

СМЕШАННЫЙ ТИП ПРОТЕОЛИЗА 11S ГЛОБУЛИНА КЕДРА ПАПАИНОМ

**Наталья ЛАПТЕВА, Элина МАКАЕВА, Сергей РУДАКОВ, Анжела РУДАКОВА,
Ирина КАХОВСКАЯ, Андрей ШУТОВ**

НИЛ биохимии растений

Proteoliza limitată și cooperativă a globulinelor 11S din semințele de *Pinus sibirica* cu papaină a fost studiată separat folosind SDS-electroforeza și analiza cineticii acestui proces. Proteoliza limitată constă în detașarea segmentului C-terminal al lanțului- α care include domeniul elicoidal al globulinei 11S. Procesul cooperativ începe imediat prin pornirea rapidă a reacției de ordinul pseudo-întâi cu viteza de reacție invariabilă. A fost comparată regularitatea caracterului proteolizei *P. sibirica* și al altor globuline 11S anterior studiate.

Limited and cooperative proteolyses of 11S globulin from *Pinus sibirica* seeds by papain were studied separately using SDS-electrophoresis and analysis of kinetics of the processes. The limited proteolysis consists of detachment of C-terminal segment from 11S globulin α -chains including helical domain. The cooperative process starts immediately from the very beginning of the reaction as a pseudo-first order reaction under unvarying rate constant. General regularities of proteolysis of *P. sibirica* and some other 11S globulins previously studied were compared.

Введение

Существует три типа протеолиза белков: *ограниченный*, *кооперативный* (поодионый) и *смешанный* [1]. *Ограниченный протеолиз* определяется присутствием в субстрате связей с повышенной чувствительностью к протеолитической атаке, легко обнаруживается SDS-электрофорезом по последовательному укорачиванию полипептидных цепей и/или их расщеплению на высокомолекулярные фрагменты и завершается образованием относительно стабильного высокомолекулярного продукта. *Кооперативный протеолиз* заключается в поочередном глубоком расщеплении молекул субстрата, протекает как реакция псевдопервого порядка [1] и SDS-электрофорезом не обнаруживается. При *смешанном типе* деградация белка является результатом суммы ограниченного и кооперативного протеолиз.

Скорость ограниченного протеолиза относительно высока, в связи с чем на начальном этапе реакции смешанного типа обнаруживаемое снижение весовой концентрации субстрата определяется снижением его молекулярной массы (либо преимущественно, либо исключительно при отсутствии на этом этапе кооперативного протеолиза).

Константа скорости кооперативного протеолиза зависит от конформационного состояния белкового субстрата [2]. Те или иные изменения нативной конформации субстрата, неизбежные при ограниченном протеолизе, могут оказывать влияние на константу скорости кооперативного процесса, который либо ускоряется, либо даже инициируется ограниченным протеолизом. Мы наблюдали такую инициацию при гидролизе папаином гомогексамера АЗВ4 11S глобулина сои [3]. Напротив, при исследовании гидролиза папаином 11S глобулина подсолнечника мы установили, что ограниченный протеолиз не оказывает существенного влияния на константу скорости кооперативного процесса [4]. Возможно, это обусловлено специфичной третичной структурой 11S глобулина подсолнечника [5]. Тем не менее, гипотеза о регуляторной роли ограниченного протеолиза, инициирующего массивную деградацию 11S глобулинов по кооперативному механизму [3], должна быть подтверждена изучением 11S глобулинов из других источников. С этой целью в настоящей работе мы исследовали закономерности гидролиза папаином 11S глобулина кедра.

