

STRUKTURA OROSOMUKOIDU – PŘÍKLAD STUDIA GLYKOPROTEINU FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÝMI METODAMI

VÍTĚZ KALOUS

Malostranské nám. 10, 118 00 Praha 1
e-mail: notebookdoma@volny.cz

Došlo dne 17.XI.1999

Klíčová slova: orosomukoid, *alfa*-1 kyselý glykoprotein, glykoproteiny – struktura, glykany, oligosacharidy, struktura glykoproteinů – fyzikální metody

Obsah

1. Úvod
2. Obecná charakteristika orosomukoidu
3. NMR spektroskopie glykopeptidů a celé molekuly orosomukoidu
4. Hmotnostní spektroskopie moderními ionizačními metodami
5. Vibrační Ramanova optická aktivita
6. Spektroskopické metody (TPDS, CD)
7. Závěr

1. Úvod

Významnou skupinou krevních bílkovin jsou krevní glykoproteiny. Je jim proto věnována velká pozornost jak z hlediska chemického, tak fyzikálně-chemického¹⁻⁷. Před fyzikálně-chemickým studiem leží důležitý úkol, jakým je zkoumat nejen kvantitativní zastoupení jednotlivých glykoproteinů, ale i změny v jejich strukturách spojených s procesy probíhajícími v patologických stavech. Ke studiu těchto „patologických“ glykoproteinů byly v posledních letech použity často nákladné fyzikální metody, které se již osvědčily pro studium menších organických molekul. V tomto referátu bude hlavní pozornost věnována orosomukoidu (*alfa*-1 kyselému glykoproteinu), který vzhledem k vysokému obsahu cukerné složky a kyselému charakteru je zcela výjimečnou krevní bílkovinou. Úkolem referátu je upozornit biochemicky zaměřené čtenáře na možnosti fyzikálně-chemických metod při zkoumání struktury glykoproteinů a tak je připravit pro konzultace se specialisty v příslušných metodách.

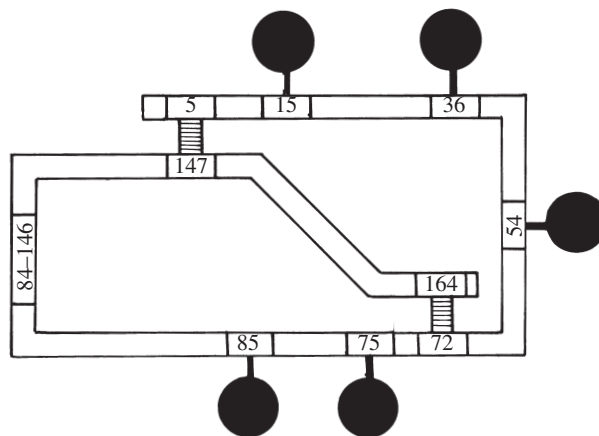
2. Obecná charakteristika orosomukoidu

Objev kyselého glykoproteinu v normálních i patologických sérech je úzce spjat s polarografickým studiem sulfosalicylových filtrátů krevních sér. Tyto filtráty byly použity při Brdičkově reakci⁸, při které se měří katalytické proudy bílkovin v amoniakálních puffech obsahujících ionty trojmocného kobaltu. Hlavní složka filtrátů^{9,10}, po vysrážení hlavních krev-

ních bílkovin kyselinou sulfosalicylovou nebo chloristou, se ukázala být bílkovinou o vysokém obsahu cukrů. Proto byla označena jako mukoprotein MP-1. Bílkovina, izolovaná klasickým vysolováním směsného séra síranem amonným Weimerem a spol.¹¹, byla pojmenována orosomukoid (ORS, ORM). Prakticky ve stejné době izoloval stejnou bílkovinu Schmid¹² a označil ji jako *alfa*-1 kyselý glykoprotein (AGP, AAG). Vzhledem k tomu, že v krevní plazmě představuje orosomukoid pouze přibližně jedno procento z přítomných bílkovin (u zdravých jedinců 50 až 150 mg/100 ml), bylo výhodnější provádět jeho izolaci u Cohnovy alkoholové frakce VI, kde tvoří hlavní bílkovinnou složku.

Vedle chemického srážecího postupu se k izolaci osvědčily chromatografické metody¹³⁻¹⁵ na modifikovaných celulosách. Vzhledem k požadavku studovat orosomukoid z individuálních normálních i patologických sér bylo třeba před vlastní chromatografií odstranit hlavní krevní bílkoviny. To se podařilo přidáním polyethylenglykolu a centrifugací sraženiny¹⁶. Izolace byla ukončena afinitní chromatografií¹⁷ na ConA Sepharose.

