

Ю. К. Сыкулев, С. Ю. Тэтин, С. П. Атамась, Л. И. Магульская,
А. Ф. Панасюк, Г. В. Троицкий

КОНФОРМАЦИЯ ФИБРОНЕКТИНА ПРИ РАЗЛИЧНОЙ ИОННОЙ СИЛЕ РАСТВОРА ПО ДАННЫМ МЕТОДОВ КРУГОВОГО ДИХРОИЗМА И ТЕМПЕРАТУРНО-ПЕРТУРБАЦИОННОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ

Методами кругового дихроизма и температурно-пертурбационной дифференциальной спектрофотометрии исследована конформация фибронектина при различной ионной силе раствора. Полученные результаты указывают на то, что конформационный переход молекулы фибронектина, обусловленный увеличением ионной силы раствора, не сопровождается изменениями вторичной и третичной структур фрагментов полипептидных цепей, а связан с изменением относительного расположения и взаимодействий доменов в пространстве.

Введение. Фибронектин (Фн) — высокомолекулярный гликопротеин, обладающий широким спектром биологической активности. Он играет важную роль в формировании межклеточного матрикса и клеточной адгезии, а также присутствует в плазме крови и может связываться с различными биологически активными молекулами (для обзора см. [1, 2]). Молекула Фн обладает необычной структурой и состоит из целого ряда функциональных фрагментов, расположенных вдоль двух полипептидных цепей с молекулярной массой по 220 000, соединенных дисульфидными связями вблизи С-конца [3, 4]. Относительная ориентация полипептидных цепей белка в растворе зависит от ионной силы [5]. При низкой концентрации соли (0,04 М) молекула Фн принимает компактную конформацию, при которой фрагменты полипептидных цепей, тесно взаимодействуя друг с другом, определенным образом ориентированы в пространстве. Увеличение концентрации соли в растворе (0,4 М) приводит к протяженной конформации белка. При этом обе цепи имеют максимальную протяженность и не взаимодействуют друг с другом. Конформационный переход молекулы Фн, индуцированный изменением ионной силы, является обратимым. Ведущую роль в стабилизации компактной конформации Фн играют электростатические взаимодействия. Действительно, расположенные вдоль полипептидных цепей фрагменты молекул имеют последовательно чередующиеся положительные и отрицательные заряды [6]. Таким образом, возможны электростатические взаимодействия между фрагментами как в пределах одной молекулы, так и между разными молекулами Фн.

Методы кругового дихроизма (КД) и температурно-пертурбационной дифференциальной спектрофотометрии (ТПДС) дают возможность охарактеризовать особенности пространственной структуры белковых молекул [7]. Спектры КД в дальнем ультрафиолете несут информацию о состоянии вторичной структуры белка, в то время как анализ ТПДС и КД в ближнем ультрафиолете позволяет судить об изменениях третичной и четвертичной структур белковых молекул. ТПДС — метод регистрации разностных спектров, возникающих при сравнении двух идентичных образцов с различающейся температурой. Количественный анализ ТПДС дает возможность оценить среднюю жесткость микроокружения хромофоров, которую описывают как долю хромофорных остатков, пертурбируемых температурой.

В настоящей работе оба метода использованы для изучения возможных конформационных изменений Фн в зависимости от ионной силы раствора.

Материалы и методы. В качестве источника Фн использовали плазму крови нормальных доноров. Фн выделяли с помощью аффинной хроматографии на желатин-сефарозе, как описано в работе [8]. Желатин-сефарозу получали конъюгированием активированной CNBr сефарозы 4В («Pharmacia», Швеция) с желатином («Sigma»,