Материалы и методы исследования

Обезжиренную муку семян кедра *Pinus sibirica* дважды промывали водой в соотношении 1:15 (вес/объем), осадок экстрагировали 0,1 М трис-буфером pH 8,0, содержащим 1 М NaCl, 0,01 М 2-меркаптоэтанол и 0,02% NaN₃. 11S глобулин получали изоэлектрическим осаждением экстракта при pH 6,0. Осадок растворяли в том же буфере и гидролизировали папаином (Sigma) при 30°C. Реакционная смесь содержала 4,0 мг/мл субстрата и 80 мкг/мл фермента. Реакцию останавливали добавлением либо трихлоруксусной кислоты, либо E-64 до концентрации 10 мкМ. Остаточный белок в гидролизатах определяли по связыванию красителя [6] и исследовали SDS-электрофорезом (15%-ный гель, буферная

система Лэмбли [7]). Электрофореграммы сканировали и анализировали с использованием программы Phoretix 1D Gel Analysis v.5.10. При анализе электрофореграмм принимали, что кажущиеся молекулярные массы α -цепей 11S глобулина кедр (его аминокислотные последовательности неизвестны) завышены в той же степени, что и в случае 11S глобулина сои. Изменение в ходе гидролиза среднечисленных молекулярных масс полипептидов 11S глобулина рассчитывали, как описано ранее [4], вводя поправку на кажущееся отклонение весовых количеств α - и β -цепей в исходном белке, от эквимоллярности.

Результаты исследования и их обсуждение

При SDS-электрофорезе в присутствии 2-меркаптоэтанола (МЭ) 11S глобулин кедр образует типичные для других 11S глобулинов группы зон α - и β -цепей, соединенных дисульфидной связью (рис. 1А). Относительно высокую степень очистки 11S глобулина удалось получить весьма простым способом благодаря удалению при промывке муки водой большей части белковых (и небелковых) примесей. Этот же прием мы применили при очистке основного 7S глобулина сои [8]. Необычайно высокая ионная сила растворителя, использованного при изоэлектрическом осаждении 11S глобулина, также способствовала его успешной очистке.

В ходе гидролиза 11S глобулина папаином резко снижается содержание α -цепей, изменяется количественное соотношение зон в области β -цепей и появляются новообразуемые зоны F полипептидных фрагментов (рис. 1А). Закономерности протеолиза 11S глобулина могут быть описаны изменениями в ходе реакции относительных молярных количеств электрофоретических компонентов (рис. 1Б). Кажущийся прирост молярной доли суммы β -цепей безусловно свидетельствует об образовании фрагментов α -цепей, совпадающих по подвижности с группой β -цепей. Суммируя этот прирост с величинами молярных долей остаточных α -цепей и фрагментов F, получаем постоянную величину, равную молярной доли β -цепей в исходном 11S глобулине. Отсюда следует, что β -цепи 11S глобулина кедр так же, как это характерно для всех других 11S глобулинов [9], неспособны к ограниченному протеолизу, а α -цепи образуют несколько вариантов фрагментов, в том числе близких по молекулярной массе интактным β -цепям. Этот вывод согласуется с результатами двумерного электрофореза препарата 11S глобулина на промежуточной стадии гидролиза, содержащего как интактные, так и частично гидролизованные субъединицы (рис. 1А). Итак, молярные количества β -цепей и суммы α -цепей и их фрагментов остаются постоянными в ходе гидролиза. Следовательно, ограниченный протеолиз заключается в укорачивании α -цепей, но не в их расщеплении.

Структура субъединиц 11S глобулинов, как покрытосеменных, так и голосеменных, консервативна и состоит из двух главных элементов: β -барреля и домена, образованного α -спиралями (рис. 1В). Закономерности ограниченного протеолиза 11S глобулинов определяются присутствием в их α -цепях трех протяженных бесструктурных участков, чувствительных к протеолизу [9]. Согласно результатам двумерного электрофореза (рис. 1А), фрагменты α -цепей 11S глобулина кедр в ходе протеолиза остаются ковалентно связанными с β -цепями. Отсюда следует, что формирование фрагментов α -цепей является результатом их С-концевого укорачивания, обусловленного последовательным удалением С-концевого бесструктурного участка 3 и затем спирального домена после расщепления бесструктурного участка 2; остаток α -цепи соответствует β -баррелю (рис. 1В). К такому же выводу мы пришли, исследуя протеолиз папаином гомогексамера АЗВ4 11S глобулина сои [3]. Отметим существенную разницу в закономерностях протеолиза этих белков. Соответствующие β -баррелю фрагменты α -цепей глобулина кедр короче тех же фрагментов глобулина сои; последние далее расщепляются в области бесструктурного участка 1 [3]. Эти различия в совокупности приводят к предположению о том, что в α -цепях 11S глобулина кедр бесструктурный участок 1 может быть необычайно коротким, чем и объясняется его устойчивость к ограниченному протеолизу.