Izolovaný orosomukoid byl charakterizován chemickými a fyzikálně-chemickými metodami¹⁻⁷. Molekulová hmotnost se v závislosti na použité metodě pohybuje v rozmezí 41–43 kDa, izoelektrický bod *pI* 1,7–2,3 podle použitého pufru. Je tedy orosomukoid nejkyselějším proteinem krevního séra. Chemická analýza čistého orosomukoidu ukázala na přítomnost jednoho peptidového řetězce¹⁸ o délce 183 aminokyselin, přičemž na 21 místech je v různých variantách proteinu možnost výskytu dvou různých aminokyselin. Dvě disulfidové vazby¹⁹ jsou mezi cysteiny 5–147 a 72–164, hydrofobní oblasti pak mezi aminokyselinovými zbytky 1–15, 85–105 a 140–147, silně hydrofilní je naopak C-konec. V molekule je 8 fenylalaninů, 12 tyrosinů a 3 tryptofany. Ze sacharidů byly nalezeny



Obr. 1. Schematické znázornění struktury orosomukoidu. V jednoduchém peptidickém řetězci jsou šrafovanými sloupečky vyznačeny dva disulfidické můstky s číselným údajem místa v řetězci. Černá kolečka přísluší pěti oligosacharidovým jednotkám připojeným k asparaginům. Znázornění není v měřítku. Upraveno podle Schmidta et al.¹⁹

manosa, galaktosa, fukosa, *N*-acetylglukosamin a sialová kyselina¹⁹. Hmotnostní podíl cukerné části činí 41–45 %. Sacharidy jsou v molekule orosomukoidu přítomny ve formě pěti složitých oligosacharidů (glykanů)^{19–21} (obr. 1), které jsou na peptidický řetězec navázány přes amidový dusík asparaginu. U glykanů orosomukoidu byla nalezena řada glykoforem, které se liší ve stupni větvení, fukosylace a sialosylace. Orosomukoid se ukázal jako jeden z mála krevních glykoproteinů, které obsahují současně glykany^{22,23} di-, tri- a tetraantennního typu. Všem typům je společný pentasacharid, tvořený třemi manosami a dvěma *N*-acetylglukosaminy, z nichž jeden se účastní vazby na bílkovinnou část orosomukoidu. Protože glykany různého antennního typu jsou v molekule orosomukoidu zastoupeny v různém množství a také v peptidové části je mnoho zaměnitelných aminokyselin, je orosomukoid velmi heterogenní. Zvláštní kapitolou je heterogenita determinovaná genetikou²⁴.

V posledních letech se výzkum orosomukoidu ubíral v podstatě dvěma směry. Jeden byl zaměřen na studium struktury moderními fyzikálně-chemickými metodami, jako jsou metody nukleární magnetické rezonance (NMR), hmotnostní spektrometrie (MS), Ramanova optická aktivita (ROA) a metody spektrofotometrické. Druhý biochemický směr, užívající chromatografických a elektroforetických metod, měl za úkol studium mikroheterogenity ze zaměřením na klinickou chemii.

3. NMR spektroskopie glykopeptidů a celé molekuly orosomukoidu

Rozvoj nukleární magnetické rezonance do oblasti vysokých frekvencí (360 MHz a vyšších) spolu s novými pulsními metodami^{25–27} umožnil rozšířit aplikaci NMR na studium biomolekul jako jsou glykopeptidy a glykoproteiny krevní plazmy^{28,29}.

Pokud jde o studium orosomukoidu, bylo třeba nejprve rozštěpit jeho molekulu na několik glykopeptidů³⁰. Po odštěpení sialové kyseliny byl orosomukoid redukován, vzniklé SH skupiny karboxymethylovány a vzniklé fragmenty rozštěpeny proteasami a glykosidasami. Dělení glykopeptidů bylo provedeno kapalinovou chromatografií. Experimentální podmínky štěpení molekuly orosomukoidu byly voleny tak, aby glykopeptidy obsahovaly glykanové jednotky z pěti glykosylačních míst na molekule orosomukoidu. Tato místa byla označena^{18,20} římskými číslicemi I až V. Místo I odpovídá vazbě glykanu na zbytek asparaginu Asn 15, místo II Asn 38, místo III Asn 54, místo IV Asn 75 (obr. 1). Glykopeptidy z těchto míst obsahují

glykany složené z galaktosy, manosy, glukosaminu a fukosy. Podle molárního zastoupení uvedených monosacharidů, zjištěného klasickými analytickými metodami, byly glykopeptidy rozděleny do pěti tříd označených písmeny A, B, C, BF, CF. Zjištěné složení monosacharidů u glykopeptidů z jednotlivých glykosylačních míst ukázalo, že v místě I jsou glykopeptidy třídy A, B a BF, v místech II, III, IV a V jsou třídy B, C a CF.

