

Одержання і властивості глікофорину плазматичної мембрани еритроцитів курей

Т. В. Стасик*, М. Д. Луцик-Кордовський

Відділення регуляторних систем клітини Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України 290005, Львів, вул. Драгоманова, 14/16

Одержано глікопротеїни плазматичних мембран еритроцитів курей шляхом екстракції ізольованих мембран сумішшю хлороформ — ізопропанол. Методом електрофорезу в пластині поліакриламідного гелю з DS-Na виявлено основні Шифф-позитивні фракції з молекулярною масою (м. м.) 28, 55, 130, 140, 155 кДа, а також мінорні фракції з м. м. 22, 40, 80 кДа. Специфічні до O-глікозидних ланцюгів лектини арахісу і хлібного дерева зв'язувалися з зонами 28 і 55 кДа. За допомогою препаративного електрофорезу одержано в чистому стані сіалоглікопротеїни 28 і 55 кДа. При повторному електрофорезі останнього, крім основної фракції 55 кДа, виявлялася фракція з м. м. 28 кДа. Це є свідченням того, що глікопротеїн 55 кДа є димерною формою глікопротеїну 28 кДа. Сіалоглікопротеїн 28 кДа взаємодіє з лектинами арахісу, хлібного дерева, зародків пшениці, рицини, сочевиці, квасолі, виноградного слимака, кори золотого дощу і не зв'язувався з конканаваліном А. За своїми властивостями сіалоглікопротеїни 28 і 55 кДа подібні до глікофоринів людини і ссавців.

Вступ. Глікофорини — це сіалоглікопротеїни еритроцитарної мембрани, в яких біля половини маси молекули складають вуглеводні ланцюги O-типу і які вносять основний вклад в пул сілових кислот поверхні еритроцита. Глікофорини людини детально досліджені в структурному плані. Встановлено первинну структуру поліпептидного ланцюга глікофоринів А, В, С, D, Е, локалізацію антигенних детермінант MN, Ss, Ge, структуру вуглеводних ланцюгів [1]. Для декількох видів ссавців також повністю або частково встановлено структуру глікофоринів [2, 3]. Поряд з цим про існування глікофоринів або подібних до них глікопротеїнів в еритроцитах нижчих класів хребетних відомостей немає. Це спонукало нас провести дослідження глікопротеїнового складу клітинної мембрани еритроцитів птахів з метою виявлення сіалоглікопротеїнів O-типу, аналогічних глікофоринам ссавців, охарактеризувати їх вуглеводний компонент з застосуванням лектинів як специфічних зондів до певних вуглеводних структур.

Матеріали і методи. Кров курей, білий легорн (*Gallus domesticus*), забирали на птахофабриці, як антикоагулянт використовували оксалат натрію. Еритроцити осаджували центрифугуванням крові протягом 10 хв при 1000 g. Плазму і проміжний шар, що містить лейкоцити, видаляли. Еритроцити тричі відмивали фізіологічним розчином (ЗФР), до складу якого входить 135 mM NaCl, 7 mM Na₂HPO₄, pH 7,2.

*Correspondence address.

Плазматичні мембрани одержували за модифікованою методикою [4] при 0—4 °С. Еритроцити курей суспендували в гіпотонічному буфері (10 мМ трис-НСІ, рН 7,5, 10 мМ КСІ, 1,5 мМ MgCl₂, тразилол до 2000 од/мл), витримували протягом 10 хв і гомогенізували на ножовому гомогенізаторі типу ультратурракс (MPW-302, Польща) протягом 1 хв при максимальних обертах. До гомогенату відразу додавали розчин 2 М сахарози до ізотонічності. Після центрифугування (2000 g, 15 хв) осад суспендували в гіпотонічному буфері і знову гомогенізували. Супернатанти трьох повторних гомогенізацій об'єднували і знову центрифугували (30000 g, 1 год). Осад ресуспендували в ізотонічному буфері (10 мМ трис-НСІ, рН 7,5, 1,5 мМ MgCl₂, 0,25 М сахароза), доводили концентрацію сахарози до 45 % і центрифугували протягом 1 год для осадження фрагментів клітинних ядер і ядерної мембрани. Супернатант, що містив плазматичні мембрани, розводили гіпотонічним буфером і мембрани осаджували центрифугуванням (30000 g, 45 хв).

