



УДК 577.112.856.088.2

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ДИСУЛЬФИДНЫХ СВЯЗЕЙ В МОЛЕКУЛЕ КИСЛОГО ГЛИКОПРОТЕИНА $\alpha 1$ И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ ВЛИЯНИЯ НА СПОСОБНОСТЬ БЕЛКА ВЗАИМОДЕЙСТВОВАТЬ С БРОМИСТЫМ ЭТИДИЕМ

© 2000 г. О. Е. Трубецкая[#], О. И. Резникова, Г. В. Афанасьева, К. Ю. Резников, М. В. Серебрякова*

Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Пущино, Московская обл.;

*Научный центр психического здоровья РАМН, г. Москва

Поступила в редакцию 09.07.99 г. Принята к печати 10.02.2000 г.

Кислый гликопротеин $\alpha 1$ (орозомукоид) выделен из сыворотки крови человека и мышцы с помощью фенольной депротенизации. Человеческий белок в отличие от мышиноного связывал флуоресцентный краситель бромистый этидий. Эта способность терялась после обработки белка β -меркаптоэтанолом, разрушающим дисульфидные связи. Идентифицированы дисульфидные связи между Cys²³, Cys¹⁶⁵ остатками человеческого и Cys⁹¹, Cys¹⁸⁴ мышиноного орозомукоидов.

Ключевые слова: кислый гликопротеин $\alpha 1$; орозомукоид; белки острой фазы.

ВВЕДЕНИЕ

Кислый гликопротеин $\alpha 1$ (орозомукоид, AGP) – сывороточный белок острой фазы, концентрация которого при различных заболеваниях увеличивается в 2–10 раз у человека [1] и в 10–100 раз у крысы [2] и мыши [3, 4]. Как и другие белки острой фазы, AGP, в основном, секретируется гепатоцитами [5], а также лимфоцитами в процессе их активации [6, 7]. Несмотря на интенсивные исследования, функция кислого гликопротеина $\alpha 1$ точно до сих пор не установлена. Считается, что он участвует в регуляции иммунного ответа организма. Недавно было обнаружено, что орозомукоид и $\alpha 1$ -антитрипсин человека и быка ингибируют апоптоз (программируемую гибель клеток), индуцируемый фактором некроза опухоли [8]. При заражении мышей малярийным плазмодием нами было отмечено параллельное увеличение концентрации орозомукоида и свободно циркулирующей сывороточной ДНК с размерами, кратными длине нуклеосомного повтора (180–200 пар оснований) [3], образующейся, по-видимому, в результате апоптоза. Следует отметить, что биосинтез орозомукоида контролируется стероидными гормонами [9], которые также являются мощными стимуляторами программируемой гибели некоторых типов клеток [10].

В связи с бурно развивающимися в последнее время исследованиями программируемой клеточ-

ной гибели и ее роли в поддержании физиологического гомеостаза, детальное исследование физико-химических свойств белков, связанных в той или иной степени с этим процессом, приобретает особую актуальность. Настоящая работа является продолжением наших исследований структуры и физико-химических свойств орозомукоидов человека и мыши [3, 4].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Молекулярная масса орозомукоида 43 кДа. Это самый обогащенный углеводами (~45% по массе) гликопротеин сыворотки крови. Характерная особенность этого белка – микрогетерогенность, обусловленная как различной посттрансляционной модификацией полипептидной цепи [5], так и генетическим полиморфизмом. У человека и мыши обнаружены кластеры нескольких тесно сцепленных генов, кодирующих изоформы AGP-1 и AGP-2, различающиеся аминокислотными остатками в 21 положении полипептидной цепи у человека [11] и в 31 – у мыши [12]. Для изоформы AGP-1 мыши описаны два аллеля, различающиеся одним аминокислотным остатком (Arg или Gln) в положении 157. Нами было идентифицировано два аллеля изоформы AGP-1 человека, содержащих в положении 67 триптофан или фенилаланин [13]. Имеются данные о том, что в разных человеческих популяциях существует более двадцати электрофоретически различимых форм как AGP-1-, так и AGP-2-белков [14].

[#] Автор для переписки (тел.: (27) 73-08-59; e-mail: trub@fibkh.serpukhov.su).

