

## 11S ГЛОБУЛИН ПОДСОЛНЕЧНИКА: КИНЕТИКА ОГРАНИЧЕННОГО И КООПЕРАТИВНОГО ПРОТЕОЛИЗА ПАПАИНОМ

Эллина МАКАЕВА, Наталия ЛАПТЕВА, Анжела РУДАКОВА, Сергей РУДАКОВ,  
Ирина КАХОВСКАЯ, Андрей ШУТОВ

Лаборатория биохимии растений

La hidroliza heliantininei cu papaină se observă proteoliza limitată a globulinei 11S, ce constă în desprinderea unui fragment vast de  $\alpha$ -lanțuri C-terminale, care cuprinde nu doar regiunea astructurată de la terminația proteinei, ci și domeniul helicoidal. Concomitent cu proteoliza limitată, decurge și cea cooperativă (nelimitată) a heliantininei, continuând după finisarea proteolizei limitate ca o reacție de ordinul pseudoîntâi. Astfel, spre deosebire de globulinele 11S din soia (Rudakova et al. 2008), proteoliza limitată nu poate avea un rol important în reglarea degradării totale a heliantininei. Cu privire la aceasta se discută deosebirile specifice dintre structura primară a heliantininei (gb|AAA33374), care este conservativă în regiunea  $\beta$ -strandurilor BCDE  $\alpha$ -lanțurilor tuturor globulinelor 11S cunoscute.

Quick limited proteolysis is observed when helianthinin, storage 11S globulin from sunflower seeds, is attacked by papain. The limited proteolysis consists of detachment of a wide C-terminal area of helianthinin  $\alpha$ -chain that covers disordered terminal region as well as an adjacent helix domain. Cooperative (unlimited) proteolysis of helianthinin occurs in parallel to limited proteolysis and further carries on as a pseudo-first order reaction after completion of the limited proteolysis. Thus, in contrast to 11S globulin from soybean seeds studied in similar respects (Rudakova et al. 2008) limited proteolysis of helianthinin cannot play any essential regulatory role in comprehensive degradation of helianthinin. Thereby, unusual specificity of the primary structure of helianthinin subunit gb|AAA33374, which is conserved in the region of  $\beta$ -strands BCDE in  $\alpha$ -chains of all other known 11S globulins, is discussed.

Быстрый ограниченный протеолиз происходит при действии протеиназ на запасные 11S и 7S глобулины *in vitro* и *in vivo* в процессе прорастания семян [1]. После завершения ограниченного протеолиза (первый этап) наблюдается глубокая деградация запасных глобулинов, происходящая по кооперативному механизму (второй этап). Кооперативный протеолиз является реакцией псевдопервого порядка [2], константа скорости которого зависит от конформационного состояния белкового субстрата [3]. Неизбежные изменения нативной третичной структуры запасных глобулинов в ходе ограниченного протеолиза могут оказывать влияние на константу скорости кооперативного процесса, который либо ускоряется, либо даже инициируется ограниченным протеолизом. К настоящему времени лишь для единственной уникальной системы фермент-субстрат удалось установить нечувствительность нативного запасного глобулина к кооперативному протеолизу и его инициацию ограниченным протеолизом [4]. Во всех остальных случаях возможная роль ограниченного протеолиза в регуляции глубокой деградации запасных глобулинов по кооперативному механизму не показана. Проблема заключается в сложности анализа кинетики протеолиза на первом этапе, когда возможный кооперативный протеолиз происходит на фоне нескольких последовательных реакций ограниченного протеолиза.

Как правило, ограниченный протеолиз запасных глобулинов заключается в укорачивании специфических бесструктурных участков полипептидных цепей [5] и поэтому может быть количественно оценен по убыли среднечисленной молекулярной массы продуктов реакции [6]. При гидролизе глицинина, запасного 11S глобулина семян сои, на первом этапе протеолиза весовое содержание белкового субстрата снижается исключительно в связи с убылью его молекулярной массы. Лишь затем, по достижении определенного уровня ограниченного протеолиза, начинается кооперативный процесс [6]. Таким образом, ограниченный протеолиз глицинина папаином является необходимым начальным этапом его глубокой деградации.

Показанная для глицинина регуляторная роль ограниченного протеолиза может быть общим правилом для всех других 11S глобулинов, структура которых достаточно консервативна. Для проверки этой гипотезы нами исследована кинетика ограниченного и кооперативного протеолиза папаином гелиантинина – запасного 11S глобулина семян подсолнечника.