Глікопротеїни плазматичних мембран виділяли за вже описаною модифікацією методу Hamaguchi, що полягає в розділенні структурних компонентів мембрани у двофазній системі хлороформ — ізопропанол [5, 6].

Глікопротеїни очищували іонообмінною хроматографією на КМ-целюлозі в 0,03 М ацетатному буфері, рН 4,4.

Електрофорез препаратів проводили в пластині ПААГ з градієнтом концентрації акриламід у 5,0—17,3 % в буферній системі Леммлі [7]. Як стандарти молекулярних мас (м. м.) використовували препарат білка клітинної стінки бактерії псевдотурбекульозу великої рогатої худоби, люб'язно запропонований А. А. Щербаковим (Саратовський протичумний інститут, Росія). Електрофореграми зафарбовували на глікопротеїни методом йодна кислота — реактив Шиффа, як описано в [8], і на білки — кумасі діамантово-голубим R-250. Репліки електрофореграм на нітроцелюлозі («Millipore», США, тип НА, пори 0,45 мкм) одержували методом електронпереносу [9]. Глікопротеїнові фракції на електроблотах виявляли лектинами, міченими пероксидазою хрому, або флуоресцеїнізоціанатом (ФІТЦ) за методикою [8]. Зони, які взаємодіють з WGA, виявляли з використанням антитіл до WGA. Смужку нітроцелюлози після електроблоту інкубували по 12 год послідовно в розчині WGA (0,01 мг/мл), анти-WGA-сироватці кроля, розведених у 20 разів (розведення підібрано дослідним шляхом), і в розчині ФІТЦ-антитіл курей до IgG кроля (0,02 мг/мл). Розчини готували на ЗФР з 0,05 %-м твін-20.

Препаративний електрофорез і електроелювання глікопротеїнових фракцій проводили, як описано в [10].

Глікофорин А еритроцитів людини одержували по методу [6].

Для дот-аналізу взаємодії глікопротеїнів з ФІТЦ-лектинами розчин глікопротеїну і серію його розведень по 2 мкл наносили на смужку нітроцелюлози в плями діаметром 3 мм, промивали у фізрозчині з 0,05 %-м твін-20 і інкубували в розчині ФІТЦ-лектину (1 мг/мл) протягом 1 год при 4 °С. Смужки відмивали від незв'язаного реагента і візуально реєстрували флуоресценцію плям у фіолетовому світлі. Визначали мінімальні кількості глікопротеїнів у плямі, які ще виявляються ФІТЦ-лектином, і обраховували кількість лектину, що зв'язувалася з 1 мкг білка в плямі.

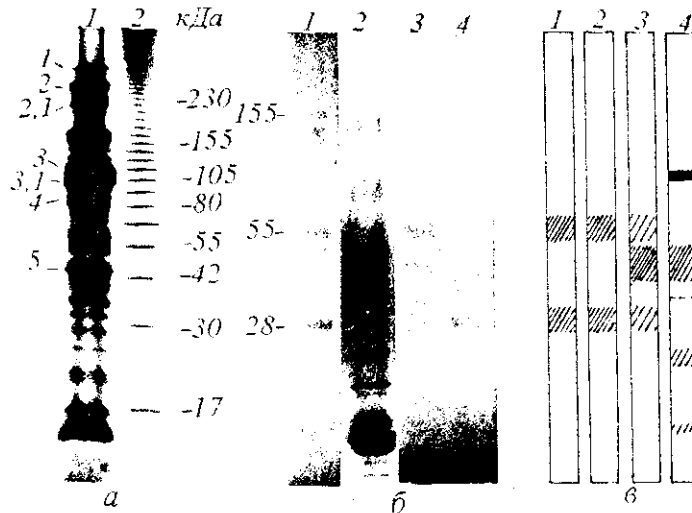
У роботі використані наступні препарати лектинів: арахісу (PNA), хлібного дерева (JFA), сочевиці (LCL), зародків пшениці (WGA), виноградного слимака (HPL), квасолі (PVA), кори золотого дощу (LABA), конканавалін А (ConA).

Вміст гексоз у препаратах визначали антроновим методом [11], сіалових кислот — резорциновим методом [12], концентрацію білка — за Лоурі [13].

