

---

## LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

---

### LIMITOVANÁ A PULZNÍ PROTEOLÝZA LIDSKÉHO HEMOGLOBINU

VOJTĚCH JURGA a MILAN KODÍČEK

Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-  
technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha  
Vojtech.Jurga@vscht.cz

Došlo 12.9.09, přijato 25.9.09.

---

Klíčová slova: hemoglobin, pulzní proteolýza, limitovaná  
proteolýza

---

#### Úvod

Studium vlastností mutantních forem bílkovin je prováděno značným množstvím překážek. Již sama purifikace nemutované bílkoviny je často náročný proces, jehož úspěch není vždy zaručen; chceme-li se navíc zabývat jeho mutanty, je nutné být připraven na to, že záměna jedné aminokyseliny může vést ke změnám charakteristik molekuly ovlivňujícími podmínky pro její úspěšnou izolaci. Pro srovnání mutantních forem jedné bílkoviny je tedy vhodné mít k dispozici metody umožňující práci s proteinem v hrubém buněčném extraktu, jejichž využití slibuje významnou časovou a finanční úsporu. Takových metod však není mnoho. Komplexností studovaného roztoku jsou diskvalifikovány metody spektroskopické, ze stejného důvodu lze jen velmi opatrně interpretovat a diskutovat data popisující katalytickou aktivitu enzymu, neboť nelze vyloučit přítomnost nízkomolekulárních látek a proteinů působících jako efekторы. Jako jedna z mála vhodných metod se jeví pulzní proteolýza<sup>1</sup>, určená ke studiu konformační stability molekul bílkovin.

Pulzní proteolýza využívá ke stanovení stability proteinu fakt, že sbalený protein je vůči proteolýze odolnější než protein rozbalený. Protein je rozpuštěn v řadě roztoků o vzrůstající koncentraci denaturačního činidla a po nastolení konformační rovnováhy je podroben enzymové hydrolyze nespecifickou proteasou (thermolysin, EC 3.4.24.27), která je krátkodobě schopna katalýzy i za silně denaturujících podmínek. Doba proteolytického pulzu umožňuje štěpení pouze denaturovaného podílu studovaného proteinu, zatímco sbalené molekuly zůstávají zachovány. Po následné elektroforetické analýze roztoků je vyhodnocena optická densita zóny, odpovídající neštěpenému proteinu. Tato veličina je vynesena proti koncentraci denaturačního

činidla za zisku obvykle sigmoidní denaturační křivky, která bývá obrazem jednostupňového denaturačního kooperativního přechodu. Mírou stability proteinu je koncentrace denaturačního činidla v inflexním bodě této křivky. Rozšíření této metody o Western blot s imunochemickou detekcí a následnou kvantifikací signálu slibuje možnost srovnání konformační stability bílkovin v hrubých buněčných extraktech.

Metoda limitované proteolýzy spočívá ve štěpení výrazného přebytku studovaného proteinu specifickou proteasou (trypsin, EC 3.4.21.4), během kterého jsou z reakce v pravidelných intervalech odebrány alikvotní podíly, v nichž je štěpení zastaveno. Po přidavku vnitřního standardu jsou všechny podíly analyzovány hmotnostní spektrometrií. Při vyhodnocení spekter jsou porovnávány relativní intenzity signálu jednotlivých peptidů v závislosti na době štěpení.

Nejčastější forma lidského hemoglobinu, HbA, je tetramer složený ze dvou polypeptidů  $\alpha$ -globinu od délce 141 aminokyselin a dvou polypeptidů  $\beta$ -globinu o délce 146 aminokyselin. Oba typy řetězců tvoří osm  $\alpha$ -helikálních segmentů, které následně zaujímají globulární terciární strukturu. Svinuté helixy tvoří kapsu, ve které je vázána molekula hemu. Tyto polypeptidy jsou prakticky totožné svým prostorovým uspořádáním, byť se jejich aminokyselinové složení liší. Přičteme-li nebývalou snadnou dostupnost, jeví se hemoglobin jako vhodný model pro metody určené ke studiu vlivu záměny aminokyselin na stabilitu proteinu.