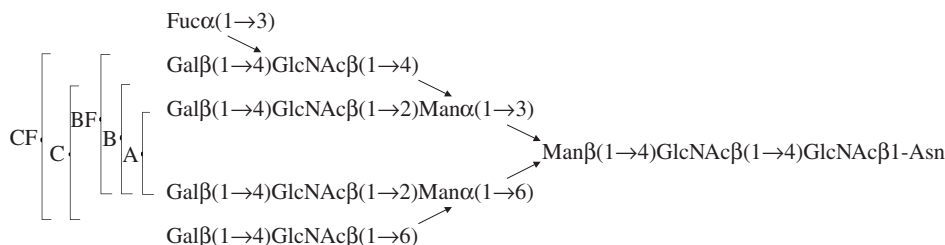
Pro určení lineární struktury glykanů v různých třídách glykopeptidů se osvědčila 360 MHz ¹H NMR s Fourierovou transformací³⁰. Pro interpretaci spekter registrovaných v těžké vodě bylo použito rezonancí H-1 a H-2 protonů manosových zbytků, H-5 a H-6 protonů fukosových zbytků a *N*-acetylových protonů. Citovaná práce uvádí přehledně v tabulkách u všech těchto tříd hodnoty chemických posunů uvedených protonů. Když bylo použito údajů o chemických posunech z předchozích prací s modelovými sloučeninami a glykoproteiny, bylo možno učinit závěr, že třída A má biantenní strukturu, třída B triantenní a třída C teraantenní strukturu (obr. 2). Strukturální vzorce oligosacharidů všech tříd jsou v práci Fourmeta et al.³⁰, kteří se věnovali glykosylačním místům II až V. Glykany v místě I studovali Schmid et al.³¹, kteří uveřejnili přehledné schéma primární struktury různých antennních glykanů (obr. 2).

Jiné NMR studie byly prováděny s celou molekulou orosomukoidu²⁸ spolu s jinými glykoproteiny akutní fáze, a to přímo v krevní plazmě. Ve spektru získaném metodou 500 MHz Hahn spin-echo ¹H NMR pozorovali Bell et al.²⁹ široké píky při 2,04 a 2,08 ppm, které přiřadili *N*-acetylům mobilních řetězců *N*-acetylglukosaminu a *N*-acetylneuraminové kyseliny (obr. 3). V práci jsou také pro ilustraci uvedena spektra lidské plazmy v oboru 1 až 3 ppm pro pět vzorků od čtyř pacientů a jednoho zdravého jedince. Píky ve spektru, označené římskými číslicemi I a II, se výrazně neliší, a tak až další pokusy rozhodnou o použitelnosti metody NMR pro studium orosomukoidu v celé nerozdělené krevní plazmě.

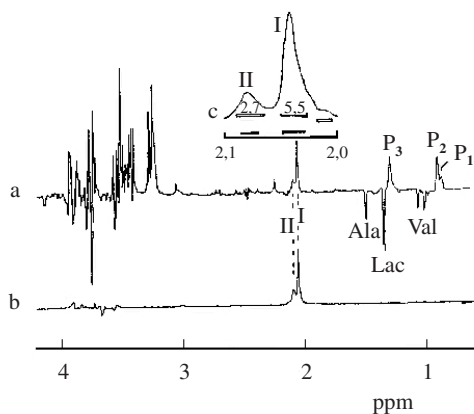
NMR spektra *alfa*-1 kyselého glykoproteinu najdeme také v práci Grootvelda et al.³², kteří srovnávali lidský a krysí orosomukoid za účelem použití krysy jako experimentálního zvířete. U krysího orosomukoidu tyto autoři našli navíc píky u 2,14 ppm, který přiřadili protonům skupiny *O*-acetyl-CH₃.

Další poznatky přinesla práce Nicholsona et al.³³, kteří pro studium lidské krevní plazmy použili 750 MHz ¹H a ¹H-¹³C NMR spektroskopie a několika dalších NMR metod. Pro *alfa*-1 kyselý glykoprotein je jako příklad v citované práci uvedeno 600 MHz ¹H-¹³C spektrum.

NMR se ukázala jako relativně rychlá metoda studia primární struktury glykopeptidů orosomukoidu. Aplikace studia mikroheterogenity glykopeptidů u individuálních sér v klinic-



Obr. 2. Primární struktura glycidových jednotek třídy A, B a BF na glykosylovaném místě lidského orosomukoidu. Tetraantennní struktury, vyskytující se na ostatních glykosylačních místech, jsou označeny C a CF. Písmeno F značí fukosu. Podle Schmidta et al.³¹

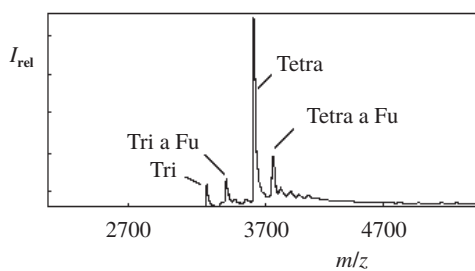


Obr. 3. 500 MHz spin echo ^1H NMR spektrum alifatické oblasti krevní plazmy s píky orosomukoidu (a), samotného orosomukoidu v D_2O (b). Na vložené části (c) jsou zvětšené píky I a II, které odpovídají *N*-acetylm *N*-acetylneuraminové kyseliny a *N*-acetylglukosaminu. Podle Bella et al.²⁹

ké praxi bude však vyžadovat poměrně náročnou izolaci orosomukoidu, jeho chemickou úpravu a štěpení molekuly peptidasami a glykosidasami. Metody NMR s vysokým rozlišením umožňují přímo stanovit orosomukoid v individuální plazmě, neposkytují však doposud údaje o jeho mikroheterogenitě.

