

Структура и функция экстензиноподобных белков хлопчатника

З. С. Хашимова, Н. Н. Кузнецова, О. Х. Саитмуратова, А. А. Садыков

Институт биорганической химии им. акад. А. С. Садыкова АН Республики Узбекистан
Пр. Х. Абдуллаева, 83, Ташкент, 700143, Узбекистан

E-mail: root@ibc.tashkent.su

Изучена структурно-функциональная зависимость экстензиноподобных белков (ЭПБ) хлопчатника. Установлено, что ЭПБ тормозят пролиферацию клеток и действие их зависит от дозы и фазы клеточного цикла. Антипролиферативный эффект дегликозилированного ЭПБ на клетки линии КМЛ имеет более выраженный характер, чем самих ЭПБ. В работе использованы культура клеток линии КМЛ и методы молекулярного моделирования.

Введение. Исследование структурной и функциональной взаимосвязи гликопротеидов (ГП) имеет важное значение для изучения механизмов действия и понимания принципов функционирования клеточных регуляторных систем [1, 2]. Среди ГП растений определенный интерес представляют экстензиноподобные белки (ЭПБ), обладающие широким спектром физиологического действия. Эти белки участвуют в формировании и растяжении первичной клеточной стенки, проявляют защитные функции при стрессовых ситуациях: раневом поражении растений, действии низких температур, патогена, этилена и др. [3—5]. Такая полифункциональность ЭПБ обусловлена, с одной стороны, разнообразием доменной организации белка, с другой, — многообразием пространственной структуры олигосахаридных фрагментов и, как следствие, значительно большей информационной емкостью молекулы. К настоящему времени наиболее изучены ЭПБ, выделенные из растений семейства бобовых, пасленовых и др. [6—8]. ЭПБ хлопчатника практически не изучены.

Цель данной работы состояла в исследовании роли ЭПБ хлопчатника в культуре тканей в плане структурно-функциональной зависимости.

Материалы и методы. ЭПБ выделяли из двухдневных проростков хлопчатника [9].

Госсипол и другие токсичные фенольные соединения определяли следующим образом. К 1 мг вещества приливали 10-кратный объем ацетона, смесь тщательно растирали в ступке и центрифугировали. К супернатанту и осадку приливали 2 %-й раствор флороглюцина в 2 М растворе HCl. В обеих фракциях цвет не изменился (при положительном ответе развивается малиновая окраска).

Количественное содержание общих сахаров регистрировали спектрофотометрически с использованием антрон-сернокислотного реагента [9]. Содержание белка определяли по методу Лоури [10].

Дегликозилирование ЭПБ хлопчатника проводили следующим образом. 3 мг лиофильно высушенного вещества переносили в пластиковую пробирку, приливали 36 мкл безводного метанола и 540 мкл 70 %-й HF в пиридине. После 90-мин инкубации при комнатной температуре добавляли 3 мл холодной воды.

Выпавший осадок отделяли центрифугированием при 1000 об/мин в течение 10 мин и далее супернатант, содержащий дегликозилированный белок, диализовали в течение суток против 0,1 М NaCl и двое суток — против дистиллированной воды. Осадок обрабатывали холодной водой и лиофильно высушивали. Процедуру повторяли несколько раз. В супернатанте и выпавшем осадке определяли содержание белка по Лоури и общих сахаров — антрон-сернокислотным методом.

Клетки линии КМЛ, выведенные нами из ме-

ланомы мышей В-16, рассеивали по 80 тыс/мл на флакон в 2 мл питательной среды ДМЕМ с 10 % сыворотки эмбриона теленка, 200 мМ глутамином и антибиотиками и культивировали в CO₂-инкубаторе при 37 °С. Через 24 ч добавляли ЭПБ в дозах 100, 50, 10 мкг/мл и дегликозилированный ЭПБ (дЭПБ) — в дозе 100 мкг/мл. Время контакта клеток с веществом составляло 24 ч и импульсно на 1 ч добавляли ³H-тимидин (10 мкКи на флакон). Дальнейшую обработку клеток, включение ³H-тимидина в клетки и подсчет живых клеток осуществляли, как описано нами ранее [11].

Все эксперименты, включая контрольные, производили в трех повторях. Контролем служили клетки без воздействия препарата.

Результаты и обсуждение. ГП, к которым относятся ЭПБ, представляют собой полифункциональные молекулы, непосредственно участвующие в различных меж- и внутриклеточных взаимодействиях, и являясь носителем информации в процессах молекулярного узнавания [1, 12]. Представления об ЭПБ постоянно меняются и углубляются: от белков, участвующих в построении и растяжении первичной клеточной стенки до таковых, причастных к защитной реакции растений [3—7].