США) согласно инструкции фирмы «Pharmacia». Плазму крови центрифугировали (20000 g, 40 мин) и предварительно пропускали через колонку с сефарозой 4В («Pharmacia»), уравновешенную 0,05 М трис-НСI-буфером, рН 7,5, содержащим 10^{-4} М ЭДТА, 0,02 %-ный NaN_3 , 1 мМ ФМСФ (буфер А), для удаления компонентов плазмы крови, неспецифически связывающихся с сефарозой. Обработанную таким образом плазму наносили на колонку с желатин-сефарозой, уравновешенную буфером А, против силы тяжести (снизу вверх). После этого колонку промывали буфером А и снимали связанные с Фн белки плазмы 1 М NaCl. Затем элюировали низко- и высокоаффинный Фн 0,2 и 1 М DL-аргинином соответственно. Растворы 1 М NaCl, 0,2 и 1 М DL-аргинина («Reanal», ВНР) готовили на буфере А. Фракцию высокоаффинного Фн собирали и подвергали исчерпывающему диализу против буфера А для удаления аргинина. Чистоту полученного Фн контролировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ, 5 %) в присутствии DS-Na. Перед проведением измерений образцы Фн диализовали против 0,005 М Na-фосфатного буфера, рН 7,2. Ионную силу раствора изменяли, добавляя соответствующие количества 5 М раствора NaCl. Концентрацию Фн определяли спектрофотометрически, принимая $A=12,8$ (для 1 %-ного раствора в кювете с длиной оптического пути 1 см) [9].

Регистрацию спектров КД проводили на дихрографе фирмы «Jobin Yvon» Mark III (Франция) в 5 или 1 мм кварцевых кюветах при температуре 25 °С. Удельную эллиптичность рассчитывали по формуле:

$$\lambda = \frac{330 \cdot \Delta D \cdot M}{l \cdot C} \cdot \left[\frac{\text{град} \cdot \text{см}^2}{\text{моль}} \right],$$

где ΔD — разность оптического поглощения право- и левовращающих по кругу составляющих; M — средняя молекулярная масса одного аминокислотного остатка, принятая за 108; l — длина оптического пути, дм; C — концентрация белка, мг/мл.

ТПДС регистрировали на спектрофотометре Specord UVVIS («Karl Zeiss», ГДР) в 1 см кварцевых кюветах в интервале температур 9—45 °С. Количественный анализ ТПДС проводили, как ранее описано [10, 11]. Количество хромофоров в молекуле Фн определяли по [20].

Математическую обработку спектров КД и ТПДС проводили на микро-ЭВМ «Искра 226.3».

Результаты и обсуждение. На рис. 1 представлен спектр КД Фн в области длин волн 200—250 нм. Аналогичный спектр КД был получен ранее другими авторами [12—14]. Спектр КД в этой области характеризуется асимметрией пептидных хромофоров белка и содержит два хорошо разрешенных экстремума — отрицательный (213 нм) и положительный (227 нм). Небольшие величины удельной эллиптичности в дальнем ультрафиолете не обязательно свидетельствуют о низком содержании регулярных структур в молекуле Фн. Небольшая интенсивность спектра КД может быть связана с тем, что наблюдаемый спектр является суперпозицией нескольких спектров: спектра КД пептидных хромофоров и КД-спектров ароматических хромофоров белка. Такая точка зрения подтверждается двукратным увеличением $[\theta]_{213}$ при крайних щелочных значениях рН раствора Фн (рН 12) [13], когда ароматические аминокислотные остатки тирозина ионизируются и теряют оптическую активность. Кроме того, попытка моделировать КД-спектр Фн в дальнем ультрафиолете с помощью различных комбинаций известных спектров КД для пептидных хромофоров, включая КД-спектры неупорядоченного клубка, успеха не имела [12]. Как показал количественный анализ спектров КД и спектров в инфракрасной области Фн и его протеолитических фрагментов, основным типом регулярной вторичной структуры белка является β -форма, содержание которой составляет 30—35 % [15, 16]. Возможно, как и в случае иммуноглобулинов [14, 17], типичный для β -структуры КД-спектр Фн искажается противоположно направленным спектром ароматических хромофоров белка. Увеличение концентрации соли в растворе от 0,05 до 0,5 М не сопровождалось существенными изменениями спектра КД в области 200—

250 нм, а значит и изменением количества регулярных структур в молекуле Фн. Другими авторами показано, что повышение величины рН от 7,0 до 11,0 также не приводит к изменению спектра КД раствора Фн в этой области [12, 13]. Следует иметь в виду, что при низкой интенсивности спектра КД в дальнем ультрафиолете небольшие изменения в спектре могут не регистрироваться. Однако наиболее вероятно, что хорошо известный переход от компактной к протяженной конформации Фн при увеличении ионной силы раствора [5] не приводит к изменению регулярной структуры доменов молекулы.