4. Hmotnostní spektrometrie moderními ionizačními metodami

Moderní metody hmotnostní spektrometrie^{28,34-37} (MS), založené na pulsním principu, dávají možnost citlivě a selektivně charakterizovat glykoproteiny z hlediska jak sacharidové tak peptidové části. Pro úspěšné splnění tohoto úkolu je nutno předem připravit glykopeptidy²⁰, např. tryptickým štěpením molekuly glykoproteinu, a ty po jejich rozdělení chromatografickými metodami dále rozštěpit glykosidasami. Pro studium peptidů a glykopeptidů byly použity moderní ionizační metody³⁶, mezi které patří především metoda MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation), ESI (Electrospray Ionisation – ionizace elektrosprejem) a metoda FAB (Fast Atom Bombardment). Všechny tyto ionizační metody umožňují studovat velké netěkavé molekuly biopolymerů včetně glykoproteinů a polysacharidů o hmotnostech desítek i více kilodaltonů. Ionizace je při tom tak šetrná, že nedochází ke štěpení molekul, jak je tomu obvykle při ionizaci svazkem elektronů. Při metodě MALDI je glykopeptid nebo oligosacharid dispergován ve velkém nadbytku matrice, představované slabou aromatickou kyselinou (např. skořicovou) a jejími deriváty. Matrice se vzorkem je nanášena na kovovou destičku, která je ozařována laserem (např. pulsním dusíkovým laserem o vlnové délce 337 nm). Zářivá energie absorbovaná matricí je předána molekulám vzorku, které jsou tím převedeny do plynné fáze ve formě protonovaných molekul $(\text{M}+1)^+$. Tyto ionty jsou zavedeny (extrahovány) do analyzátoru hmotnostního spektrometru. Nejčastěji je jím spektrometr typu TOF-MS (Time-Of-Flight MS)³⁵. Ve výzkumu jsou metody jako je tandemová spektroskopie MS/MS, doplněná metodou CID (Collision-Induced-Dissociation).



Obr. 4. MALDI hmotnostní spektrum polysacharidových forem orosomukoidu. Tetra – tetraantennní forma, Tri – triantennní forma, Fu – formy obsahují navíc fukosu. I_{rel} relativní intenzita, m/z relativní molekulová hmotnost

Tabulka I

Zastoupení různých antenních glykoforem v místě substituce glykanů vázaných na molekulu orosomukoidu přes asparagin (Asn). Hodnoty v procentech byly převzaty z prací Sutona et al.³⁸ a Treuheita et al.¹⁷

Místo vazby	Antennost			Cit.
	bi-	tri-	tetra-	
Asn 16	12	87	1	38
	9	91	0	17
Asn 38	–	–	–	38
	61	25	14	17
Asn 54	9	40	51	38
	9	32	59	17
Asn 75	2	28	70	38
	0	21	79	17
Asn 85	–	–	–	38
	0	15	85	17
<i>Celkově</i>	<i>14</i>	<i>38</i>	<i>48</i>	<i>17</i>

Metodu MALDI použili při analýze pěti glykosylačních míst v molekule orosomukoidu Treuheit et al.¹⁷ Příklad MS spektra desialyzovaných forem je na obr. 4, na kterém jsou píky odpovídající pozitivním molekulovým iontům čtyř různých antenních glykoforem. Zastoupení těchto forem v různých glykosylačních místech je v tabulce I. Autoři¹⁷ dále zkoumali zastoupení jednotlivých antenních forem v různých glykosylačních místech I až V u tří orosomukoidových subfrakcí (variant). Tyto varianty získali dělením orosomukoidu lektinovou chromatografií na konkanavalinu A (Con A). Nejpevnější vazba s lektinem je u subfrakce R, středně pevná vazba u subfrakce WR a subfrakce U obsahuje variantu orosomukoidu, která se neváže s lektinem. Výsledky uvedené ve třech tabulkách citované práce¹⁷ platí pro komerční (tedy směsný) orosomukoid. Zajímavé by bylo toto dělení a následné MS studium u individuálních normálních a hlavně patologických sér, kde se dá očekávat různé zastoupení glykoforem.