Ранее нами с помощью моноклональных антител показана общность антигенных детерминант ЭПБ с белками плазматических мембран и лектиноподобными белками, выделенными из семян хлопчатника. Этот факт во многом определяет биологическую функцию ЭПБ [9].

Нами выделены и охарактеризованы электрофоретически ЭПБ хлопчатника, а также с помощью фенилтиокарбамоил-производных показано присутствие гидроксипролина, характерного для белков семейства экстенсинов [13].

Количественное содержание общих сахаров в ЭПБ, выделенных из двухдневных проростков, составило 20 %.

Кислотный гидролиз ЭПБ 2 н серной кислотой с последующей хроматографией в системе бутанол—пиридин—вода выявил содержание в образцах арабинозы и следовых количеств галактозы.

Известно, что хлопчатник содержит госсипол и его производные, высокотоксичные в культуре тканей [14]. В связи с этим в выделенных образцах исследовали содержание госсипола качественной реакцией с использованием реагента флороглюцина. В образцах не обнаружили госсипола и токсичных фенольных соединений.

ЭПБ не обладал гемагглютинирующей активностью, при этом, на клеточной культуре КМЛ нами установлено, что действие ЭПБ приводит к агрегации клеток. Возможно, что агрегация клеток

является одним из этапов угнетения пролиферации клеток, связанной с защитной реакцией клеток.

Одной из подходящих моделей для изучения биологического действия физиологически активных веществ является культура тканей.

В данной работе использовали высокопролиферирующую (время генерации клеток составляло 14—16 ч) перевиваемую культуру клеток КМЛ в логарифмической фазе роста. Действие белка определяли по включению ³H-тимидина и подсчету живых клеток. Данные представлены в табл. 1

Как видно из данных этой таблицы, действие ЭПБ на клетки линии КМЛ зависит от дозы: 100 мкг/мл подавляют включение метки на 51 % (СЕ₅₀), 50 мкг/мл — на 27 % и 10 мкг/мл — на 7 %. Подобный эффект наблюдался при подсчете живых клеток. Так, доза 100 мкг/мл подавляет рост клеток на 48 %, 50 мкг/мл — на 23 % и 10 мкг/мл — на 4 %.

Таким образом, показано, что действие ЭПБ на клетки КМЛ является дозозависимым и выражается в подавлении пролиферативной активности клеток.

Для изучения возможного механизма действия ЭПБ в культуре клеток КМЛ нами использованы препараты известного механизма действия. Один из них — сарколизин, который алкилирует ДНК. Другой, винкрестин, — алкалоид индольного ряда, блокирующий митоз клеток на стадии метафазы. На клетках КМЛ нами показано, что доза для 50 %-го подавления роста клеток (СЕ₅₀) для сарколизина составляет 15 мкг/мл, винкрестина — 1 мкг/мл. ЭПБ и указанные препараты вводили в культуру клеток отдельно или вместе в 50 %-х дозах в логарифмической и стационарной фазах роста клеточной культуры. Данные представлены в табл. 2. Как видно, в логарифмической фазе роста клеток при совместном действии сарколизина с винкрестином наблюдали 80 %-е подавление про-

Таблица 1
Действие экстенсиноподобных белков в культуре тканей меланомы мышей КМЛ

Доза ЭПБ, мкг/мл	Подавление включения ³ H-тимидина, %	Подавление роста клеток*, %
100	51	48
50	27	23
10	7	4

*Учитывали по подсчету процента живых клеток.

Таблица 2
Подавление роста клеток КМЛ в логарифмической и стационарной фазах

Образец	Доза, мкг/мл (CE ₅₀)	Подавление роста клеток*, % (логарифмическая фаза)	Подавление роста клеток, % (стационарная фаза)
ЭПБ	100	49,0	8,0
Сарколизин	15	44,0	2,0
Винкрисдин	1	54,0	12,0
Сарколизин + винкрисдин	100+1	80,0	—
ЭПБ + сарколизин	100+15	62,0	—
ЭПБ + винкрисдин	100+1	85,0	—

*Учитывали по подсчету процента живых клеток.

лиферации клеточного роста, что свидетельствует о цитотоксическом действии препарата, захватывающем две фазы деления клетки — S-период (репликация ДНК) и митоз.