Результати і обговорення. У процесі виділення плазматичних мембран з еритроцитів курей виникають значні методичні труднощі у порівнянні з простою схемою одержання мембран без'ядерних еритроцитів ссавців. Необхідна гомогенізація клітин і відділення фракції плазматичної мембрани від ядер і ядерної мембрани, яка складає біля 45 % мембранного матеріалу клітини [4] (інші внутрішньоклітинні мембранні структури, в основному мітохондрії, становлять менше 1 % всіх мембран). При центрифугуванні мембранного матеріалу в 45 %-му розчині сахарози, густина якого близька до такої ядерної мембрани (плазматична мембрана дозрілих еритроцитів курей має густину $1,142 \pm 0,024$, а ядерна мембрана — $1,198 \pm 0,027$ г/мл [4]), плазматичні мембрани лишаються в супернатанті, а ядра і ядерні мембрани осаджуються. Одержаний таким способом препарат плазматичних мембран містить сліди нуклеїнової кислоти і гістонів, які не перешкоджають солюбілізації мембранних глікопротеїнів у присутності DS-Na.

На рисунку представлена електрофореграма білків і глікопротеїнів плазматичних мембран еритроцитів курей. Основними білковими компонентами є α - і β -спектрини, білок смуги 3, актин. Присутність білкових зон між спектрином і білком смуги 3 та низькомолекулярних поліпептидів свідчить про часткове протеолітичне розщеплення білків у процесі обробки. Зафарбування електрофореграми на глікополімери методом йодна кислота — реактив Шиффа не виявляє чітких глікопротеїнових зон, що означає їх невелику кількість у мембрані.

У препараті глікопротеїнів, одержаних екстракцією плазматичних мембран курей у хлороформ-ізопропанольній системі, основними глікопротеїновими компонентами є зони з м. м. 28, 55, 130, 140, 155 кДа, міноними — 22, 40 і 80 кДа. Шифф-позитивні зони являють собою дифузні смуги, що, очевидно, є наслідком мікрогетерогенності їхніх вуглеводних компонентів. Часткову очистку сіалоглікопротеїнів провели за допомогою



Електрофореграми в пластині ПААГ з DS-Na: а — препарат плазматичних мембран еритроцитів курей, позначення за [14], нанесено 100 мкг білка (1); стандарт молекулярних мас (2); б — фракція водорозчинних глікопротеїнів, одержана екстракцією мембран в системі хлороформ — ізопропанол, фарбування на глікопротеїни реактивом Шиффа (1) і поліпептидів кумасі голубим R-250 (2), нанесено 200 мкг речовини; глікопротеїнові фракції 55 кДа (3) і 28 кДа (4), одержані препаративним електрофорезом, нанесено по 200 мкг білка, фарбування реактивом Шиффа і кумасі голубим R-250; в — взаємодія глікопротеїнів еритроцитарних мембран з лектинами: 1 — PNA, 2 — JFA, 3 — WGA, 4 — ConA

іонообмінної хроматографії на КМЦ. За рахунок негативного заряду сіалових кислот сіалоглікопротеїни не сорбувалися на колонці, а основна частина білкових домішок зв'язувалася сорбентом.

Одержані за допомогою електропереносу репліки електрофореграм на нітроцелюлозі обробляли лектинами, міченими ФІТЦ або пероксидазою, з метою виявлення багатих на О-глікани сіалопротеїнів (див. рисунок, в). Лектин арахісу (PNA) після десіалювання репліки м'яким кислотним гідролізом в 0,05 М H₂SO₄ зв'язувався з двома зонами — 28 і 55 кДа. PNA є специфічним зондом на О-глікани, чутливим до послідовності Galβ1→3NAcGalα1. Ці ж зони на репліках виявляються іншим специфічним до О-гліканів лектином — JFA, який зв'язується з вуглеводними ланцюгами без попереднього їх десіалювання.

ConA, специфічний до багатих на маннозу гліканів N-типу, виявляє ряд фракцій з м. м. 15, 22, 30 кДа, дифузну зону 45—50 кДа, 80 кДа (основна ConA-позитивна зона) і не взаємодіє з PNA- і JFA-позитивними фракціями.