Distribucí glykanových forem u směsného orosomukoidu se zabývali také Sutton et al.³⁸ Tito autoři metodou MALDI monitorovali sekvenování oligosacharidů po digesti glykopeptidů exoglykosidasami. Podle autorů jde o rychlou a citlivou metodu, vyžadující 200 pmol jednotlivých glykopeptidů. Výsledky jsou uvedeny společně s hodnotami z práce Treuhei-

ta et al.¹⁷ v tabulce I. Relativně malé rozdíly v zastoupení jednotlivých forem v různých glykosylačních místech se dají vysvětlit podobným, i když ne totožným způsobem přípravy štěpů orosomukoidu, a hlavně velkou mikroheterogenitou tohoto glykoproteinu, která se promítá do komerčního preparátu.

Podobně jako z lidského krevního séra byl z hovězího séra izolován orosomukoid, označovaný v literatuře jako hovězí α_1 -kyselý glykoprotein³⁹. Pro detekci glycidové složky ve fragmentech glykoproteinu po jeho enzymovém štěpení bylo použito ionizace elektrosprejem (ESI). Eluát vytékající z chromatografického sloupce tenkou kovovou kapilárou byl účinnkem silného elektrického pole přeměněn v jemnou mlhu mnohonásobně nabitých částic. Po odpaření rozpouštědla byly ionty zavedeny do prvního MS analyzátoru, který rozdělil proud iontů na mateřské ionty. Tyto ionty pokračovaly ve své dráze a vstoupily do komůrky s kolizním plynem (argonem). Zde došlo k jejich disociaci na dceřiné ionty (metoda CID). V literatuře je celý uvedený postup označován jako LC/ES-CID/MS/MS. Metoda umožňuje selektivní detekci glykopeptidů vedle peptidů. U glykopeptidů je totiž přítomen ion m/z 204 (*N*-acetylhexosaminový oxoniový ion) a ion m/z 366 (Hex-HexNac⁺). Jako možnou praktickou aplikaci navrhuje autoři studium glykoproteinů u některých onemocnění skotu.

V poslední době se Stubbsovi a spol.⁴⁰ podařilo přechistit tetraantenní oligosacharidy, připravené z lidského asialyzovalného orosomukoidu. Metodou MALDI a protonovou NMR s velkým rozlišením byla určena polyaktosaminová extenze tetraantenního glykanu. Autorům se osvědčila tyrosinamidová derivatizace, která umožnila sestavit oligosacharidovou knihovnu.

Dobré služby prokázala metoda LC/ES při hledání „sialyl Lewis(x) antigenu“, jehož umístění se předpokládá na některém z pěti *N*-glykosylačních míst molekuly orosomukoidu. Při těchto pokusech⁴¹ byl v řadě glykopeptidů sledován oxoniový ion o m/z 803. Analýza ukázala, že antigen je přítomen ve všech místech obsahujících *N*-glykopeptidy.

Protože je stále živá problematika vazby léků na orosomukoid, byly modifikovány histidiny a tyrosiny diethylpyrokarbonátem⁴¹. Metody (HPLC-ESI/MS) a MALDI ukázaly na rozdílnost v reaktivitě histidinu 97 a histidinu 100. Byly také modifikovány lysiny v závislosti na pH. Podle autorů může být výsledek využito pro navržení experimentů pro posouzení vazby některých léčiv na uvedené aminokyseliny.

Hmotnostní spektrometrie se ukázala jako velmi dobrá a relativně rychlá metoda pro určování struktury oligosacharidové části glykoproteinů, přičemž množství látky potřebné ke studiu je přítom velice malé.

5. Vibrační Ramanova optická aktivita

Při Ramanově spektroskopii dochází při excitaci molekul laserovým zářením ke vzniku rozptýleného záření o vlnových délkách kratších i delších než je intenzivní záření excitační. Rozdíly mezi vlnocet excitačního záření a jednotlivých vlnocetů záření rozptýleného (tzv. Ramanův posun) odpovídají přechodům ve vibračně-rotálních stavech molekuly. Tento klasický Ramanův jev byl doplněn metodou vibrační Ramanovy optické aktivity (VROA), označované také jako Ramanova optická aktivita^{55,56} (ROA). Při technice ROA se měří malé rozdíly v Ramanově rozptylu pravé a levé složky kruhové

polarizovaného excitačního laserového záření. Je tedy ROA blízká technice vibračního cirkulárního dichroismu (VCD).