При сочетанном действии ЭПБ и сарколизина, взятых в 50 %-х дозах (100 и 15 мкг/мл), наблюдали подавление роста клеток на 62 %, т. е. ЭПБ, так же, как и сарколизин, действует в основном на S-период клеточного деления. В случае ЭПБ с винкрисдином эффект подавления аналогичен таковому при действии на пролиферацию клеток сарколизина с винкрисдином. Можно предположить, что ЭПБ и винкрисдин подавляют рост клеток в двух фазах — S-периоде и митозе.

В стационарной фазе (стагнация) роста клеток ЭПБ, сарколизин и винкрисдин были практически неактивными — 8, 2 и 12 % соответственно.

В результате проведенных экспериментальных исследований нами обнаружено, что действие ЭПБ на клетки зависит от дозы, и данные по совместно-му действию ЭПБ с сарколизинном и винкрисдином дают возможность предположить, что ЭПБ, выделенные из хлопчатника, главным образом действуют на S-период клеточного деления, т. е. когда транскрипционно активный хроматин наиболее уязвим для различных внешних воздействий.

Для выявления роли олигосахаридных фрагментов в составе ЭПБ последние дегликозилировали безводным HF в пиридине в течение 90 мин при комнатной температуре. Далее для определения наличия общих сахаров выпавший осадок отделяли от супернатанта центрифугированием и суперна-

тант, содержащий дегликозилированный белок, диализовали для удаления HF, метанола и пиридина. Дегликозилирование проведено в мягких условиях, не нарушающих пептидных связей [7]. Чтобы подтвердить этот факт в супернатанте и осадке определено содержание белка и общих сахаров. В супернатанте, содержащем дегликозилированный белок, обнаружено около 5 % общих сахаров, при этом в осадке белка не выявлено.

Этот факт свидетельствует о том, что первичная структура белка при дегликозилировании не нарушена.

Для определения биологической активности дЭПБ вводили в клетки КМЛ в логарифмической фазе роста клеток в дозе 100 мкг/мл, которая, как показано нами, составляла 50 % дозы, вызывающей цитотоксический эффект. Действие белка определяли в цитотоксическом тесте по включению ³H-тимидина и подсчету живых клеток [11]. Данные представлены в табл. 3

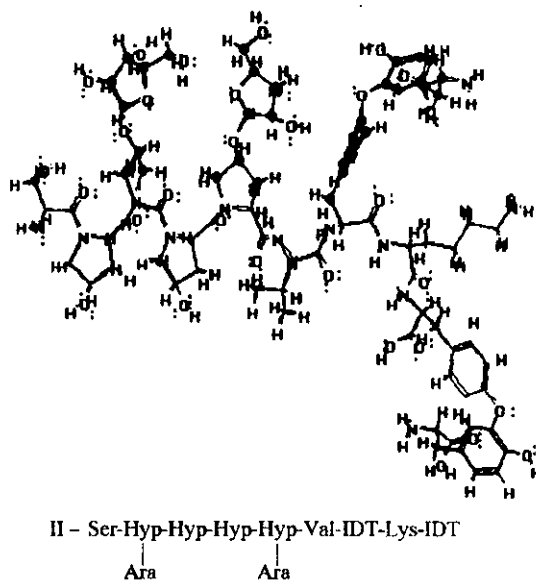
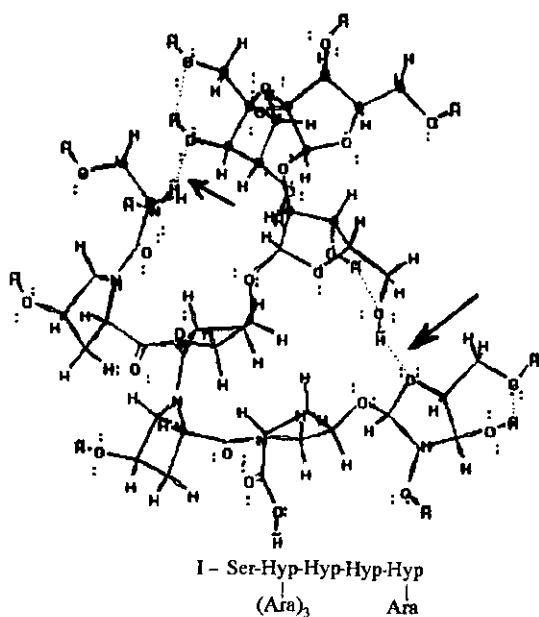
Из данных этой таблицы следует, что образцы в концентрациях 100 мкг/мл (CE₅₀) подавляют включение ³H-тимидина и рост клеток: 56 и 49 % для ЭПБ и 87 и 84 % для дЭПБ по двум тестам соответственно.