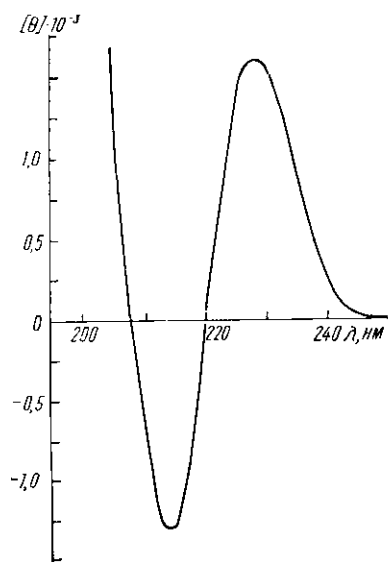


Рис. 1. Спектр КД Фн в дальнем ультрафиолете. Растворитель — 0,005 М фосфатный буфер, рН 7,2

Fig. 1. CD spectrum of fibronectin in the far ultraviolet region. Fibronectin was dissolved in 0.005 M phosphate buffer, pH 7.2

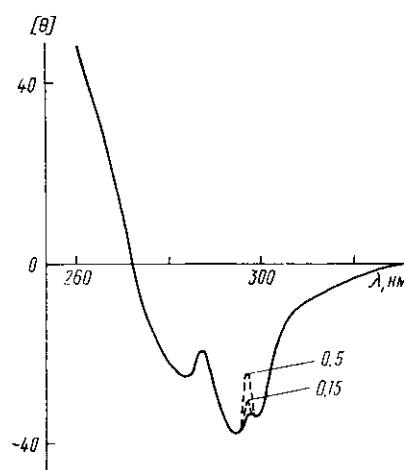


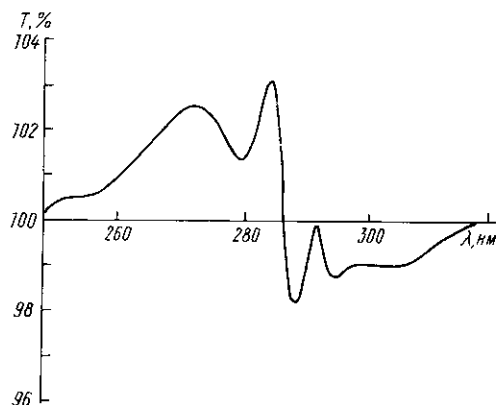
Рис. 2. Спектр КД Фн в ближнем ультрафиолете. Растворитель — 0,005 М фосфатный буфер, рН 7,2, и тот же буфер с добавлением 0,5 и 0,15 М хлорида натрия

Fig. 2. CD spectrum of fibronectin in near ultraviolet region. Fibronectin was dissolved in 0.005 M of phosphate buffer, pH 7.2 and in addition of 0.5 M, 0.15 M of NaCl

На рис. 2 приведен спектр КД Фн в ближнем ультрафиолете (260—360 нм). Эта область спектра характеризует ароматические хромофоры белка, находящиеся в асимметричном окружении. Спектр содержит три линии с отрицательными максимумами — 282, 291 и 299 нм. Линии спектра с максимумами 291 и 299 нм, по-видимому, обусловлены асимметричными триптофановыми остатками [12]. При изменении ионной силы раствора мы наблюдали незначительные изменения формы и интенсивности спектра КД в этой области, которые вряд ли могут свидетельствовать о существенном изменении микроокружения ароматических хромофоров. При увеличении рН раствора Фн изменения спектра КД в ближнем ультрафиолете носили выраженный характер. При этом наиболее существенные изменения наблюдались в области 282 нм, в то время как максимумы 291 и 299 нм практически оставались неизменными [12]. Наблюдаемый эффект связан, очевидно, с ионизацией тирозиновых остатков при щелочных значениях рН.