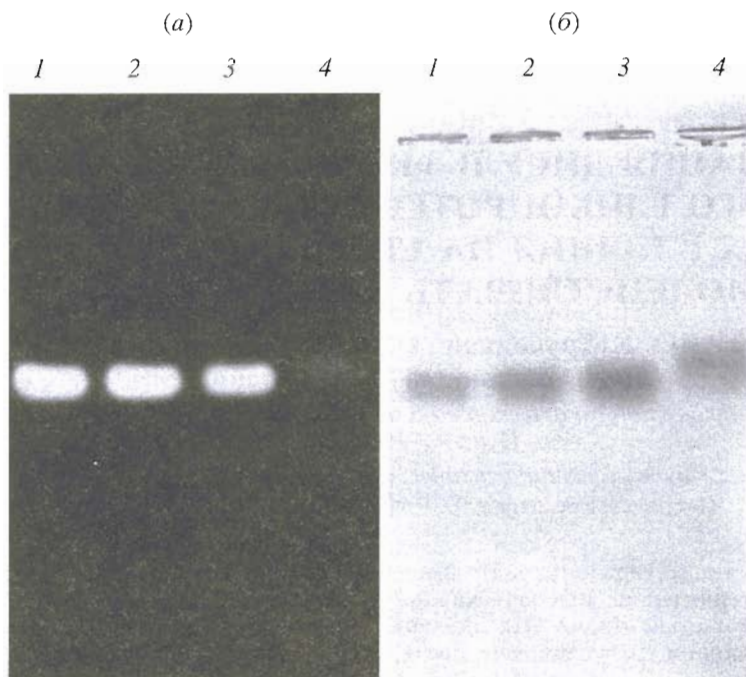


Рис. 1. Электрофорез в 1% агарозе с окрашиванием геля бромистым этидием (а) или кумасси R-250 (б) препаратов орозомукоида человека (2,5 мкг), отличающихся условиями подготовки образца: 1 – белок в ТЕ-буфере; 2 – белок в ТЕ-буфере с добавкой 1% β-меркаптоэтанола непосредственно перед электрофорезом; 3 – белок в ТЕ-буфере, денатурированный в течение 5 мин при 100°C; 4 – белок в ТЕ-буфере, денатурированный и восстановленный в присутствии 1% β-меркаптоэтанола в течение 5 мин при 100°C.

