тирозина мы использовали ограниченное количество тетранитрометана. Как видно из табл. 1, при стехиометрическом соотношении белка (считая на один остаток тирозина в молекуле) и ТНМ происходит нитрование одного остатка тирозина в молекулах ЛСТГ и ЛТГ. Такой же избирательности нитрования можно до-

стигнуть, проводя реакцию с 4-кратным молярным избытком ТНМ при pH 7,2. Как показывает пептидная карта нитро-ЛСТГ (рис. 1), нитрование в указанных условиях сопровождается ослаблением пятна М и появлением нового пятна (заштриховано на рис. 1), что свидетельствует об избирательном модифицировании лишь одного остатка тирозина в молекуле ЛСТГ. Аналогичный нитропептид был обнаружен на пептидной карте моонитротирозильного производного ЛТГ. Этот нитропептид был выделен в чистом виде из триптического гидролизата моонитротирозильного производного ЛСТГ. Структура его была определена с помощью масс-спектрометрии (³). Он представляет собой пентапептид следующего строения: 3-NO₂ — тир — ала — глн — гли — лиз и совпадает с участком 44—48 первичной структуры ЛТГ барана (¹⁰). Определение биологической активности моонитротирозильных и моноаминотирозильных производных ЛСТГ и ЛТГ показало, что модифицирование остатка тирозина в положении 44 существенно не изменяет биологической активности гормонов. Однако иммунологическими методами были обнаружены резкие различия в поведении моноаминотирозильных производных ЛСТГ и ЛТГ (¹¹). При введении NH₂-группы в остаток тирозина в молекуле ЛСТГ создаются значительные препятствия для реакции с антителами; аналогичная модификация ЛТГ не влияет на его иммунологические свойства.

Таким образом, проведенные исследования по модифицированию остатков тирозина и триптофана ЛСТГ и ЛТГ позволяет сделать вывод о значительных структурных различиях этих гормонов.

Авторы выражают глубокую благодарность А. А. Кирюшкину за снятие и трактовку масс-спектра нитропептида, а также С. А. Ланге и Г. Н. Мельниковой за техническую помощь в работе.

Институт химии природных соединений
Академии наук СССР
Москва

Поступило
17 V 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Ф. Ю. Рышка, Л. В. Нагорная и др., ДАН, 197, 219 (1971). ² R. D. Cole, C. H. Li, J. Biol. Chem., 213, 197 (1955). ³ M. Sokolovsky, J. F. Riordan, B. L. Valee, Biochemistry, 5, 3582 (1966). ⁴ M. Sokolovsky, J. F. Riordan, B. L. Valee, Biochem. Biophys. Res. Commun., 27, 20 (1967). ⁵ H. R. Horton, D. E. Koshland, J. Am. Chem. Soc., 87, 1126 (1965). ⁶ J. Opieńska-Blauth, M. Chareziński, H. Berbeć, Anal. Biochem., 6, 69 (1963). ⁷ F. S. Greenspan, C. H. Li et al., Endocrinology, 45, 455 (1949). ⁸ C. E. Grossvenor, C. W. Turner, Endocrinology, 63, 530 (1958). ⁹ Ю. А. Овчинников, А. А. Кирюшкин и др., Биохимия, 32, 427 (1967). ¹⁰ C. H. Li, J. S. Dixon et al., Arch. Biochem. Biophys., 141, 705 (1970). ¹¹ Г. А. Зенкевич, В. А. Исаченков и др., Изв. АН СССР, сер. биол., № 6, 1285 (1971).