#### Experimentální část

##### Pulzní proteolýza

Z lidských erytrocytů byl izolován hemoglobin ve formě 3% roztoku (w/w), resp. globin, renaturovaný v roztoku o koncentraci 0,66 % (w/w)<sup>2</sup>. S využitím jednoho z těchto roztoků, 8 M roztoku močoviny a 1 M CaCl<sub>2</sub> byly připraveny roztoky koncentrační řady močoviny o objemu 100  $\mu$ l, koncentraci proteinu 0,5 g dm<sup>-3</sup> a koncentraci CaCl<sub>2</sub> 10 mmol dm<sup>-3</sup>. Pro ustavení rovnováhy mezi sbaleným a denaturovaným stavem proteinu byly roztoky ponechány při laboratorní teplotě přes noc.

Do každého z roztoků byly poté přidány 2  $\mu$ l roztoku thermolysinu (10 g dm<sup>-3</sup> v 2,5 M NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>), tedy v poměru thermolysin: hemoglobin 2:5 (w/w). Reakce probíhala po dobu 60 s za laboratorní teploty a byla zastavena přenesením 15  $\mu$ l vzorku do předem připravených 5  $\mu$ l roztoku EDTA (50 mmol dm<sup>-3</sup>, pH 8). Takto získaný roztok byl poté rozdělen elektroforeticky (SDS-PAGE, 15% polyakrylamid,  $U_{konst} = 160$  V), po obarvení Coomassie Brilliant Blue R-250 a digitalizaci elektroforeo-

gramu byla optická denzita jednotlivých zón vyhodnocena s využitím programu ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)<sup>1</sup>.

### Limitovaná proteolýza

Vodný 0,66% roztok lidského globinu byl ředěn 0,05 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  na výslednou koncentraci globinu  $1,85 \text{ g dm}^{-3}$ . Po spuštění reakce, probíhající při teplotě  $37^\circ\text{C}$ , přidávkem trypsinu ( $1 \text{ g dm}^{-3}$  v  $50 \text{ mM NH}_4\text{HCO}_3$ ) ke globinu v poměru 1:500 (w/w) byly v daných časových intervalech odebrány podíly o objemu  $9 \mu\text{l}$ , ve kterých bylo štěpení zastaveno přidáním  $1 \mu\text{l}$  5% kyseliny trifluoroctové. Ke každému z takto získaných roztoků byly jako vnitřní standard přidány  $2 \mu\text{l}$  vodného roztoku slepičího lysozymu (EC 3.2.1.17;  $1,6 \text{ g dm}^{-3}$ ).

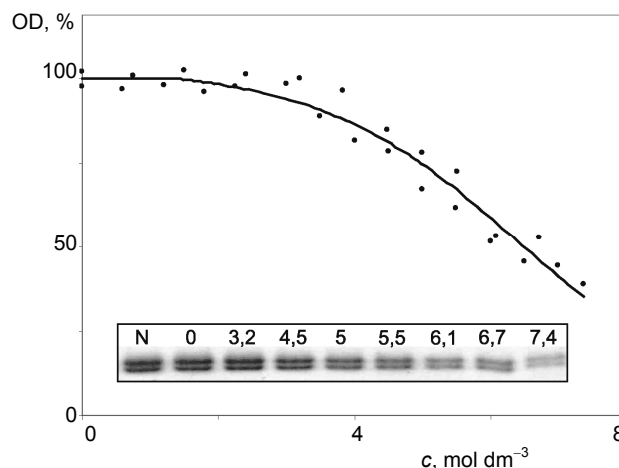
Z každého roztoku, získaného postupem popsaným v předchozím odstavci, byl  $1 \mu\text{l}$  smíchán s  $1 \mu\text{l}$  roztoku 2,5-dihydroxybenzoové kyseliny (DHB,  $20 \text{ mg ml}^{-1}$  v 30% acetonitrilu a 0,1% trifluoroctové kyselině) a po vyschnutí analyzován v reflektorovém režimu hmotnostního spektrometru.  $1 \mu\text{l}$  každého z roztoků byl také smíchán s 3,5-dimethoxy-4-hydroxyisochlorogenicovou kyselinou (SA, nasycený roztok v 30% acetonitrilu a 0,1% trifluoroctové kyselině) a po vyschnutí analyzován v lineárním režimu hmotnostního spektrometru. Všechna měření probíhala na hmotnostním spektrometru Biflex IV firmy Bruker Daltonics GmbH při napětí  $U_{\text{konst}} = 19 \text{ kV}$  a tlaku  $<9 \cdot 10^{-5} \text{ Pa}$  s využitím externí kalibrace standardem mh-pepmix (vzorky s DHB) a mh-protmix I (vzorky s SA). Získaná spektra byla zpracována programem mMass (v2.4.0, <http://mmass.biographics.cz>) a vyhodnocena jak jeho prostřednictvím, tak s využitím vyhledávacího nástroje Mascot PMF.