Спиральный домен 11S глобулина сои играет существенную роль в стабилизации его третичных структур [10]. Поэтому мы предположили, что удаление спирального домена при ограниченном протеолизе и приводит к существенным конформационным изменениям 11S глобулина сои, сообщаящим ему способность к кооперативному протеолизу [3]. Основываясь на описанном выше сходстве основных закономерностей ограниченного протеолиза 11S глобулинов сои и кедр, было бы логичным ожидать сходства закономерностей их протеолиза по смешанному типу.

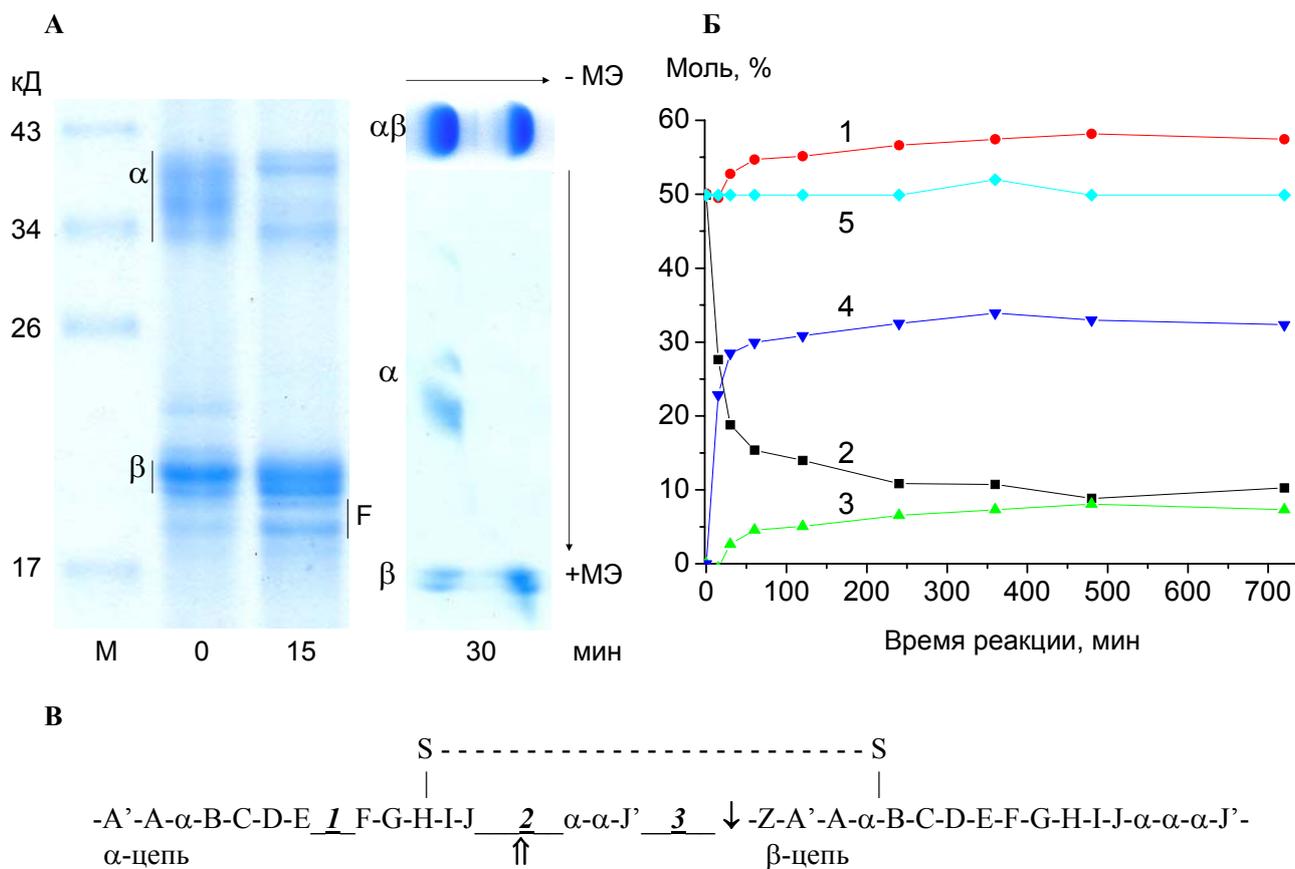


Рис. 1. Закономерности протеолиза 11S глобулина кедр папаином.

А. SDS-электрофорез: одномерный (+МЭ) и двумерный (-МЭ в первом и +МЭ во втором направлениях). М, молекулярные маркеры (Fermentas); α и β, соответственно, α- и β-цепи исходного 11S глобулина; F, фрагменты α-цепей, отличающиеся по молекулярной массе от β-цепей; αβ, в отсутствие МЭ ковалентно связанные α- и β-цепи. Препарат белка, проанализированного двумерным электрофорезом, содержит интактный (левый трек) и частично гидролизованный (правый трек) 11S глобулин. Последний образован близкими по молекулярной массе фрагментами α-цепей и ковалентно связанными с ними интактными β-цепями.

Б. Изменение относительных молярных количеств m (в %) электрофоретических компонентов в ходе гидролиза 11S глобулина. 1, m β-цепей (mβ); 2, m α-цепей (mα); 3, прирост m β-цепей (mβ - 100); 4, m фрагментов F (mF); 5, mα + mF + (mβ - 100).