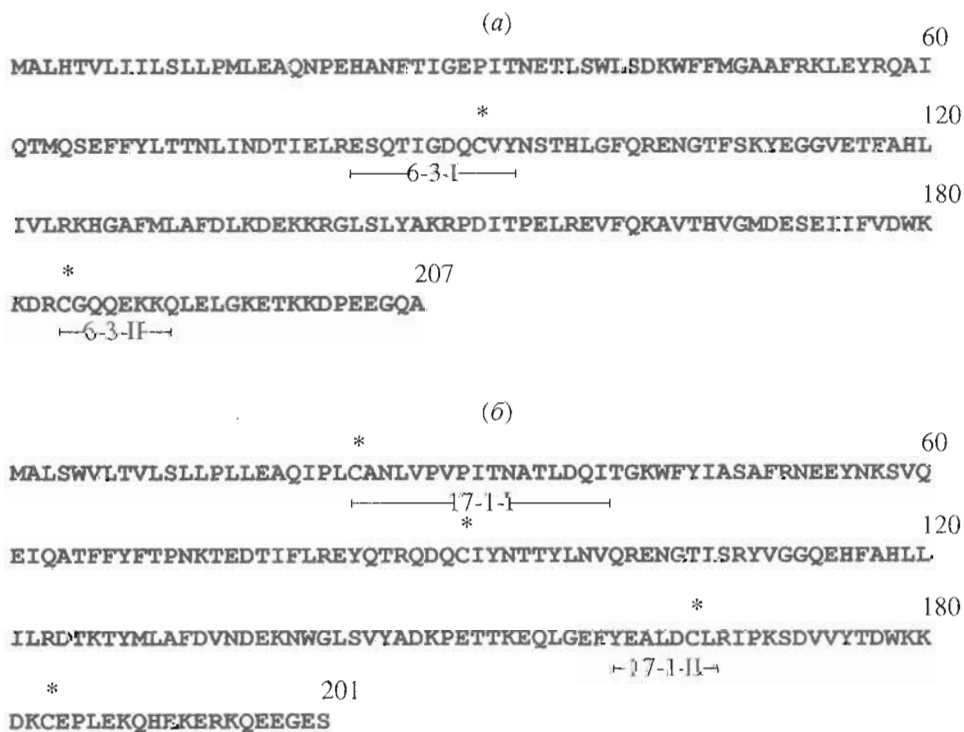


Рис. 2. Аминокислотная последовательность АСР-1-изоформ орозомукоидов мыши (а) и человека (б), выведенная на основании нуклеотидной последовательности соответствующих кДНК [11, 12]. Звездочками (*) отмечены остатки цистеинов. Аминокислотные последовательности цистинсодержащих фрагментов подчеркнуты.

