

О. Ю. Скоробогатов, І. Ю. Жуков, З. Ю. Ткачук

2',5'-олігоаденілати змінюють вторинну структуру та функціональну активність білка S100A1 людини*(Представлено членом-кореспондентом НАН України Д. М. Говоруном)*

Наведено результати дослідів, що свідчать про здатність 2',5'-олігоаденілатів приєднуватися до білка S100A1 людини *in vitro*, внаслідок чого змінюється його вторинна структура. Така просторова реструктуризація, в свою чергу, впливає на функціональний профіль білка. За допомогою спектроскопічних методів — флуоресцентної та спектроскопії кругового дихроїзму, вдалося зафіксувати незначні, але достовірні зміни в процентному складі елементів вторинної структури білка в результаті взаємодії олігоаденілатів з білком, а також зміни функціональної активності, а саме — підвищення константи зв'язування іонів Ca^{2+} приблизно на порядок. На нашу думку, *in vivo* 2',5'-олігоаденілати здатні взаємодіяти і з іншими білками, не тільки Ca^{2+} -зв'язуючими, впливаючи при цьому на їх активність.

Трифосфорильовані 2',5'-олігоаденілати синтезуються в клітинах живих організмів завдяки активності ферменту 2',5'-олігоаденілатсинтетази. Їх активність пов'язують із цілим рядом біологічних процесів, таких як поділ клітин, апоптоз, а також із розвитком та патогенезом деяких хвороб — діабетом та атеросклерозом [1, 2].

В клітині трифосфорильовані 2',5'-олігоаденілати виявляють низьку стабільність — вони піддаються ферментативному розщепленню ферментами фосфорилазами, в результаті чого з них утворюються дефосфорильовані, або “корові”, 2',5'-олігоаденілати. Ці сполуки мають кардіопротекторні властивості, а також можуть виступати як інгібітори відторгнення тканин у результаті трансплантації [3].

Білок S100A1 являє собою невеликий негативно заряджений Ca^{2+} гомодимер масою 10,5 кДа. Відомо, що рівень його експресії змінюється при неврологічних розладах та деяких типах раку, виступаючи, крім того, як один з основних маркерів багатьох серцевих розладів [4, 5]. Ми ставили за мету дослідити можливість взаємодії між апоформою білка S100A1 людини та 2',5'-олігоаденілатами *in vitro* і визначити зміни в композиції вторинної структури білка та його функціональної активності.

Матеріали та методи. Синтез 2',5'-олігоаденілатів. Природний (2',5'-Аз-нат) та епоксид-модифікований (2',5'-Аз-епокси) олігоаденілати синтезували, застосовуючи фосфотріетеровий метод [6] (рис. 1).

Надекспресія, виділення та очищення апоформи рекомбінантного білка S100A1. Синтетичний ген, що кодує білок S100A1 людини, клонували в плазмідний вектор pET-30a+ і експресували в культурі *E. coli*. Бактеріальні клітини вирощували при 37 °С в середовищі LB. Експресію індукували додаванням 0,4 мМ IPTG при $\text{OD}_{600} = 0,8$. Бактеріальну культуру вирощували протягом 2 год після цього. Білок S100A1 людини виділяли, застосовуючи класичний метод осадження сульфатом амонію [7, 8] з подальшим очищенням за допомогою оберненофазової HPLC. Кінцевий продукт ідентифікували за допомогою методу мас-спектрометрії Q-TOF. Концентрацію в розчині встановлювали за величиною його абсорбції на довжині хвилі 280 нм.

© О. Ю. Скоробогатов, І. Ю. Жуков, З. Ю. Ткачук, 2015

Таблиця 1. Зміни в процентному вмісті елементів вторинної структури білка S100A1 при взаємодії з 2',5'-Аз-нат або 2',5'-Аз-епокси

Концентрація олігоаденілатів, мкМ	2',5'-Аз-нат (%)			2',5'-Аз-епокси (%)		
	α - спіралі	β - повороти	Невпорядковані елементи	α - спіралі	β - повороти	Невпорядковані елементи
0	54,5	13,7	21,1	54,5	13,7	21,1
8	53,2	13,9	21,7	52,9	13,9	21,8
24	50,2	14,2	23,1	51,9	14,0	22,4
40	49,8	14,3	23,4	50,6	14,2	23,0
56	48,8	14,4	23,9	49,6	14,3	23,5

Спектроскопія кругового дихроїзму. Дальні ультрафіолетові КД-спектри реєстрували в діапазоні 260–200 нм на спектрополяриметрі Jasco J-815 CD при 298 К в кюветі з довжиною оптичного шляху 2 мм. Для вимірів 8 мкМ людського білка апо-S100A1 розчиняли в буфері, що містить 5 мМ *трис*-HCl і 100 мМ NaCl (pH 7,5). Концентрацію людського S100A1 в розчині контролювали спектрофотометрично шляхом вимірювання його УФ-поглинання на довжині хвилі 280 нм з використанням коефіцієнта екстинкції $10200 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ на спектрофотометрі Cary Eclipse. Титрування проводили шляхом додавання невеликих кількостей концентрованих розчинів 2',5'-Аз-нат або 2',5'-Аз-епокси, приготованих у тому ж буфері. Кінцева концентрація олігоаденілатів становила 56 мкМ.