### Материалы и методы

Гелиантинин получали из сухих семян *Helianthus annuus* L., как описано в [7], и гидролизовали папаином (Sigma) при 30°C. Реакционная смесь содержала 2 мг/мл субстрата и 4 мкг/мл фермента в стандартном буфере (0,037 М фосфатно-цитратный буфер, pH 8,0, доведенный NaCl до ионной силы 0,5, содержащий 0,02% NaN<sub>3</sub> и 10 мкМ 2-меркаптоэтанол). Реакцию останавливали добавлением либо трихлоруксусной кислоты (ТХУ), либо E-64 до конечной концентрации 10 мкМ. Остаточный белок в гидролизатах определяли по связыванию красителя [8] и исследовали SDS-PAGE (электро-

форез белка, диссоциированного додецилсульфатом натрия, 12,5%-ный гель, буферная система Лэммли [9]), и гель-фильтрацией на сефакриле S-300 в стандартном буфере (колонка 0,9 x 75 см). Электрофореграммы сканировали и анализировали с использованием программы Phoretix 1D Gel Analysis v.5.10.

Относительное снижение молекулярной массы  $M$  гелиантинина в ходе ограниченного протеолиза  $M^t/M^0$  (индексы  $t$  и  $0$  – текущее и нулевое время реакции соответственно) рассчитывали, как описано в [6], используя уравнение среднечисленной молекулярной массы олигомера

$$M_n = \sum_i n_i m_i (\sum_i n_i)^{-1}, \quad (1)$$

где  $n_i$  – абсолютное число мономеров  $i$  с массой  $m_i$  в составе олигомера и исходя из результатов анализа электрофореграмм, количественно оценивающих на каждом этапе протеолиза молекулярную массу  $m_i$  полипептида  $i$  и его относительное весовое содержание  $p_i$ . Поскольку  $n_i = p_i/m_i$ , уравнение (1) приобретает вид

$$M_n = \sum_i p_i (\sum_i p_i/m_i)^{-1},$$

где  $p_i$  выражены в долях единицы и, следовательно,  $\sum_i p_i = 1$ . Отсюда

$$M_n^t/M_n^0 = \sum_i p_i^t/m_i^t (\sum_i p_i^t/m_i^t)^{-1}. \quad (2)$$

Ограниченная область применения уравнения (2) для количественного описания первого этапа протеолиза обсуждается ниже.

### Результаты исследования и их обсуждение

В составе гетерогексамера гелиантинина были обнаружены три основных типа  $\alpha$ -цепей, образующих в сочетании с  $\beta$ -цепями четыре типа  $\alpha\beta$ -субъединиц [10]. При гидролизе папаином гексамерная структура гелиантинина сохраняется (данные гель-фильтрации гидролизатов), и все обнаруживаемые электрофорезом полипептиды (рис. 1) входят в состав высокомолекулярного продукта протеолиза (гелиантинина-П).

В ходе протеолиза происходят три наиболее существенных события: полное исчезновение  $\alpha$ -цепи  $\alpha 1$  и  $\beta$ -цепи  $\beta 2$  и появление полипептидных фрагментов, удерживаемых в структуре гелиантинина-П дисульфидной связью (фрагмент C1 и фрагменты C2/C3, обнаруживаемые только в присутствии ME) и нековалентными взаимодействиями (фрагмент N, обнаруживаемый как в присутствии, так и в отсутствие ME). Другие менее существенные события: незначительное укорачивание  $\alpha$ -цепи  $\alpha 2$  и, возможно,  $\beta$ -цепи  $\beta 3$ .

Ограниченный протеолиз 11S глобулинов определяется присутствием в их  $\alpha$ -цепях четырех типов бесструктурных участков [11] с повышенной чувствительностью к протеолитической атаке [5]; при этом структура  $\beta$ -цепей, как правило, нечувствительна к ограниченному протеолизу. Гелиантинин, по-видимому, не является исключением из этого правила [7]. Руководствуясь этим предположением, на основе проведенных нами анализов ограниченный протеолиз  $\alpha$ -цепи  $\alpha 1$  гелиантинина в первом приближении может быть описан следующим образом (рис. 2).

1. Ковалентно связанный фрагмент C1 образуется в результате отщеплений C-концевого участка 4 и N-концевого участка 1 и расщепления участка 3.

2. По мере развития протеолиза участок 2 фрагмента C1 расщепляется, что приводит к образованию коротких ковалентно связанных фрагментов C2/C3 и фрагмента N.