В. Схема структуры 11S глобулинов на примере гомогексамера АЗВ4 сои [10]. В главной строчке показаны вторичные структуры (β-стрэнды и α-спирали), бесструктурные участки 1, 2 и 3 и положение остатков цистеина, участвующих в образовании межцепочечной дисульфидной связи. Стрелке соответствует точка посттрансляционного расщепления субъединиц 11S глобулинов. Символом ↑ обозначена предполагаемая С-концевая граница фрагментов α-цепей 11S глобулина кедр.

Если при протеолизе смешанного типа ограниченный и кооперативный процессы протекают независимо друг от друга, экстраполяция линейного участка зависимости $\lg P = f(t)$ (где P – весовое содержание белка в процентах от исходного, t – время реакции) к нулевому времени реакции приводит к значению $\lg P^0$, равному $\lg M^f$ (где M^f – молекулярная масса конечного продукта ограниченного протеолиза в процентах от молекулярной массы исходного белка M^0) [1]. На рис. 2, отражающем количественные взаимоотношения между ограниченным и кооперативным протеолизом 11S глобулина кедр, экстраполированная величина $\lg P^0$ практически совпадает со средним значением $\lg M^f$, рассчитанным по данным денситометрии электрофореграмм. Это свидетельствует о постоянстве константы скорости кооперативного протеолиза, начинающегося сразу же вслед за смешиванием растворов суб-

страта и фермента, вне зависимости от параллельно протекающего ограниченного протеолиза. Более наглядно этот вывод иллюстрируется линейной зависимостью 3 на рис. 2, описывающей изменение содержания белка исключительно в результате кооперативного процесса.