Значення еліптичності $[\theta]$ комплексу олігоаденілат — апо-S100A1 було поправлено на відповідні значення для 2',5'-Аз-нат або 2',5'-Аз-епокси та переведено в одиниці молярної еліптичності $[\theta]_{\text{molar},\lambda}$ згідно з рівнянням

$$[\theta]_{\text{molar},\lambda} = \frac{100\theta_{\lambda}}{md},$$

де θ_{λ} — значення еліптичності (град) на довжині хвилі λ ; m — молярна концентрація білка в розчині; d — довжина оптичного шляху кювети, см. Внесок елементів вторинної структури білка (%) було визначено за допомогою програми CDNN [9].

Флюоресцентна спектроскопія. Спектри флюоресценції було записано на спектрофлюориметрі Varian. Флюоресценцію збуджували на довжині хвилі 280 нм, спектр емісії фіксували в діапазоні довжин хвиль 290–400 нм. До 2 мл розчину білка, концентрацією 8 мкМ, додавали концентрований розчин 2',5'-Аз-нат або 2',5'-Аз-епокси в еквімолярній концентрації та титрували концентрованим розчином CaCl_2 , концентрацією 50 мМ, у кварцовій кюветі з довжиною оптичного шляху 1 см.

Розрахунок констант зв'язування. Для розрахунку констант зв'язування використовували значення максимумів емісії на довжині хвилі 347 нм при титруванні розчину білка CaCl_2 . Отримані величини використовували для побудови залежності величини максимуму інтенсивності флуоресценції від концентрації іонів Ca^{2+} в координатах Хілла, після чого розраховували значення констант зв'язування [10].

Результати та обговорення. Отримані експериментальні дані свідчать про виникнення конформаційних змін у структурі білка S100A1 при зв'язуванні 2',5'-Аз-нат або 2',5'-Аз-епокси, що було показано за допомогою спектроскопії кругового дихроїзму (рис. 2).

Зміни процентного внеску спіральних елементів вторинної структури не були значними — приблизно 6%. Імовірно, більша їх частина перетворюється на елементи, які не мають постійної вторинної структури (табл. 1).

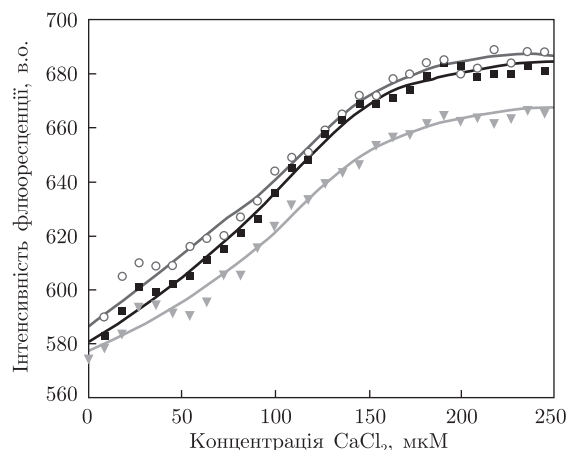


Рис. 3. Криві титрування білка S100A1 (заповнені квадрати) розчином CaCl_2 за наявності 2',5'-А₃-нат (заповнені трикутники) та 2',5'-А₃-епокси (незаповнені кола) у концентрації 8 мкМ

Крім того, нами було показано, що 2',5'-А₃ здатні змінювати спорідненість S100A1 до іонів Ca^{2+} . Такого висновку вдалося дійти, проаналізувавши криві титрування білка олігоаденілатами (рис. 3).

Для того щоб з'ясувати, чи це відповідає дійсності, ми провели титрування S100A1 розчинами 2',5'-А₃ та записали зміни в спектрах флуоресценції, що при цьому виникають. Цікаво, що при додаванні 2',5'-А₃-епокси було зафіксовано збільшення величини константи зв'язування іонів Ca^{2+} порівняно з такою при використанні 2',5'-А₃-нат — $2,4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ та $5,3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ відповідно. Сам по собі S100A1 зв'язує іони Ca^{2+} з константою $1,4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$.