В соответствии с гипотетической схемой ограниченного протеолиза гелиантинина, все обнаруженные фрагменты принадлежат области  $\beta$ -барреля (стрэнды A'-J), что подразумевает удаление из  $\alpha$ -цепи  $\alpha 1$  спирального домена и стрэнда J'. Последние играют существенную роль в формировании третичной и четвертичной структур 11S глобулинов [11], и при сохранении гексамерной структуры гелиантинина их удаление кажется невероятным. Однако если предположить, что спиральный домен входит в состав фрагмента C1, образование последнего должно быть результатом не только отщепления участка 4, но и крайне маловероятного расщепления цепи  $\alpha 1$  в структурно-жесткой области, прилегающей к остатку Cys88, формирующему дисульфидную связь (рис. 2).

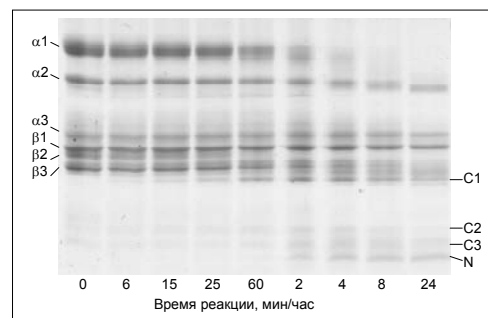
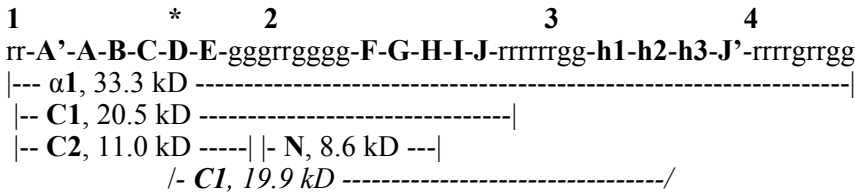


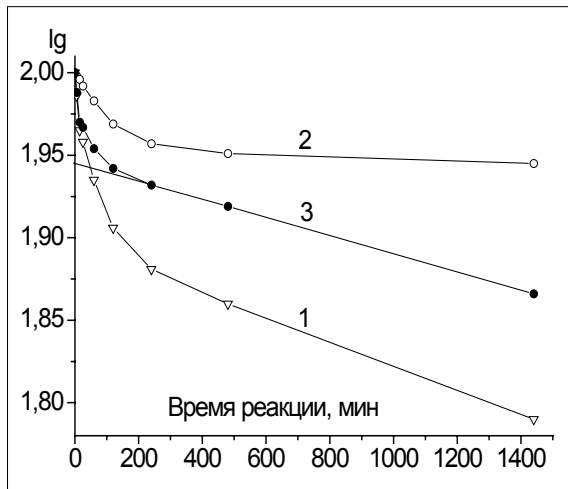
Рис.1. Динамика гидролиза гелиантинина по данным электрофореза (SDS-PAGE в присутствии ME).



**Рис. 2.** Схема расщепления α-цепи α1 гелиантинина при гидролизе папаином. Вторичные структуры (стрэнды A'-J' и спирали h1-h3) показаны согласно структурной модели гелиантинина [12]. Чувствительные к протеолизу бесструктурные участки пронумерованы согласно [11]; строчными буквами показаны аминокислотные остатки в пределах бесструктурных участков, которые соответствуют субстратной специфичности папаина. Положение Cys88, образующего дисульфидную связь с β-цепью, обозначено звездочкой. Показанные минимально возможные значения молекулярных масс фрагментов рассчитаны с учетом специфичности папаина по аминокислотной последовательности гелиантинина, приведенной в [10]. Курсивом в нижней строчке показан крайне маловероятный альтернативный вариант формирования фрагмента C1.

Сходную картину ограниченного протеолиза мы наблюдали, исследуя действие папаина на гомогексамер A3B4 глицинина, запасного 11S глобулина сои: последовательное C-концевое укорачивание α-цепи A3, оканчивающееся отщеплением спирального домена при сохранении гексамерной структуры высокомолекулярного остатка белка [6].

Согласно схеме, показанной на рис. 2, даже после 24-часовой реакции ограниченный протеолиз α-цепи α1 еще не завершен, поскольку в составе гелиантинина-II обнаруживается промежуточный фрагмент C1, а также фрагмент C2, возможно, далее укорачивающийся с образованием фрагмента C3. Тем не менее, после практически полного исчезновения α-цепи α1 дальнейший протеолиз содержит признаки реакции псевдопервого порядка (зависимость  $\lg P = f(t)$  приближается к линейности, рис. 3).