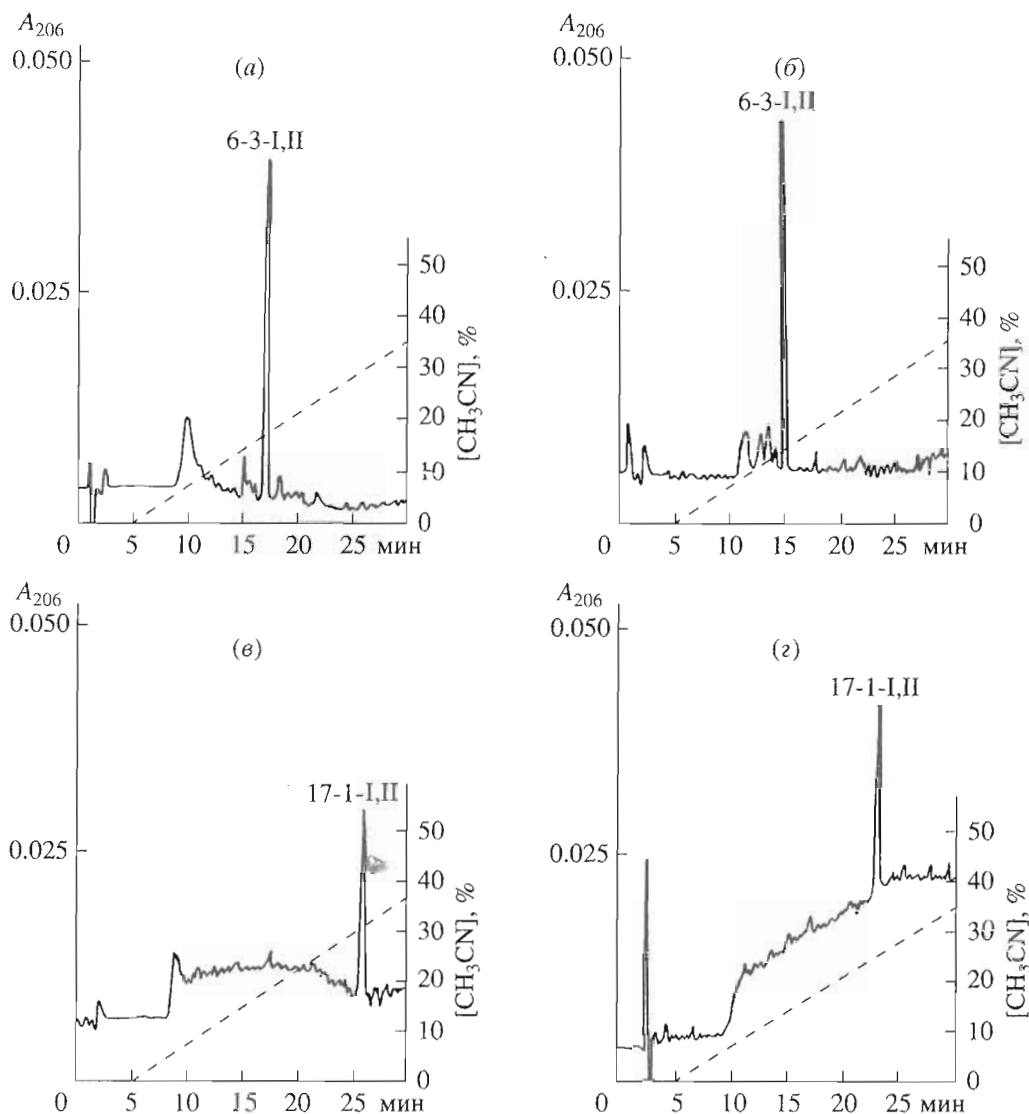


Рис. 3. ВЭЖХ на колонке (0.46 × 15 см) с носителем Ultrasphere ODS в градиенте концентрации ацетонитрила пептидных фракций 6-3-I,II и 17-1-I,II в 0.1% TFA, pH 2.0 (а, в) и 10 мМ CH_3COONH_4 , pH 5.7 (б, г).

В предыдущих работах [3, 13] мы показали, что выделенный препарат человеческого орозомукоида в отличие от мышинового интенсивно окрашивался специфическим для нуклеиновых кислот флуоресцентным красителем бромистым этидием, причем это его свойство сохранялось при отщеплении от углеводной части нейрамино-вых кислот, также белок не содержал прочно связанной ДНК или РНК.

При обработке β-меркаптоэтанолом, разрушающим в слабо щелочной среде дисульфидные связи, способность человеческого орозомукоида связывать бромистый этидий практически полностью исчезала, при этом у белка с восстановленными дисульфидными связями уменьшалась электрофоретическая подвижность (рис. 1, 4). Таким образом, различия в способности связывать бро-

мистый этидий высокомолекулярными мышинным и человеческим орозомукоидами обусловлены особенностями их пространственной организации, а именно, наличием дисульфидных связей. Действительно, AGP-1- и AGP-2-изоформы мышцы содержат только по два остатка цистеина в положениях 91 и 184 [12], в то время как AGP-1-изоформа человека содержит четыре, а AGP-2- – пять остатков цистеина [11], два из которых консервативны и находятся в положениях 90 и 183 (рис. 2). По-видимому, наличие особой или дополнительной дисульфидной связи в молекуле человеческого орозомукоида и определяет его уникальную способность связывать бромистый этидий. Однако до настоящего времени ни одна из дисульфидных связей в молекулах орозомукоидов мышцы и человека идентифицированы не были.

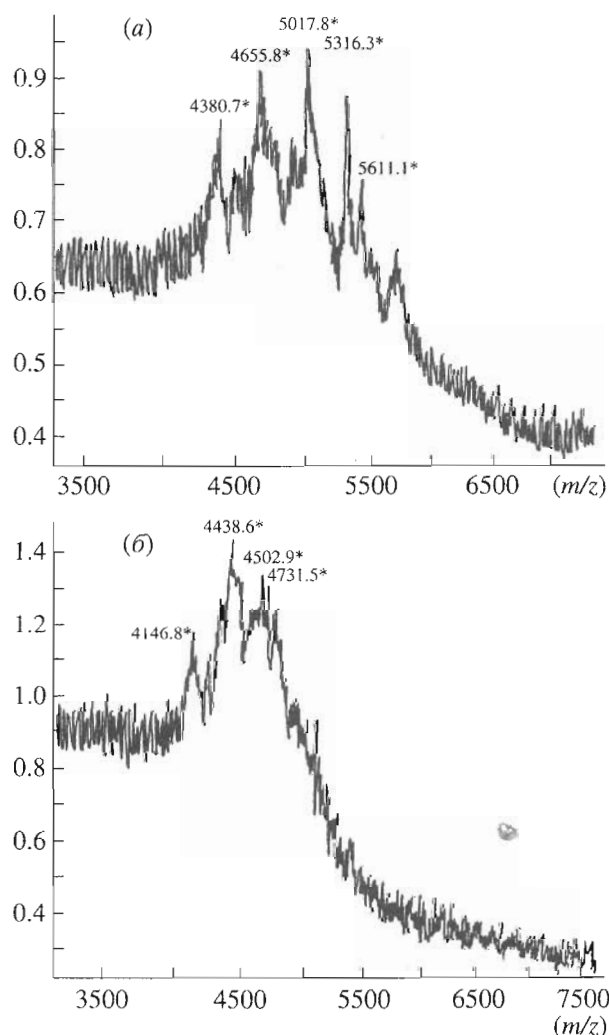


Рис. 4. Масс-спектры пептидной фракции 17-1-I,II до (а) и после (б) обработки β-меркаптоэтанолом.