## Výsledky a diskuse

### Pulzní proteolýza

Metodou pulzní proteolýzy byla potvrzena dlouho známá skutečnost, že odstraněním hemové skupiny z molekuly hemoglobinu je zbylý polypeptidový řetězec značně destabilizován. Zatímco koncentrace močoviny v inflexním bodě sigmoidní závislosti poklesu procentuálního zastoupení nativního hemoglobinu byla stanovena na  $c_{\text{inf}} = 6,4 \pm 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  (obr. 1), globin je za podmínek metody zcela štěpen i bez přítomnosti denaturačního činidla. Na základě potřeby proměřit zmíněnou závislost i pro globin byl testován poměr koncentrací thermolysin:globin 1:5 (w/w), výsledky však nebyly reprodukovatelné.

Jak je patrné z grafu na obr. 1, za použitých podmínek nedochází k úplnému rozštěpení hemoglobinu. Proto jsme použili roztok močoviny o koncentraci  $10 \text{ mol dm}^{-3}$  (možnost proměřit závislost na  $0\text{--}9 \text{ mol dm}^{-3}$  močoviny) a byl testován zvýšený poměr thermolysin:hemoglobin (3:5, w/w) a prodloužená doba štěpení (90 s). Tyto úpravy publikovaného protokolu<sup>1</sup> však nevedly ke kýženému



Obr. 1. Procentuální zastoupení neštěpeného hemoglobinu po proteolytickém pulzu v závislosti na koncentraci močoviny s ukázkou elektroforeogramu po aplikaci pulzní proteolýzy na lidský hemoglobin; číselné označení jednotlivých drah odpovídá koncentraci močoviny ve vzorku v  $\text{mol dm}^{-3}$ , N označuje neštěpenou kontrolu. Optické denzity zóny neštěpeného hemoglobinu v SDS-PAGE gelu odpovídá 100 %

výsledku, navíc naměřené body vykazovaly větší experimentální rozptyl. Zdá se, že vysoká koncentrace močoviny již vede k inhibici katalytické aktivity thermolysin, zatímco prodloužení reakční doby či zvýšení poměru proteasy ke studovanému proteinu umožňuje i štěpení nedenaturovaného podílu tohoto proteinu.

Metoda pulzní proteolýzy poskytuje výsledky dobře korelující s dříve provedenými měřeními cirkulárního dichroismu<sup>3</sup>. Oproti jiným metodám studia konformační stability proteinu je úspornější vzhledem k množství použitého materiálu a náročnosti na laboratorní vybavení, perspektivní je však zejména možnost využití pro studium proteinů v hrubém extraktu z buněčného lyzátu, případně porovnání stability několika proteinů během jedné analýzy.

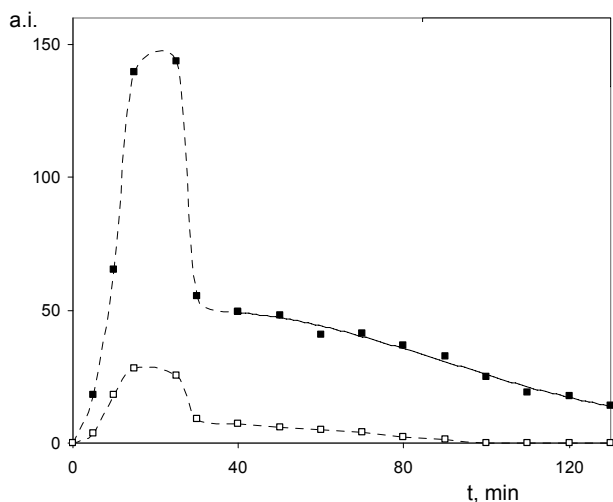
Pro umožnění enzymové hydrolýzy peptidové vazby musí daný úsek substrátové bílkoviny interagovat s aktivním místem proteasy, proto je zpravidla nutné, aby zaujal pozměněnou – nataženou – konformaci. Některé proteasy (např. trypsin) jsou schopny prostřednictvím vzájemných interakcí navodit lokální přizpůsobení struktury štěpeného řetězce, přičemž  $\alpha$ -helikální úseky jsou tomuto částečněmu rozbalení více přístupné než  $\beta$ -struktury<sup>4</sup>. Thermolysin však pro štěpení potřebuje úsek minimálně 11-ti aminokyselinových zbytků v rozvolněné konformaci<sup>5</sup>. Právě denaturace vlivem rostoucí koncentrace močoviny vede ke zpřístupnění polypeptidových řetězců.