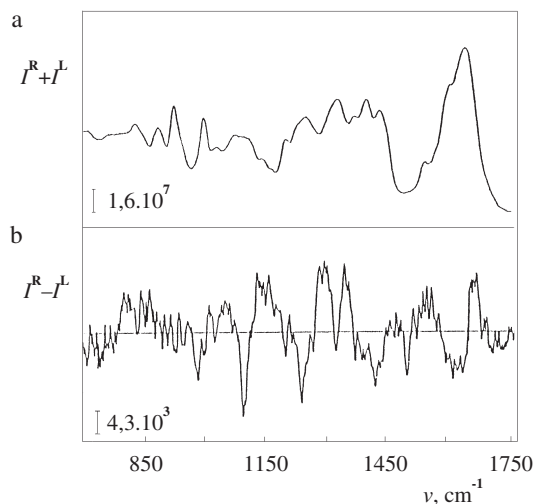
ROA spektra poskytují informaci o roztokové struktuře biopolymerů⁵⁷, včetně glykoproteinů⁵⁸. Zkoumání terciární struktury a dynamiky proteinů je možné u nativních i rozvinutých molekul. U glykoproteinů, jako je např. orosomukoid, se dají získat informace jak o peptidové tak cukerné části molekuly. Mimoto je možno ze spekter vyčíst vzájemné ovlivňování obou složek a posoudit stabilitu molekuly. Se spektrem orosomukoidu se můžeme setkat v práci Barrona et al.⁵⁷, kteří použili metodu s uspořádáním zpětného rozptylu (Backscattered Raman). Ostrost některých ROA maxim (ROA pásů) ukazuje na nezvyklou rigiditu tohoto glykoproteinu (obr. 5). Z širokého pozitivního maxima při 1060 cm^{-1} a velmi ostrého pozitivního maxima při 1308 cm^{-1} se dá soudit na vysoký obsah struktury typu *beta* skládaného listu a nízký obsah *alfa* šroubovice. Rozvoj metody ROA po instrumentální i teoretické stránce vytváří perspektivu získání dalších údajů o terciární struktuře biopolymerů ve vodných roztocích.

Další možností využití Ramanova jevu ke zkoumání orosomukoidu je metoda SERS (Surface-Enhanced Raman Spectroscopy). Touto metodou studují zbytky kyseliny sialové v molekule orosomukoidu až do koncentrace $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a to jak v molekulách izolovaných z normálních sér tak z ascitické kapaliny pacientů trpících zhoubnými nádory⁵⁹.

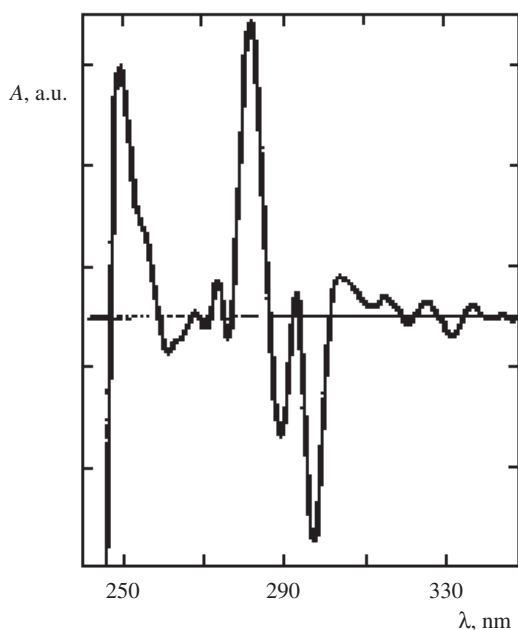
6. Metody spektroskopické (TPDS, CD)

Spektrofotometrie bílkovin v ultrafialové oblasti je založena na poznatku, že aromatické aminokyseliny (tyrosin, tryptofan, fenylalanin) absorbují ultrafialové záření v oblasti 240 až 300 nm. Tato skutečnost byla uplatněna při určení absorpčního koeficientu^{1,3} orosomukoidu $E_{280}^{1\%}$ (1 %) = 8,9 a molární absorptivity $\epsilon_{278} = 3,57 \cdot 10^6 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$.

Větší informace o aromatických aminokyselinách poskytl metoda TPDS (Temperature Perturbation Difference Spectrophotometry) a derivační spektroskopie. Při této metodě se



Obr. 5. „Backscattered“ Ramanovo spektrum (a), RAO spektrum (b) orosomukoidu v acetátovém pufru. I^R a I^L – intenzita pravé a levotočivé složky záření, ν – vlnocet v cm^{-1} . Podle Barrona et al.⁴⁵



Obr. 6. Čtvrtá derivace absorpčního spektra orosomukoidu ve vodě při pH 10. Podle Karpenka et al.⁵³ Absorbance A byla z uvedené práce převzata v jednotkách a.u. (arbitrary units), korektnější je užit rozměr (nm^{-4})

měří rozdíl absorbance mezi dvěma kyvetami, naplněnými roztoky o stejné koncentraci. Při měření je jedna kyveta udržována na konstantní teplotě, zatímco teplota v druhé kyvetě je postupně zvyšována. Po každém zvýšení teploty je zaznamenáno absorpční spektrum.