WGA зв'язувався з зонами 28 і 55 кДа, на нашу думку, за рахунок взаємодії з залишками сіалових кислот, а також з ConA-позитивною зоною 45—50 кДа, ймовірно, — за рахунок хітобіозних послідовностей у складі N-гліканів.

PNA-позитивні сіалоглікопротеїнові фракції були одержані в чистому стані за допомогою препаративного електрофорезу в ПААГ. Електрофоретичний аналіз одержаних препаратів показав, що зона 55 кДа є димером глікопротеїну 28 кДа і частково розпадається до мономерного стану (рисунок, в). Така властивість характерна для глікофоринів, які утворюють в розчинах за рахунок гідрофобних внутрішньомембранних ділянок димери, стійкі навіть в денатуруючих умовах електрофорезу з DS-Na. Обидві зони дуже слабо фарбуються на білок кумасі голубим R-250. Це свідчить про те, що вуглеводний компонент складає основну частину моекولی, подібно до глікофоринів ссавців.

Напівкількісний дот-аналіз взаємодії глікопротеїну 28 кДа з лектинами показав, що подібно до глікофорину А людини цей глікопротеїн зв'язує PNA, PVA, RCA, LCL, LABA і не взаємодіє з ConA (таблиця). Взаємодія з PVA означає присутність у складі вуглеводного компонента розгалужених багатоантенних вуглеводних ланцюгів N-типу, які не взаємодіють з ConA. На користь цього також свідчить зв'язування з лектином сочевиці LCL, специфічним до маннозних і N-ацетилглюкозамінових залишків. Взаємодія з RCA і HPL вказує на значну кількість залишків N-ацетиллактозаміну і, відповідно, N-ацетилгалактозаміну у вуглеводній частині цього глікопротеїну, а зв'язування з LABA — присутність термінальної L-фукози в складі О-гліканів.

Взаємодія ФІТЦ-лектинів з глікофоринами курей і людини

Лектин	Глікофорин курей	Глікофорин А людини
PNA	1	2,4
LCL	0,25	1,2
RCA	2	2,5
HPL	1	Не взаємодіє
LABA	1	1,3
PVA	4	2,5
ConA	Не взаємодіє	Не взаємодіє

П р и м і т к а. Приведено кількість ФІТЦ-лектинів (мкг), що зв'язується з 1 мкг білка в плямі (метод див. у розділі «Матеріали і методи»).

Вміст сіалових кислот і гексоз у глікопротеїні 28 кДа становить 135 і 340 мкг/мг білка відповідно.

Результати досліджень глікопротеїнів еритроцитарних мембран курей дозволяють стверджувати, що в мембранах еритроцитів курей є два основні сіалопроїєїни з м. м. 28 і 55 кДа (димерна форма), які за властивостями відповідають глікофоринам ссавців. Аналогічно до глікофоринів людини і ссавців вони переходять у водну фазу при обробці мембран сумішшю хлороформ — ізопропанол, взаємодіють з лектинами арахісу, хлібного дерева, зародків пшениці, які селективно зв'язуються з глікофоринами, не зв'язують конканавалін А, а також мають високий вміст вуглеводів, зокрема сіалових кислот.

Роботу фінансовано з фонду фундаментальних досліджень при ДКНТ України.

Т. В. Стасик, М. Д. Луцик-Кордовский

Получение и свойства гликофорина плазматической мембраны куриных эритроцитов

Резюме

Получены гликопротеины плазматических мембран эритроцитов кур путем экстракции изолированных мембран смесью хлороформ—изопропанол. Методом электрофореза в пластине полиакриламидного геля с DS-Na выявлены основные Шифф-позитивные фракции с молекулярной массой (м. м.) 28, 55, 130, 140, 155 кДа, а также минорные фракции с м. м. 22, 40, 80 кДа. Специфические к О-гликозидным цепям лектины арахиса и хлебного дерева связывались с зонами 28 и 55 кДа. С помощью препаративного электрофореза получены в чистом состоянии сialogликопротеины 28 и 55 кДа. При повторном электрофорезе последнего, кроме основной фракции 55 кДа, выявлялась фракция с м. м. 28 кДа. Это свидетельствует о том, что гликопротеин 55 кДа является димерной формой гликопротеина 28 кДа. Сialogликопротеин 28 кДа взаимодействует с лектинами арахиса, хлебного дерева, зародышей пшеницы, клецевины, чечевицы, фасоли, виноградной улитки, коры золотого дождя и не связывается с конканавалином А. По своим свойствам сialogликопротеины 28 и 55 кДа подобны гликофоринам человека и млекопитающих.