Для локализации дисульфидных связей нами дополнительно очищены и проанализированы некоторые пептидные фракции, полученные ранее при расщеплении невосстановленных препаратов орозомукоидов мыши и человека трипсином [3, 13].

Пептидная фракция 6-3-I,II триптического гидролизата орозомукоида мыши выходила одним

симметричным пиком при ВЭЖХ на колонке с обращенной фазой Ultrasphere ODS в двух различных буферных системах в условиях, исключающих перегруппировку дисульфидных связей (рис. 3а, б). В таблице приведены аминокислотные остатки, идентифицированные на каждой стадии деградации этого пептида. При сравнении полученных данных с первичной структурой, выведенной из нуклеотидной последовательности АРР-1 орозомукоида мыши (рис. 2а), выявлено, что пептид 6-3-I,II является цистинсодержащим фрагментом, включающим участки белка 6-3-I (83–93 а. о.) и 6-3-II (184–190 а. о.), содержащие соответственно остатки цистеинов 91 и 184. Эти данные говорят в пользу существования дисульфидной связи Cys⁹¹-Cys¹⁸⁴ в молекуле АРР-1-изоформы орозомукоида мыши.

При определении структуры пептида 17-1-I,II (в работе [13] эта фракция обозначена как 17-1) триптического гидролизата орозомукоида человека, выделенного и очищенного с помощью ВЭЖХ аналогично цистинсодержащему фрагменту 6-3-I,II (рис. 3в, г), было идентифицировано по две аминокислоты в эквимольных количествах на третьей, четвертой и шестой стадиях деградации, а выход аланина на втором шаге деградации вдвое превышал выход глутаминовой кислоты на первом, аминокислота на 11 шаге идентифицирована не была. Полученные данные полностью соответствуют структуре цистинсодержащего пептида, состоящего из фрагментов белка 17-1-I (23–39 а. о.) и 17-1-II (161–166 а. о.), включающих соответственно остатки цистеинов 23 и 165, соединенные, очевидно, дисульфидной связью. Трудности идентификации остатка аспарагина на 11 шаге деградации, по-видимому, связаны с наличием олигосахаридной цепи, соединенной N-гликозидной связью с боковой цепью остатка Asn³³, находящегося в канонической последовательности Asn-X-Thr/Ser и представляющего наиболее вероятный сайт гликозилирования.

Дополнительное подтверждение существования дисульфидной связи между остатками цистеинов 23 и 165 в АРР-1-изоформе человека было получено при масс-спектрометрическом анализе фракции 17-1-I,II до и после ее восстановления β-меркаптоэтанолом (рис. 4). Данный 23-член-

Аминокислотная последовательность цистинсодержащих пептидов орозомукоидов мыши и человека

Фракция	Стадии деградации																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
6-3-I,II	E	S	Q	T	I	G	D	Q	X	V	Y						
17-1-I,II	X	A	N	L	V	P	V	P	I	T	*	A	T	L	D	Q	I
	E	A	L	D	X	L											

X – аминокислота не идентифицирована, по структуре – остаток цистеина;

* – аминокислота не идентифицирована, по структуре – гликозилированный остаток глутамина.

ный цистинсодержащий пептид давал несколько молекулярных ионов с $m/z \sim 5000$. Более высокое значение по сравнению с расчетным $[M + H]^+$ пептида обусловлено наличием в его составе гликозилированного Asn³³ (рис. 2б), а гетерогенность по массе обусловлена, вероятно, частичным дегликозилированием пептида в процессе проведения эксперимента. После восстановления β -меркаптоэтанолом наблюдали уменьшение $[M + H]^+$ исследуемой фракции примерно на 660, что соответствует $[M + H]^+$ отщепившегося после восстановления дисульфидной связи шестичленного пептида 17-1-II, содержащего остаток цистеина 165. В условиях проведения эксперимента короткий шестичленный пептид невозможно было достоверно идентифицировать из-за появления большого числа обломков, обусловленного частичным разрушением углеводной части анализируемой материи.