Сравнение полученных результатов позволяет сделать вывод о том, что наибольший цитотоксический эффект, как и предполагалось, отмечается в случае дЭПБ. Аналогичный эффект описан с использованием ламинина — основного мембраносвязанного ГП животных. В работе [15] сообщается о том, что дегликозилированный ламинин, а также искусственно синтезированные функционально значимые фрагменты имеют более выраженный эффект задержки роста метастазов [15]. Из этих данных следует, что при дегликозилировании структура ГП претерпевает определенные конформационные перестройки, вследствие чего меняется и биологическая активность.

Таблица 3
Действие дегликозилированного экстенсинаподобного белка в культуре тканей меланомы мышей КМЛ

Образец	Подавление включения ³ H-тимидина, %	Подавление роста клеток*, %
Контроль	100	100
ЭПБ	56	49
дЭПБ	87	84

*Учитывали по подсчету процента живых клеток.



Молекулярные модели фрагментов экстенсина

Анализ структуры экстенсина, выделенного из разных источников (табак, морковь, семейство бобовых), выявил их общность: структура белка высококонсервативна, содержит часто повторяющиеся последовательности тетрагидроксипролина, арабинолизированного в разной степени (кор-фрагмент) [3, 7, 16]. Такие структурные особенности белка с наибольшей долей вероятности можно отнести к структуре ЭПБ хлопчатника.

В рамках программы РСМ-ММХ построена молекулярная модель повторяющегося кор-фрагмента экстенсина. Модель представлена на рисунке (структура I). Учитывая возможности программы мы присоединили три остатка арабинозы (Ara) ко второй молекулы Нур и один остаток Ага — к четвертой. Структуру минимизировали по энергии и рассчитывали геометрические и энергетические параметры в исходном состоянии, а также с внутримолекулярными водородными связями (стрелками указаны водородные связи). Из молекулярной модели видно, что три арабинозных остатка скручиваются с образованием полости (0,5 × 0,6 нм), стабилизируемой водородными связями (ВМВС). ВМВС формируются между серином и третьим остатком Ага, а также между первыми остатками Ага, связанными со вторым и четвертым Нур, причем водородная связь между Ага-Ага нестабильна и существует лишь в одном из возможных переходных состояний, энергетические параметры

которых весьма близки. Арабинолизированные тетрагидроксипролины образуют β-спираль II порядка и, очевидно, такая структура придает жесткость молекуле и удерживает (Нур)₄ в вытянутой конформации [17]. Нами также построена молекулярная модель одного из функционально значимых фрагментов, полученных триптическим гидролизом Лампортом с соавт. (рисунк, структура II) [6]. Как видно из модели, если к гидроксипролину присоединен один остаток арабинозы, то ярко выраженной полости не наблюдается, при этом сохраняется β-спираль II порядка при (Нур)₄.

В случае присоединения последующих аминокислот (Val, Lys, IDT — изодитиозин) в пространстве образуется структура в виде гребенки [18], и, возможно, функциональные группы олигосахаридов, участвующих в процессах узнавания и в дальнейшем — в углевод-углеводных и углевод-белковых взаимодействиях, становятся более доступными.

Нами определено, что после дегликозилирования ≈ 5 % сахаров остаются связанными с белками. Вероятно, что антенны сахаров, узнающие и затем осуществляющие связь с клетками-мишенями, находятся в более выгодном конформационном (стерическом) состоянии, вследствие чего увеличивается число мест посадки белка на клеточной поверхности. Этим, скорее всего, и объясняется выраженное антипролиферативное действие дЭПБ.

Таким образом, установлено, что действие ЭПБ на клетки линии КМЛ зависит от дозы и фазы клеточного деления (S-период). дЭПБ более цитотоксически активен, т. е. в большей степени подавляет рост клеток меланомы мышей линии КМЛ, чем собственно ЭПБ. Предполагается, что эффект дегликозилирования ЭПБ связан со структурными особенностями белка, а именно — удаление олигосахаридных фрагментов приводит к снятию маскирующего эффекта биологического действия.

Изучена структурно-функциональная зависимость ЭПБ хлопчатника. Установлено, что ЭПБ тормозит пролиферацию клеток и действие зависит от дозы и фазы клеточного цикла. Антипролиферативный эффект дЭПБ на клетки линии КМЛ имеет более выраженный характер, чем самих экстенсиподобных белков. В работе использованы культура клеток линии КМЛ и методы молекулярного моделирования.