Metodou TPDS bylo zjištěno⁴⁸, že molekula orosomukoidu obsahuje čtyři pro rozpouštědlo přístupné (volné) tyrosyly zatímco zbývajících osm tyrosylů je maskováno v hydrofobním jádru molekuly. Počet exponovaných tryptofylových zbytků byl nalezen blízký jedničce (z celkového počtu tří tryptofylů). Expozici tyrosylů orosomukoidu se dále zabývali Janáčková a Karpenko⁴⁹ při studiu termální stability této bílkoviny. Tito autoři zjistili spektrofotometrickou titrací tři druhy tyrosylů⁵⁰, jejichž počet ($n_1 = 3$, $n_2 = 7$, $n_3 = 2$) je v soulase s hodnotami v jejich předchozí práci⁵¹.

Současná technika dovoluje získat derivační spektra⁵² numerickou derivací. Největšího uplatnění našla především derivační spektra čtvrtého řádu. Touto technikou byly u orosomukoidu v oblasti 245 až 300 nm pozorovány dva výrazně kladné a dva záporné píky⁵³ (obr. 6). Pro posouzení uložení zbytků aromatických aminokyselin v molekule orosomukoidu má především význam pozitivní pik při 250 nm, příslušející zbytkům fenylalaninu. Interpretace derivačního spektra ukázala, že 1 až 2 zbytky fenylalaninů z celkového počtu 12 jsou exponovány vodou jako rozpouštědlem.

Orosomukoid byl také zkoumán metodou cirkulárního dichroismu (CD) a optické rotační disperze (ORD), které dávají obraz sekundární struktury. Ve starší práci našli Yamagami a Schmid⁵⁴ 8 % α -helixu, 60 % β struktury a 10 % β ohybu II. typu. V dalších pracích za zlepšených experimentálních a interpretačních podmínek byl upřesněn obsah α -helixu na hodnotu kolem 20 %. K této hodnotě se přiblížili

Aubert a Loucheux-Lefebvre⁵⁵, kteří měřením i predikcí udávají shodně 21 % α -helixu. Stejná hodnota se dá odečíst také z obrázku v práci⁵⁶, pojednávající o vlivu methanolu na strukturu orosomukoidu. CD spektrum ORS ve fosfátovém pufru s charakteristickým intenzivním negativním píkem je v práci Kodíčka et al.⁵⁷

Další metodou bylo měření fluorescence a zvláště pak časově rozlišené fluorescence. U orosomukoidu metoda pikosekundové fluorescence umožnila odhadnout přístupnost tryptofylových zbytků⁵⁸ a to v soulase s výsledky získanými TPDS.

Vzhledem k relativní jednoduchosti spektroskopických metod a jejich dalšímu rozvoji se dá v blízké budoucnosti počítat s praktickými aplikacemi v biochemii a lékařství.

7. Závěr

Fyzikálně-chemické metody rozšířily a zpřesnily poznatky o struktuře orosomukoidu. Na základě rezonance vodíků na cukerných zbytcích byly moderními NMR metodami určeny typy anténních struktur jednotlivých oligosacharidů. Méně úspěšná byla NMR při studiu orosomukoidu v krevní plazmě, kde je možno stanovit jeho koncentraci avšak bez určení jeho mikroheterogenity. Metody hmotnostní spektrometrie, užívající ionizačních metod jako je MALDI a ESI, umožnily po enzymové a chemické úpravě studovat jak cukernou, tak peptidickou část molekuly orosomukoidu. Dokonalá technika hmotnostní spektrometrie dovolila pracovat s pikogramovým množstvím vzorků. Rozlišení jednotlivých oligomerů, potřebné pro posouzení vztahu mezi strukturou orosomukoidu a klinickým stavem pacienta, vyžaduje prozatím poměrně náročnou enzymovou a chemickou modifikaci, následovanou chromatografickým dělením. Z dalších metod je pro studium terciární struktury perspektivní metoda ROA a ORD. Spektroskopické metody umožnily citlivě posuzovat postavení aromatických aminokyselin v molekule orosomukoidu. Tato skupina metod, vzhledem ke své relativní aparaturní jednoduchosti, se jeví jako perspektivní pro bližší poznání peptidické části molekuly orosomukoidu, např. z hlediska jeho hydrofobních interakcí.

LITERATURA

- Schultze H. E., Heremans J. F.: *Molecular Biology of Human Plasma Proteins*. Elsevier, Amsterdam 1966.
- Jeanloz R. W., v knize: *Glycoproteins* (Gottschalk A., ed.), 2. vyd., kap. 6. Elsevier, Amsterdam 1972.
- Lehman J.: *Carbohydrates Structure and Biology*. G. Thieme, Stuttgart 1998.
- Musil J.: *Glykoproteiny*. Avicenum, Praha 1978.
- Schwick H. G., Haupt H.: *The Plasma Proteins IV*, 167 (1984).
- Schmid K., v knize: *Alpha₁-acid glycoprotein Genetics, Biochemistry, Physiological Functions, and Pharmacology* (Baumann P., Eap C. B., Muller W. E., Tillemant J. P., ed.), str. 7. Alan R. Liss, New York 1989.
- Schultz D. R., Arnold P. I.: *Semin. Arthrit. Rheumat.* 20, 129 (1990).
- Brdička R., Březina M., Kalous V.: *Talanta* 12, 1149 (1965).