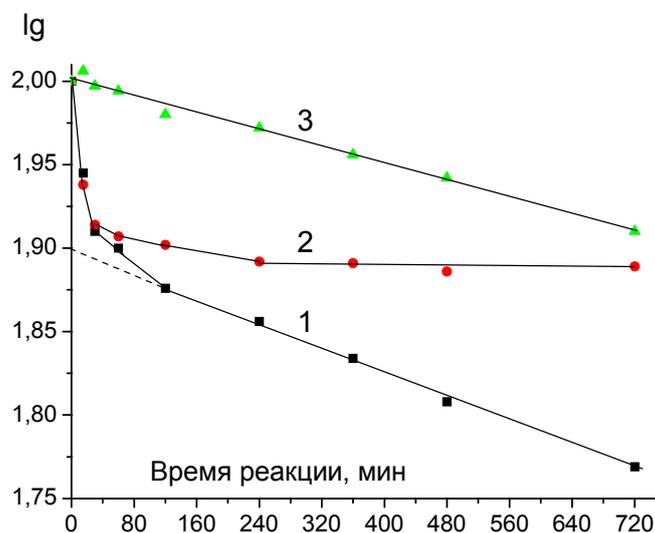


Рис. 2. Кинетика протеолиза 11S глобулина кедр папаином.

1, зависимость $\lg P = f(t)$, где P – весовое содержание белка в процентах от исходного; 2, зависимость $\lg M = f(t)$, где M – среднечисленная молекулярная масса белка в процентах от исходной; 3, зависимость, описывающая убыль весового содержания белка исключительно в результате кооперативного протеолиза $\lg P^C = f(t)$, где P^C – весовое содержание белка в процентах от исходного, рассчитанное из экспериментальных значений зависимостей 1 и 2: $P^C = P + (100 - M)$.

Приведенные в настоящей работе экспериментальные результаты показывают, что ограниченный протеолиз 11S глобулинов семян филогенетически столь различных растений, как кедр и соя, развивается по близким сценариям, что свидетельствует в пользу пока лишь предполагаемого родства не только первичных, но и высших структур всех 11S глобулинов. Однако обнаруженные в ходе предпринятого исследования различия в чувствительности к кооперативному протеолизу 11S глобулинов кедр и сои указывают на то, что механизмы регуляции их массивированного протеолиза, определяемые тонкими деталями их третичных и четвертичных структур, могут быть различными. Следует отметить, что в связи с низкой растворимостью 11S глобулина кедр его протеолиз мы проводили в слабощелочной среде, тогда как *in vivo* процесс происходит в слабокислой среде. По-видимому, результаты настоящей работы следует считать предварительными. Для установления общих и индивидуальных закономерностей протеолиза 11S глобулинов и регуляции этого процесса, мы планируем расширить круг исследуемых объектов, который должен включать 11S глобулины однодольных с их специфической структурой и тех из двудольных, третичная структура которых известна.

Литература:

1. 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.
2. 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.
3. 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. - Chiășinău: ASM, 2008, p.396-402.

4. Макаева Э., Лаптева Н., Рудакова А., Рудаков С., Каховская И., Шутов А. 11S глобулин подсолнечника: кинетика ограниченного и кооперативного протеолиза папаином. // *Studia Universitatis. Seria "Științe ale naturii"*, 2009, nr.1(21), p.24-28.
5. Macaeva E., Sutov A. Peculiarity of sunflower 11S seed storage globulin: tertiary structure modeling. // *Studia Universitatis. Seria "Științe ale naturii"*, 2009, nr.6(26), p.118-120.
6. 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.
7. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*, 1970, vol.227, p.680-685.
8. Shutov A.D., Prak K., Fukuda T., Rudakov S.V., Rudakova A.S., Tandang-Silvas M., Fujiwara K., Mikami B., Utsumi S., Maruyama N. Soybean basic 7S globulin: subunit heterogeneity and molecular evolution // *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2010, vol.74, p.1631-1634.
9. 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.
10. 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.

Prezentat la 05.10.2010