Z. S. Khashimova, N. N. Kuznetsova, O. Kh. Saitmuratova, A. A. Sadikov

The structure and function of the cotton extensin-like proteins

Summary

The structural and functional dependence of the cotton extensin-like proteins (ELPs) has been investigated. ELPs inhibit the cell proliferation, their action depending on the glycoproteins dose and the cell cycle phase. The antiproliferative activity of deglycosylated ELPs towards the KML cell line is higher than that of the extensin-like proteins. The KML cell culture and molecular modeling methods have been used in this work.

З. С. Хашимова, Н. Н. Кузнецова, О. Х. Сәйтмуратова, А. А. Садиков

Структура і функція екстенсиподібних білків бавовника

Резюме

Вивчено структурно-функціональну залежність екстенсиподібних білків (ЕПБ) бавовника. Встановлено, що ЕПБ гальмують проліферацію клітин і дія їх залежить від дози і фази клітинного циклу. Антипроліферативний ефект деглікозилизованого ЕПБ на клітини лінії КМЛ має більш виражений характер, ніж самих ЕПБ. У роботі використано культуру клітин лінії КМЛ і методи молекулярного моделювання.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dwek R. A. Glycobiology: Toward understanding the function of sugars // Chem. Rev.—1996.—96.—P. 683—720.
2. Lis H., Sharon N. Protein glycosylation. Structural and functional aspects // Eur. J. Biochem.—1993.—218—P. 1—27.
3. Smith J. J., Muldoon E. P., Lamport D. T. A. Isolation of

- extensin precursors by direct elution of intact tomato cell suspension cultures // Phytochemistry.—1984.—23—P. 1233—1239.
4. Mellon J. E., Helgeson J. P. Interaction of a Hydroxyproline-rich glycoprotein from tobacco callus with potential pathogens // Plant. Physiol.—1982.—70.—P. 401—405.
5. Weiser R. L., Wallner S. J., Waddell J. W. Cell wall and extensin mRNA changes during cold acclimation of pea seedlings // Plant. Physiol.—1990.—93.—P. 1021—1026.
6. Smith J. J., Muldoon E. P., Willard J. J., Lamport D. T. A. Tomato extensin precursors P1 and P2 are highly periodic structures // Phytochemistry.—1986.—25.—P. 1021—1030.
7. Van Holst G. J., Varner J. E. Reinforced polyproline II conformation in a hydroxyproline-rich cell wall glycoprotein from carrot root // Plant. Physiol.—1984.—74.—P. 247—251.
8. Kieliszewski M., Lamport D. T. A. Cross-reactivities of polyclonal antibodies against extensin precursors determined via ELISA techniques // Phytochemistry.—1986.—25.—P. 673—677.
9. Хашимова З. С., Мангутова Ю. С., Сусло М. Э., Леонтьев В. Б. Гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела к мембранным белкам хлопчатника // Биополимеры и клетка.—1999.—15.—С. 283—288.
10. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem.—1951.—193.—P. 265.
11. Хашимова З. С., Кузнецова Н. Н., Марданова З. И., Леонтьев В. Б. Изучение механизма действия экстенсиподобных белков хлопчатника в культуре клеток // Химия природ. соединений.—1999.—№ 3.—С. 372—375.
12. Sharon N., Lis H. Lectins.—London; New York: Chapman and Hall, 1985.—114 p.
13. Хашимова З. С., Мангутова Ю. С., Сусло М. Э., Бекназарова Д. М., Леонтьев В. Б. Изучение мембранных белков хлопчатника с использованием моноклональных антител // Химия природ. соединений.—1994.—№ 1.—С. 292—296.
14. Нуриджанянц С. С., Кузнецова Н. Н., Барам Н. И., Ауелбеков С., Леонтьев В. Б., Исмаилов А. И., Асланов Х. А. Цитотоксическая активность госсипола и некоторых его производных // Тез. докл. IV Всесоюз. симпози. по фенольным соединениям.—Ташкент: Фан, 1982.—С. 33—34.
15. Iwamoto Yu., Robey F. A., Graf J., Sasaki M., Kleinman H. K., Yamada Y., Martin G. R. YIGSR, a synthetic laminin pentapeptide, inhibits experimental metastasis formation // Science.—1987.—238.—P. 1132—1134.
16. Stafstrom J. P., Staehelin L. A. The role of carbohydrate in maintaining extensin in an extended conformation // Plant. Physiol.—1986.—81.—P. 242—246.
17. Lamport D. T. A. Structure and function of plant glycoproteins // The Biochemistry of Plants / Ed. J. Preiss.—New York: Acad. press, 1980.—Vol. 3.—P. 501—541.
18. Хьюз Р. Гликопротеиды.—М.: Мир, 1985.—84 с.

УДК 612.085.4:577.112.853
Надійшла до редакції 31.07.2000