Т. В. Стасик, М. Д. Лутsik-Кордовский

Isolation and properties of glycoprophin from plasma membrane of hen red blood cells

Summary

Membrane glycoproteins of hen red blood cells were obtained by extraction of isolated membranes with chloroform — isopropanol mixture. Polyacrylamide slab gel electrophoresis in the presence of DS-Na revealed several major fractions with molecular weights 28, 55, 130, 140, 155 kDa and minor fractions with M. W. 22, 40, 80 kDa. Specific to O-glycosidic chains peanut and jack fruit lectins bound with 28 kDa and 55 kDa bands. Sialoglycoproteins with M. W. 28 kDa and 55 kDa were obtained in pure state by preparative electrophoresis. After subsequent electrophoresis of 55 kDa glycoprotein besides the main band 55 kDa fraction with M. W. 28 kDa was revealed. It is suggested that glycoprotein with M. W. 55 kDa is a dimeric form of 28 kDa glycoprotein. Sialoglycoprotein 28 kDa interacted with lectins of peanut, jack fruit, wheat germ, castor bean, lentil, red kidney bean, garden snail, laburnum anagyroides bark and did not bind concanavalin A. The properties of sialoglycoproteins with M. W. 28 kDa and 55 kDa resemble that of human and mammalian glycoprophins.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Cartron J.-P., Rahuel C. Human erythrocyte glycoprophins: protein and gene structure analyses // Trans. Med. Rev.—1992.—6, N 2.—P. 63—92.
2. Krotkiewski H. The structure of glycoprophins of animal erythrocytes // Glycoconjugate J.—1988.—5.—P. 5—48.
3. Rearden A., Magnet A., Kudo S., Fukuda M. Glycoprophin B and gp-E genes arose from the gp-A ancestral gene via 2 duplications during primate evolution // J. Biol. Chem.—1993.—268, N 3.—P. 2260—2268.
4. Weise M. I., Ingram V. M. Proteins and glycoproteins of membranes from developing chick red cells // Ibid.—1976.—251, N 21.—P. 6667—6673.

5. *Hamaguchi H., Cleve H.* Solubilization and comparative analysis of mammalian erythrocyte membrane glycoproteins // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1972.—47, N 2.—P. 459—464.
6. *Луцик М. Д., Олешко П. С., Цегельский А. А.* Получение и частичная характеристика водорастворимых мембранных гликопротеинов — рецепторов лектинов // *Биол. мембраны.*—1992.—9, № 10—11.—С. 1025—1027.
7. *Laemmli U. K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4 // *Nature.*—1970.—277, N 5259.—P. 680—685.
8. *Луцик М. Д., Кусень С. Й.* Исследование мембранных гликопротеинов эритроцитов человека с применением лектинов // *Укр. биохим. журн.*—1987.—59, N 6.—С. 3—9.
9. *Towbin H., Staehelin T., Gordon J.* Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1979.—76, N 9.—P. 4350—4354.
10. *Луцик М. Д., Олешко П. С., Возканич А. С.* Електроелеювання білкових фракцій з поліакриламідного гелю // *Укр. біохім. журн.*—1990.—62, № 1.—С. 112—115.
11. *Kleinzeller A.* Cukry a jejich derivaty // *Laboratorni technika biochemie / Ed. F. Sorm.*—Praha: Ceskoslov. Akad. Ved., 1959.—S. 501.
12. *Jourdan G., Dean L., Roseman S.* The sialic acid. A periodate-resorcinol method for the quantitative estimate of sialic acid and their glycosides // *J. Biol. Chem.*—1971.—246, N 2.—P. 430—435.
13. *Lowry O., Rosenbrough W. Y., Farr A. L., Randall R. J.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // *Ibid.*—1951.—193.—P. 265—275.
14. *Chan L.-N. L.* Changes in the composition of plasma membrane proteins during differentiation of embryonic chick erythroid cell // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1977.—74, N 3.—P. 1062—1066.