**Рис. 3.** Кинетика гидролиза гелиантинина папаином. Весовое содержание белка P (кривая 1) и его молекулярная масса M (кривая 2) выражены в процентах от исходной величины. Кривая 3 соответствует логарифму суммы текущих относительных значений убыли молекулярной массы олигомера и его весового содержания  $\lg(100 - M + P)$ .

Уравнение (2) для продуктов расщепления фрагмента C1 использовать полусумму рассчитанных для них значений  $r_i^1/m_i^1$ . Полученная кривая 2 (рис. 3) отражает искомую динамику изменений весового содержания белка в гидролизате в результате исключительно ограниченного протеолиза.

На всех этапах реакции снижение содержания белка в гидролизате в результате суммы ограниченного и кооперативного протеолиза (кривая 1) существенно выше, чем в результате исключительно ограниченного протеолиза (кривая 2). Следовательно, кооперативный протеолиз гелиантинина происходит с самого начала реакции.

Кооперативный протеолиз гелиантинина описывается кривой 3, в котором исключено влияние ограниченного протеолиза на текущие величины относительного содержания белка в ходе реакции (см. рис.3). На первом этапе протеолиза константа скорости кооперативного процесса не только не возрастает (как можно было ожидать), но быстро снижается и затем становится постоянной. Это свидетельствует

о присутствии в исследуемом препарате гелиантинина двух фракций: минорной фракции А с повышенной чувствительностью к кооперативному протеолизу (полностью удаляется по прошествии двух часов реакции) и основной фракции В. Предполагая постоянство константы скорости кооперативного протеолиза фракции В, экстраполяцией кривой 3 к нулевому времени реакции получаем логарифм относительного содержания в исходном препарате фракции В ( $\lg P[B] = 1,946$ ;  $P[B] = 88,3\%$ ).

Итак, убыль весового содержания белка при гидролизе гелиантинина папаином происходит в результате суммы трех реакций: быстрой реакции кооперативного протеолиза, полностью удаляющей из реакционной среды фракцию А (11,7%), медленного кооперативного протеолиза фракции В (88,3%), происходящего на протяжении всего исследуемого периода реакции, и ограниченного протеолиза, снижающего молекулярную массу олигомера на  $10,3 \pm 0,6\%$  (принимая недостоверной разницу текущих величин М через 8 и 24 часа реакции; эта разница и определяет неполную параллельность линейных участков кривых 1 и 3, рис. 3).

Две одновременные реакции кооперативного протеолиза с резко различающимися константами скорости мы наблюдали при исследовании кинетики гидролиза 7S глобулина какао эндогенной аспартильной протеиназой [13].

Быстрый гидролиз по кооперативному механизму можно расценивать как показатель необычного конформационного состояния фракции А, обусловленного либо денатурацией соответствующей части исходного препарата субстрата, либо особенностями нативной третичной структуры фракции А гелиантинина. Как упоминалось выше, одним из существенных событий, наблюдаемых на первом этапе протеолиза, является полное удаление из препарата гелиантинина  $\beta$ -цепи  $\beta 2$  и соответствующей субъединицы  $\alpha\beta 2$ . Поэтому не исключено, что повышенная чувствительность к кооперативному протеолизу фракции А объясняется спецификой ее нативной структуры. В этой связи упомянем о необычной первичной структуре гелиантинина gb|AAA33374. В структурной модели  $\alpha$ -цепи соответствующей субъединицы полностью отсутствуют такие важные элементы, как стрэнды С, J и J' [11]. Естественно поэтому ожидать повышенную чувствительность к кооперативному протеолизу гексамера гелиантинина, в состав которого входят столь «дефектные» субъединицы.

Специфичность структуры гелиантинина не ограничивается возможным присутствием в его гетерогексамерах «дефектных» субъединиц. Так, необычно короткая субъединица  $\alpha 3\beta$  вообще нечувствительна к ограниченному протеолизу (рис. 1), что может быть связано с особо короткими бесструктурными участками ее  $\alpha$ -цепи [12]. Ограниченный протеолиз субъединицы  $\alpha 2\beta$  незначителен и сводится, вероятно, лишь к С-концевому укорачиванию участка 4 ее  $\alpha$ -цепи. Таким образом, снижение молекулярной массы гетерогексамера гелиантинина при действии папаина почти исключительно связано с ограниченным протеолизом  $\alpha$ -цепи  $\alpha 1$ .