При хранении раствора Фн мы наблюдали рост интенсивности спектров КД как в коротко-, так и длинноволновой области, а также изменение формы спектров, которые были более выраженными в дальнем ультрафиолете. Приводимые в данной работе спектры КД получены для белка, хранящегося не более трех дней. Зависимость параметров спектров КД от времени хранения растворов Фн может быть объ-

яснена способностью этого белка к адгезии и полимеризации. Возможно, что в растворе молекулы Fn частично полимеризуются с образованием растворимых, регулярных, надмолекулярных структур, которые обладают сильной асимметрией. Такие структуры вряд ли являются стабильными и могут быстро образовываться и разрушаться. Поэтому



в растворе существует динамическое равновесие между мономерной и полимерной формами Fn. Величина дихроизма и форма спектра такого раствора может меняться с течением времени. Точная интерпретация и количественный анализ приведенных спектров КД затруднены из-за отсутствия адекватных моделей.

Рис. 3. ТПДС Fn, растворенного в 0,005 М фосфатном буфере, pH 7,2
Fig. 3. TPDS of fibronectin dissolved in 0.005 M of phosphate buffer, pH 7.2

Для исследования возможных конформационных изменений четвертичной структуры Fn при различной ионной силе раствора были изучены ТПДС Fn в тех же растворителях. На рис. 3 представлен вид типичного ТПДС Fn при физиологической концентрации NaCl (0,15 М) и разности температур 9—41 °С. Тирозиновый максимум ТПДС находится при 288,5 нм, триптофановый — при 294 нм. Имеется также длинноволновый максимум (ДМ) при 305 нм, который обнаруживается в

Результаты количественного анализа ТПДС Fn в растворах с различной ионной силой при pH 7,2 (0,005 М Na-фосфатный буфер)

Results of quantitative analysis of Fn TPDS in different ionic strength solution at pH 7.2 (0,005 M Na-phosphate buffer)

NaCl, М	Количество хромофоров, пертурбируемых температурой		
	Тирозин	Триптофан	ТД*
0,05	51,3	1,5	1,9
0,15	81,3	5,6	1,7
0,5	89,5	7,5	1,9
Общее количество хромофоров в молекуле **	171	51	—

* Депротонированные остатки тирозина [10]; ** определено, как описано в работе [20].

спектрах ТПДС и других белков [10]. Его происхождение связано с наличием в белках либо триптофановых остатков в неполярном окружении, либо депротонированных тирозиновых радикалов. Последний фактор может быть единственной причиной появления ДМ в ТПДС [10]. Результаты количественного анализа ТПДС Fn при различной концентрации NaCl в растворе представлены в таблице. Очевидно, что с увеличением ионной силы количество хромофоров, пертурбируемых температурой, значительно возрастает. Как указывалось выше, при увеличении ионной силы раствора молекула Fn принимает протяженную конформацию. Поэтому уменьшение жесткости микроокружения тирозиновых и триптофановых остатков Fn по данным ТПДС связано с этим конформационным переходом и является следствием изменения междоменных взаимодействий в молекуле. Возможность переориентации доменов молекулы в пространстве предполагает их способность к

относительно независимому вращению. Действительно, расчет времен вращательной коррекции Φ_n методом ЭПР спин-меток показал, что молекула Φ_n является гибкой, т. е. фрагменты молекулы способны относительно независимо перемещаться в пространстве [13].