Таким образом, анализ нескольких пептидных фракций, образовавшихся после расщепления невосстановленных препаратов орозомукоидов мыши и человека трипсином, позволил идентифицировать единственную дисульфидную связь в молекуле AGP-1-изоформы мыши между 91 и 184 остатками цистеинов, а также одну из двух возможных дисульфидных связей в молекуле AGP-1-изоформы человека между 23 и 165 остатками цистеинов. К сожалению, пары пептидов, образующих вторую S-S-связь между остатками цистеинов в положениях 90 и 183 AGP-1 человека, нами выделено не было. Однако, принимая во внимание консервативное положение этих остатков в орозомукоидах различных видов и наличие дисульфидной связи между ними в молекуле мышинного орозомукоида, можно утверждать, что в AGP-1-изоформе человека эта дисульфидная связь также присутствует. Наиболее вероятно, что способность человеческого орозомукоида связывать флуоресцентный краситель бромистый этидий обусловлена присутствием в молекуле человеческого белка по сравнению с мышинным дополнительной дисульфидной связью между 23 и 165 остатками цистеинов. Способность человеческого орозомукоида связывать бромистый этидий можно использовать для оценки пространственной организации этого белка в процессе функционирования или фолдинга.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали Трис, акриламид, N,N,N',N' -тетраметилэтилендиамин, персульфат аммония, кумасси R-250 (Reanal, Венгрия), агарозу (Pharmacia, Швеция), ДНКазу I, бромистый этидий, β -меркаптоэтанол (Sigma, США), остальные реактивы отечественного производства марки "ос. ч.", фенол и этанол дважды перегнанные. Сыворотку крови хранили при -20°C .

Кислый гликопротеин $\alpha 1$ выделяли фенольной и хлороформенной депротеинизацией. Сыворотку крови разводили вдвое ТЕ-буфером (10 мМ Трис-HCl, pH 7.5, 1 мМ EDTA), добавляли равный объем фенола, встряхивали 5 мин при 20°C , центрифугировали 15 мин при 3500 об/мин для расслоения фаз, водную фазу собирали, еще раз обрабатывали смесью фенол-хлороформ (1 : 1) и хлороформом. К водной фазе добавляли 1/10 объема 3 М ацетата натрия, pH 5.2, и 3 объема этанола. Раствор оставляли на одни сутки при -20°C , осадок собирали центрифугированием при 10000 об/мин в течение 30 мин, промывали 70% этанолом, сушили и растворяли в необходимом объеме ТЕ-буфера. Препараты белков обрабатывали ДНКазой I по методу [15] и проводили повторную обработку фенолом и хлороформом.

Чистоту выделенных препаратов белков проверяли электрофорезом в 12.5% ПААГ по методу [16]. Препараты орозомукоида мыши и человека содержали не более 2% белковых примесей.

Электрофорез белков в 1% агарозе в 89 мМ Трис-боратном буфере, pH 8.3, проводили по методу [15] с окрашиванием геля бромистым этидием и кумасси R-250.

Концентрацию белка определяли по методу Лоури [17].

ВЭЖХ пептидных фракций 6-3-I,II и 17-1-I,II осуществляли на колонке (0.46×15 см) с обращенной фазой Ultrasphere ODS (Altech, США). Обрезец наносили на колонку в виде раствора в стартовом буфере (0.1% TFA, pH 2.0, или 10 мМ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, pH 5.7). Элюцию пептидов осуществляли в градиенте концентрации ацетонитрила в 0.1% TFA, pH 2.0, или 10 мМ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, pH 5.7.

Автоматическую деградацию цистинсодержащих пептидов по методу Эдмана осуществляли при помощи белкового секвенатора (Model 477 A, Applied-Biosystems, США) с последующей идентификацией фенилтиогидантоиновых производных аминокислот на анализаторе (Model 120 A, Applied-Biosystems, США).

Восстановление дисульфидных связей в белке проводили в ТЕ-буфере, а во фракции 17-1-I,II в 0.1 М NH_4HCO_3 , pH 8.3, в присутствии 1% β -меркаптоэтанол в течение 5 мин при кипячении.