### Заключение

Ввиду сложного субъединичного состава гелиантинина и недостаточной информации о первичной структуре его субъединиц, приведенные в настоящей работе количественные характеристики кооперативного и ограниченного протеолиза, полученные по результатам анализа электрофореграмм, нуждаются в уточнении. Однако следующие качественные закономерности протеолиза гелиантинина представляются достаточно достоверными.

1. Лишь одна из субъединиц гелиантинина способна к относительно глубокому ограниченному протеолизу  $\alpha$ -цепи, заключающемуся в удалении обширного С-концевого участка, охватывающего спиральный домен.
2. Гексамерная структура гелиантинина сохраняется после завершения (или близкого к завершению) ограниченного протеолиза.
3. Ограниченный протеолиз не оказывает существенного влияния на константу скорости кооперативного протеолиза гелиантинина и, следовательно, не может играть существенной регуляторной роли в его глубокой деградации.

### Литература:

1. Shutov A.D., Vaintraub I.A. Degradation of storage proteins in germinating seeds // *Phytochemistry*. - 1987. - Vol.26. - P.1557-1566.
2. Shutov A.D., Pineda J., Senyuk V.I., Reva V.A., Vaintraub I.A. Action of trypsin on soybean glycinin. Mixed-type proteolysis and its kinetics; molecular mass of glycinin-T // *Eur. J. Biochem.* - 1991. - Vol.199. - P.539-543.
3. Vaintraub I.A., Morari D. Applying the increase in rate constants of cooperative proteolysis to the determination of transition curves of protein denaturation // *J. Biochem. Biophys. Methods*. - 2003. - Vol. 57. - P.191-201.
4. Zakharov A., Carchilan M., Stepurina T., Rotari V., Wilson K., Vaintraub I.A. Comparative study of the role of the major proteinases of germinated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and soybean (*Glycine max* [L.] Merrill) seeds in the degradation of their storage proteins // *J. Exp. Bot.* - 2004. - Vol.55. - P.2241-2249.

5. Shutov A.D., Blattner F.R., Bäumlein H., Müntz K. Storage and mobilization as antagonistic functional constraints of seed storage globulin evolution // J. Exp. Bot. - 2003. - Vol.54. - P.1645-1654.
6. Rudakova A., Rudakov S., Kakhovskaya I., Wilson K., Yagasaki K., Utsumi S., Shutov A. Limited proteolysis controls massive degradation of glycinin, storage 11S globulin from soybean seeds // Agrobiodiversitatea Vegetală în Republica Moldova: Evaluarea, Conservarea și Utilizarea: Materialele simpozionului național. - Chișinău: ASM, - 2008, p.396-402.
7. Артыкова Г. Протеолиз запасного 11S глобулина подсолнечника // Anale Științifice ale USM. Seria „Științe chimico-biologice”. - Chișinău: CEP USM, 2003, p.102-105.
8. Vaintraub I.A., Yattara H.B. Proteolysis of Kunitz soybean inhibitor. Influence on its activity // J. Food Agric. Chem. - 1995. - Vol.43. - P.862-868.
9. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. - 1970. - Vol.227. - P.680-685.
10. Dalgalarondo M., Raymond J., Azanza J.L. Sunflower seed proteins: characterization and subunit composition of the globulin fraction // J. Exp. Bot. - 1984. - Vol.35. - P.1618-1628.
11. Adachi M., Kanamori J., Masuda T., Yagasaki K., Kitamura K., Mikami B., Utsumi S. Crystal structure of soybean 11S globulin: glycinin A3B4 homohexamer// Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2003. - Vol.100. - P.7395-7400.
12. Makaeva E., Shutov A. Peculiarity of sunflower 11s seed storage globulin: tertiary structure modeling // Studia Universitatis: Revista Științifică a Universității de Stat din Moldova. Seria „Științe ale naturii”. - 2009. - № 1 (21).
13. Senyuk V, Heinrichs H. Voigt J., Shutov A., Biehl B. Storage globulin and aspartic proteinase from ungerminated cacao seeds: kinetics and mechanism of *in vitro* proteolysis // Studia Universitatis: Revista Științifică a Universității de Stat din Moldova. Seria „Științe ale naturii”. - 2007. - Nr.7. - P.153-159.

Prezentat la 30.01.2009