Při použití pulzní proteolýzy je však nutné zohlednit také přirozený výskyt flexibilních oblastí v molekulách bílkovin. Tyto úseky mohou v konformaci proteinu představovat relativně nevýznamné oblasti snížené stability, mohou však také zastávat důležité funkční úlohy, např.

raménko spojující katalytickou a autoinhibiční doménu enzymu; lze je identifikovat metodami limitované proteolýzy<sup>6</sup>. V bílkovinných strukturách získaných rentgenovou krystalografií odpovídají oblastem s větším B-faktorem, nejistou elektronovou hustotou a větším rozptylem hodnot úhlů vazeb v peptidovém řetězci<sup>7</sup>. Pulzní proteolýza proto ve skutečnosti nesrovnává jen zastoupení nativní a denaturované formy proteinu, ale při nízkých koncentracích močoviny i zastoupení molekul sbalených a lokálně či globálně rozvolněných. Z výše zmíněného a definice denaturace jako podstatné změny prostorového uspořádání molekuly proteinu, při níž dochází ke ztrátě jejích biologických funkcí<sup>8</sup>, plyne, že nativní konformace nemusí nutně být rigidně sbalená a proteolyticky odolná. Je proto nutné přistupovat k interpretaci získaných dat s patřičnou obezřetností, zejména pak při srovnávání konformační stability strukturálně nepodobných bílkovin.

### Limitovaná proteolýza

Z přítomnosti flexibilních úseků a lokálních fluktuací struktury bílkovin naopak těžší metoda limitované proteolýzy. Tato metoda byla použita k porovnání míst prvního štěpení a nejstabilnějších fragmentů lidského  $\alpha$ - a  $\beta$ -globinu; v daném časovém intervalu nebylo pozorováno dostatečně spolehlivě interpretovatelné štěpení nativního hemoglobinu. Vzdor značné strukturální analogii obou polypeptidů se jejich nejstabilnější oblasti značně liší jak svou polohou v sekvenci, tak prostorovým uspořádáním. Daleko nejdolnější vůči proteolýze trypsinem se jeví fragment  $\alpha$ :Leu91-Lys139, tedy helixy G a H  $\alpha$ -globinu, které jsou v hmotnostním spektru proteolytické směsi detegovatelné i po více než dvou hodinách. Nejstabilnější úsek  $\beta$ -globinu,  $\beta$ :Val67-Lys132, nevykazuje srovnatelnou stabi-



Obr. 2. Relativní intenzity signálu peptidů (a.i.) vznikajících trypsinovou hydrolýzou lidského globinu v závislosti na čase; ■  $\alpha$ :Leu91-Lys139, □  $\beta$ :Val67-Lys132

tu (obr. 2). První štěpenou vazbou v lidském  $\alpha$ -globinu je Arg31-Met32; první štěpená vazba polypeptidu  $\beta$ -globinu, Lys132-Val133, spadá naopak do oblasti nejvyšší proteolytické odolnosti  $\alpha$ -globinu.