Масс-спектрометрический анализ фракции 17-1-I,II до и после восстановления β -меркаптоэтанолом проводили на приборе MALDI-MS Vision 2000 (Thermo BioAnalysis, США) в линейном режиме с использованием в качестве матрицы раствора 2% 2,5-дигидроксibenзойной кислоты, 20% ацетонитрила и 0.1% TFA.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность В.Е. Заграничному (ФИБХ РАН) и В.Н. Афанасьеву (ИБК

РАН) за ценные замечания в ходе выполнения и обсуждения работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Heinrich P.C., Castel J.V., Andus T. // *Biochem. J.* 1990. V. 265. P. 621–636.
2. Kremer J.V.H., Wilting J., Janssen L.H.M. // *Pharm. Revs.* 1988. V. 40. P. 1–47.
3. Трубецкая О.Е., Тимеева Г.Р., Афанасьева Г.В., Резников К.Ю., Садовников В.Б., Селюченко О.А., Липкин В.М. // *Биоорган. химия.* 1991. Т. 17. С. 42–46.
4. Трубецкая О.Е., Белогрудов Г.И., Данилов А.В., Тимеева Г.Р., Афанасьева Г.В., Муранова Т.А., Липкин В.М. // *Биоорган. химия.* 1991. Т. 17. С. 47–52.
5. Schmid K. *The Plasma Proteins.* N. Y.: Acad. Press, 1975. V. 1. P. 183–228.
6. Gahmberg C.G., Anderson L.C. // *J. Exp. Med.* 1978. V. 148. P. 507–521.
7. Stefanini G.F., Mazzetti M., Piccinini G.C., Capelli S., Baraldini M., Gasbarrini G. // *Biochem. Int.* 1989. V. 19. P. 397–403.
8. Molle W.V., Libert C., Fiers W., Brouckaert P. // *The Journal of Immunology.* 1997. V. 159. P. 3555–3564.
9. Bauman H., Maquat L.E. // *Molecular and Cellular Biology.* 1986. V. 6. P. 2551–2561.
10. Robertson N.M., Zangrilli J., Fernandes-Alnemry T., Friesenn P.D., Litwack G., Alnemry E.S. // *Cancer Res.* 1997. V. 57. P. 43–47.
11. Dente L., Pizza M.G., Metspalu A., Cortese R. // *EMBO J.* 1987. V. 6. P. 2289–2296.
12. Lee S.-C., Chang C.-J., Lee Y.-M., Lei H.-Y., Lai M.-Y., Chen D.-S. // *DNA.* 1989. V. 8. P. 245–251.
13. Трубецкая О.Е., Муранова Т.А., Резникова О.И., Афанасьева Г.В., Резников К.Ю. // *Биоорган. химия.* 1994. Т. 20. С. 1297–1309.
14. Yuasa I., Umetsu K., Suenaga K., Iha M., Hirata H., Ikebuchi J. // *Hum. Hered.* 1990. V. 40. P. 267–271.
15. Манниатис Т., Фрич Э., Самбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. С. 479.
16. Laemmli U.K. // *Nature.* 1979. V. 227. P. 680–684.
17. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. P. 265–275.

Localization of Disulfide Bonds in α 1-Acid Glycoprotein and Their Effect on the Ability of the Protein to Interact with Ethidium Bromide

O. E. Trubetskaya^{##}, O. I. Reznikova*, G. V. Afanas'eva*,
K. Yu. Reznikov*, and M. V. Serebryakova^{**}

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Pushchino Branch,
Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

**Research Center of Mental Health, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

α 1-Acid glycoprotein (orosomuroid) was purified from the human and murine blood sera using phenol deproteinization. As opposed to the murine protein, the human orosomuroid bound the fluorescent dye ethidium bromide but lost this ability after treatment with β -mercaptoethanol, which breaks disulfide bonds. Disulfide bonds between the Cys²³ and Cys¹⁶⁵ residues of the human orosomuroid and between the Cys⁹¹ and Cys¹⁸⁴ residues of the murine orosomuroid were identified.

Key words: α 1-acid glycoprotein, orosomuroid; acute phase blood serum proteins

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (27) 73-0859; e-mail: trub@fibkh.serpukhov.su.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 6. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.