Таким чином, ми можемо відзначити той факт, що 2',5'-А₃ здатні змінювати структуру білка S100A1, що, в свою чергу, призводить до змін його функціональної активності — збільшення спорідненості до іонів Ca^{2+} . Ми вважаємо, що такі неістотні на перший погляд конформаційні зміни свідчать про наявність “м'якого” впливу на конформацію та функціональну активність білка, тобто за умов неспецифічного зв'язування — із невисокою величиною константи асоціації — зазнає впливу функціональний профіль біологічної макромолекули.

1. Player M. R., Torrence P. F. The 2-5A system: modulation of viral and cellular processes through acceleration of RNA degradation // *Pharmacol. Ther.* – 1998. – **78**. – P. 55–113.
2. Silverman R. A scientific journey through the 2-5A/RNase L system // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2007. – **18**. – P. 381–388.
3. Tkachuk Z., Kvasnyuk E., Matsuka G., Mikhailopulo I. (2'-5') oligoadenylate analogues useful as inhibitors of host-vs.-graft response // *Patent US 5571799*. – Publ. 05.11.96.
4. Most P., Remppis A., Pleger S. et al. S100A1: a novel inotropic regulator of cardiac performance. Transition from molecular physiology to pathophysiological relevance // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2007. – **293**. – P. 568–577.
5. Zimmer D., Chaplin J., Baldwin A., Rast M. S100-mediated signal transduction in the nervous system and neurological diseases // *Cell. Mol. Biol.* – 2005. – **51**. – P. 201–214.
6. Duney I. Ya., Dubey L. V. Synthesis of (2'-5')-triadenylates and their analogues using O-nucleophilic catalysis of internucleotide coupling reaction // *Biopolym. and Cell.* – 2007. – **23**, No 6. – P. 538–544.
7. Dixon M., Webb E. C. Enzyme fractionation by salting-out: a theoretical note // *Adv. Protein Chem.* – 1961. – **16**. – P. 197–219.
8. Falconer J. S., Jenden D. J., Taylor D. B. The application of solubility measurements to the study of complex protein solutions and to the isolation of individual proteins // *Discuss. Faraday Soc.* – 1953. – **13**. – P. 40–46.

9. Böhm G., Muhr R., Jaenicke R. CDNN: quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks // Protein Eng. – 1992. – **5**. – P. 191–195.
10. Lenarčič Živković M., Zaręba-Kozioł M., Zhukova L. et al. Post-translational S-nitrosylation is an endogenous factor fine tuning the properties of human S100A1 protein // J. Biol. Chem. – 2012. – **287**, No 48. – P. 40457–40470.

Інститут молекулярної біології і генетики
НАН України, Київ

Надійшло до редакції 20.11.2014

А. Ю. Скоробогатов, И. Ю. Жуков, З. Ю. Ткачук

2',5'-олигоаденилаты изменяют вторичную структуру и функциональную активность белка S100A1 человека

Приведены результаты опытов, которые свидетельствуют о способности 2',5'-олигоаденилатов присоединяться к белку S100A1 человека *in vitro*, вследствие чего изменяется его вторичная структура. Такая пространственная реструктуризация, в свою очередь, влияет на функциональный профиль белка. С помощью спектроскопических методов — флуоресцентной и спектроскопии кругового дихроизма, удалось зафиксировать незначительные, но достоверные изменения в процентном составе элементов вторичной структуры белка в результате взаимодействия олигоаденилатов с белком, а также изменения функциональной активности, а именно — повышение константы связывания ионов Ca^{2+} примерно на порядок. По нашему мнению, *in vivo* 2',5'-олигоаденилаты способны взаимодействовать и с другими белками, не только Ca^{2+} -связывающими, влияя при этом на их активность.

O. Yu. Skorobogatov, I. Yu. Zhukov, Z. Yu. Tkachuk

2',5'-oligoadenylates change the secondary structure and the functional activity of human S100A1 protein

The results, which demonstrate the ability of 2',5'-linked oligoadenylates to bind human S100A1 protein *in vitro*, thus causing alterations of its secondary structure, are presented. Such dimensional reorganization, in turn, affects protein's functional activity profile. With the use of spectroscopy methods, fluorescence, and circular dichroism, we have managed to detect small, but reliable changes in protein's secondary structure content upon the interaction with oligoadenylates, as well as alterations of its functional activity — the value of Ca^{2+} binding constant was shown to be increased. In our opinion, *in vivo*, 2',5'-linked oligoadenylates interact with many other proteins, not only Ca^{2+} binding, thus affecting their activity.