Из приведенных в таблице данных следует, что уже при физиологической концентрации соли (0,15 М) число пертурбируемых хромофоров близко к таковому при 0,5 М NaCl в растворе. Это позволяет предположить, что Φ_n существует в протяженной конформации уже при физиологических значениях ионной силы. Однако при 0,5 М NaCl число пертурбируемых хромофоров достоверно выше такового при 0,15 М NaCl. Очевидно, увеличение ионной силы раствора свыше физиологической приводит либо к дальнейшему разворачиванию полипептидных цепей Φ_n , либо к увеличению числа молекул в развернутой конформации.

Число пертурбируемых остатков депротонированного тирозина не зависело от ионной силы раствора Φ_n (см. таблицу). Такой результат указывает на то, что ионизированные остатки тирозина находятся в глубине белковой глобулы и недоступны растворителю. Депротонированный тирозин обладает высокой свободной энергией и может участвовать в комплексах с переносом заряда [10]. Известно, что эти комплексы принимают непосредственное участие в функционировании активных центров сериновых протеаз [18]. В этой связи существенно, что протеолитические фрагменты Φ_n обладают ферментативной активностью и могут приводить к автолизу молекулы [19].

Таким образом, анализ полученных результатов свидетельствует о том, что конформационный переход Φ_n от компактной к развернутой форме не сопровождается изменениями вторичной и третичной структур фрагментов полипептидных цепей, а связан с изменением относительного расположения и взаимодействий доменов в пространстве. Очевидно, протяженная конформация Φ_n является наиболее оптимальной для функционирования молекулы этого белка.

Авторы благодарят С. Ю. Вениаминова (Ин-т белка АН СССР, Пущино) за полезную дискуссию и критические замечания во время обсуждения рукописи статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Vartiо T.* Fibronectin: multiple interactions assigned to structural domains // *Med. Biol.*—1983.—61, N 3.—P. 283—295.
2. *Yamada K. M.* Cell surface interactions with extracellular material // *Annu. Rev. Biochem.*—1983.—52.—P. 761—799.
3. *Petersen T. E., Skorstengaard K.* Primary structure // *Plasma fibronectin* / Ed. J. McDonagh.—New York; Basel: Marcel Dekker, 1985.—P. 7—29.
4. *Partial primary structure of bovine plasma fibronectin: three types of internal homology* / T. E. Petersen, H. C. Thøgersen, K. Skorstengaard et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1983.—80, N 1.—P. 137—141.
5. *Erickson H. P.* Structure seen by electron microscopy // *Plasma fibronectin* / Ed. J. McDonagh.—New York; Basel: Marcel Dekker, 1985.—P. 31—51.
6. *Hörmann H., Richter H.* Models for the subunit arrangement in soluble and aggregated plasma fibronectin // *Biopolymers.*—1986.—25, N 7.—P. 947—958.
7. *Демченко А. П.* Ультрафиолетовая спектрофотометрия и структура белков.—К.: Наук. думка, 1981.—208 с.
8. *Vuento M., Vaheri A.* Purification of fibronectin from human plasma by affinity chromatography under non-denaturing conditions // *Biochem. J.*—1979.—183, N 2.—P. 331—337.
9. *Mosesson M. W., Umfleet R. A.* The cold-insoluble globulin of human plasma. 1. Purification, primary characterization and relationship to fibrinogen and other cold-insoluble fraction components // *J. Biol. Chem.*—1970.—245, N 21.—P. 5728—5736.
10. *Атамась С. П., Тетин С. Ю., Троицкий Г. В.* Депротонирование тирозинных остатков как возможная причина появления длинноволнового максимума в температурно-пертурбационных дифференциальных спектрах белков // *Биофизика.*—1985.—30, № 6.—С. 967—970.
11. *Тетин С. Ю., Атамась С. П., Ефетов К. А.* Уточненный метод расчета температурно-пертурбационных дифференциальных спектров белков // V Всесоюз. конф. по спектроскопии биополимеров: Тез. докл.—Харьков, 1984.—С. 238.