Proteolytickou odolnost peptidu  $\alpha$ :Leu91-Lys139 zdůvodňujeme stericky umožněnou interakcí antiparalelních helixů G a H. Postranní řetězec lysinu na pozici 99 směřuje přímo do nukleofilního jádra tvořeného postranními řetězci serinu 133 a dvou threoninů v pozicích 134 a 137. Současně se v ohybu spojujícím tyto dva helixy setkávají postranní řetězce hydrofobních aminokyselin<sup>9</sup>. Tyto interakce vedou ke snížené flexibilitě dané struktury a brání tak přizpůsobení štěpných míst interakcím s proteasou. Helixy G a H v lidském  $\beta$ -globinu žádnou podobnou interakci stericky neumožňují, pravděpodobně také proto se může preferenční místo hydrolýzy trypsinem nacházet v helixu H (Lys132-Val133) a relativní intenzita signálu nejstabilnějšího fragmentu tohoto polypeptidu nedosahuje srovnatelných hodnot.

Hydrolýza  $\alpha$ -řetězce lidského hemoglobinu pak probíhá tak, že zatímco fragmenty C-terminální části polypeptidu (vznikající odštěpením v oblasti Lys90-Val93) si zachovávají strukturální integritu po delší dobu, štěpitelná místa v úseku Val1-Lys90 jsou pro katalýzu snadno dostupná a vznikající peptidy jsou ihned štěpeny dále. K hydrolýze stabilních fragmentů dochází až po rozštěpení naprostě většiny ostatních (dostupných) štěpitelných míst.

### Závěr

Metodou pulzní proteolýzy byla proměřena denaturační křivka lidského hemoglobinu v závislosti na koncentraci močoviny. Metoda se jeví jako jednoduchá a levná cesta k porovnání stability proteinů podobné délky, pročež ji lze doporučit zejména ke studiu enzymopatií, způsobených bodovými mutacemi a tedy expresí chybných proteinů. Velmi slibná je možnost využití pro nepurifikovaný protein, čímž se lze vyhnout časově i finančně náročným krokům přípravy vzorku.

Metoda limitované proteolýzy je opět velmi jednoduchá a poměrně levná. Poskytuje cenné informace o vlivu aminokyselinového složení na strukturu proteinu a jeho stabilitu, kdy záměna jedné aminokyseliny může vést například k zeslabení či zesílení nekovalentních interakcí mezi doménami a tudíž ke změně pohyblivosti a snížené funkci mutantního proteinu. Metoda může sloužit také jako doprovodné měření potvrzující výsledky strukturálních analýz.

Jedním z dalších metodických cílů je propojení obou metod, tzn. limitovaná proteolýza roztoků proteinu v koncentrační řadě denaturačního činidla, které i přes očekávané problémy s interpretací slibuje poměrně komplexní informaci o vlastnostech struktury analyzovaného proteinu.

## LITERATURA

1. Park C., Marqusee S.: *Nat. Methods* 2, 207 (2005).
2. Rossi-Fanelli A., Antonini E., Caputo A.: *Biochim. Biophys. Acta* 30, 608 (1958).
3. Kodíček M., Vodrážka Z.: *Collection. Czechoslov. Chem. Commun.* 41, 1811 (1976).
4. Hubbard S. J.: *Biochim. Biophys. Acta* 1382, 191 (1998).
5. Park C., Marqusee S.: *J. Mol. Biol.* 343, 1467 (2004).
6. Kery V., Poneleit L., Kraus J. P.: *Arch. Biochem. Biophys.* 355, 222 (1998).
7. Fontana A., Polverino de Laureto P., De Filippis V., Scaramella E., Zamboni M.: *Folding Des.* 2, 17 (1997).
8. [http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-002\\_v1/ebook.obsah.htm](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/ebook.obsah.htm), staženo 11. září 2009.
9. <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1HGA>, staženo 11. září 2009.

**V. Jurga and M. Kodíček** (*Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Limited and Pulse Proteolysis of Human Hemoglobin**

Using the title methods, the denaturation of human hemoglobin and its subunits was studied, the ultimate goal being to assess the applicability of both methods in research on pathogenic protein mutations. Pulse proteolysis affords a denaturation curve of hemoglobin; the method is easy to perform showing good repeatability and low sample consumption. Using the limited proteolysis followed by MALDI-TOF MS, we studied proteolytic resistance of fragments of  $\alpha$ - and  $\beta$ -globin chains. Despite their nearly identical structure, the differences in amino acid compositions of both polypeptides affect the conformational stability of their tryptic products. Both methods are able to provide valuable information on protein stability, their main advantage being low cost and simplicity.