12. Alexander S. S., Jr., Colonna G., Edelhoeh H. The structure and stability of human plasma cold-insoluble globulin // *J. Biol. Chem.*—1979.—254, N 5.—P. 1501—1505.
13. Lai Ch.-S., Tooney N. M., Ankel E. G. Structure and flexibility of plasma fibronectin in solution: electron spin resonance spin-label, circular dichroism and sedimentation studies // *Biochemistry*.—1984.—23, N 26.—P. 6396—6397.
14. Circular dichroic analysis of immunoglobulins in phylogenetic perspective / G. W. Litman, D. Frommel, A. Rosenberg, R. A. Good // *Biochim. et biophys. acta.*—1971.—236, N 3.—P. 647—654.
15. A study of the structure of fibronectin / V. E. Koteliansky, M. A. Glukhova, M. V. Bejanian et al. // *Eur. J. Biochem.*—1981.—119, N 3.—P. 619—624.
16. Distribution of secondary structure along the fibronectin molecule / S. Yu. Venyaminov, M. L. Metsis, M. A. Chernousov, V. E. Koteliansky // *Ibid.*—1983.—135, N 3.—P. 485—489.
17. Chose A. C., Jirgensons B. Circular dichroism studies of the variable and constant halves of kappa-type Bence-Jones proteins // *Biochim. et biophys. acta.*—1971.—251, N 1.—P. 14—20.
18. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты.— М.: Мир, 1982.—743 с.
19. Keil-Douha V., Planchetaut T. Potential proteolytic activity of human plasma fibronectin // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1986.—83, N 15.—P. 5377—5381.
20. Beaven G. H., Holiday E. R. Ultraviolet absorption spectra of proteins and amino acids // *Adv. Protein Chem.*—1952.—7.—P. 319—386.

Ин-т ревматологии АМН СССР, Москва
Крым. мед. ин-т, Симферополь

Получено 23.03.88

FIBRONECTIN CONFORMATION WITH DIFFERENT IONIC STRENGTH
OF THE SOLUTION AS DETERMINED BY CIRCULAR DICHROISM METHODS
AND THERMAL-PERTURBATION DIFFERENTIAL SPECTROSCOPY

Yu. K. Sykulev, S. Yu. Tetin, S. P. Atamas, [L. I. Matuiskaya],
A. F. Panasyuk, G. V. Troitsky

Institute of Rheumatology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow
Crimean Medical Institute, Simferopol

S u m m a r y

Conformation of plasma fibronectin was determined by circular dichroism and thermal perturbation differential spectroscopy with different ionic strength of the solution. It was found that conformational transition in fibronectin molecule, induced by an increase of the ionic solution strength was followed by no changes in secondary and tertiary structure of protein but was a result of changes in relative arrangement and domain-domain interaction in space.

УДК 547.963.32

А. И. Зинченко, И. Л. Попов, В. Н. Барай, И. А. Михайлопуло

**5'-ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ ПРИРОДНЫХ НУКЛЕОЗИДОВ
И ИХ МОДИФИЦИРОВАННЫХ АНАЛОГОВ
ИНТАКТНЫМИ КЛЕТКАМИ ERWINIA HERVICOLA:
СПЕЦИФИЧНОСТЬ В ОТНОШЕНИИ ДОНОРА
ФОСФАТНОЙ ГРУППЫ И АКЦЕПТОРА**

Изучена нуклеозидфосфотрансферазная реакция, катализируемая интактными клетками *Erw. herbicola* 47/3. Показано, что среди исследованных доноров фосфатной группы при фосфорилировании аденозина до АМР наиболее эффективным оказался п-нитрофенилфосфат. Эффективность нуклеозидов рибо-ряда в качестве акцепторов фосфата убывает в ряду гуанозин > уридин > риботимидин > цитидин > аденозин > инозин > ксантозин. 2'-Дезоксинуклеозиды оказались менее эффективными акцепторами фосфатной группы в сравнении с соответствующими рибонуклеозидами.

Введение. Нуклеозид-5'-монофосфаты представляют интерес для физико-химической биологии, медицины и пищевой промышленности. В настоящее время существуют следующие принципиальные возможности