9. Mehl J., Golden F., Winzler R. J.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 72, 110 (1949).
10. Kalous V.: Collect. Czech. Chem. Commun. 19, 1039 (1954).
11. Weimer H. F., Mehl J. W., Winzler R. J.: J. Biol. Chem. 185, 561 (1950).
12. Schmid K.: J. Am. Chem. Soc. 75, 60 (1953).
13. Bezkorovainy A., Winzler R. J.: Biochim. Biophys. Acta 49, 559 (1961).
14. Kalous V., Poncová M.: Collect. Czech. Chem. Commun. 30, 737 (1965).
15. Karpenko V., Pavlíček Z., Kalous V.: Biochim. Biophys. Acta 154, 245 (1968).
16. Smith K. D., Elliott M. A., Elliott H. G., McLaughlin C. M., Wightman P., Wood G. C.: J. Chromatogr., B 661, 7 (1994).
17. Treuheit M. J., Costello C. E., Halsall H. B.: Biochem. J. 283, 105 (1992).
18. Smid K., Kaufman H., Satoko I., Bauer F., Emura J., Motoyama T., Ishiguro M., Nanno S.: Biochemistry 12, 2711 (1973).
19. Schmid K., Burgi W., Collins J. H., Nanno S.: Biochemistry 13, 2694 (1974).
20. Schmid K., Nimberg R. B., Yamaguchi H., Binette J. P.: Biochim. Biophys. Acta 492, 291 (1977).
21. Yoshima H., Matsumoto A., Mizuochi T., Kawasaki T., Kobata J.: J. Biol. Chem. 256, 8476 (1981).
22. De Graaf T. W., Van Ommen E. C. R., Van der Stelt M. E., Kerstens P. J. S. M., Boerbooms A. M. T., Van Dijk W.: J. Rheumatol. 21, 2209 (1994).
23. Van Dijk W., Havenaar E. C., Brinkman-Van der Linden E. C. M.: Glycoconjugate J. 12, 227 (1995).
24. Yuasa I., Suenaga K., Umetsu K.: Hum. Genet. 77, 255 (1987).
25. Günter H.: *NMR Spectroscopy*, 2. vyd. Wiley, Chichester 1995.
26. Sanders K. M., Hunter B. K.: *Modern NMR Spectroscopy*, 2. vyd. Oxford Univ. Press, Oxford 1993.
27. Šraml J.: *Dvourozměrná NMR*. Academia, Praha 1978.
28. Van Halbeek H., v knize: *Guide to Techniques in Glycobiology* (Lennarz W. J., Hart G. W., ed.), sv. 230. Academic Press, San Diego 1996.
29. Bell J. D., Brown J. K., Nicholson J. K., Sadler P. J.: FEBS Lett. 215, 311 (1987).
30. Fournet B., Montreuil J., Stecker G., Dorland L., Haverkamp J., Vliegenthart J. F. G., Binette J. P., Schmid K.: Biochemistry 17, 5206 (1978).
31. Schmid K., Binette J. P., Dorland L., Vliegenthart J. F. G., Fournet B., Montreuil J.: Biochim. Biophys. Acta 581, 356 (1979).
32. Grootveld M., Claxson A. W. D., Chander Ch. L., Haycock P., Blake D. R., Hawkes G. E.: FEBS Lett. 322, 266 (1993).
33. Nicholson J. K., Foxall P. J. D., Spraud M., Farrant R. D., Lindon J. C.: Anal. Chem. 67, 793 (1995).
34. Townsend R. R., v knize: *Biological Mass Spectrometry* (McCloskey J. A., ed.). Elsevier, Amsterdam 1990.
35. Kalous V.: *Základy fyzikálně chemických metod*. SNTL, Praha 1986.
36. Zdráhal Z., Plocek J., Konečný P., Chmelík J.: Chem. Listy 91, 811 (1997).
37. Havlíček V., Jegorov A., Sedmera P., Ryska M.: Chem. Listy 91, 2 (1997).
38. Sutton Ch. W., O'Neil J. A., Cottrel J. S.: Anal. Biochem. 218, 34 (1994).
39. Hunter A. P., Games D. E.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 9, 42 (1995).
40. Stubbs H. J., Shia M. A., Rice K. G.: Anal. Biochem. 247, 357 (1997).
41. Dage J. L., Ackermann B. L., Halsall H. B.: Glycobiology 8, 755 (1998).
42. Dage J. L., Sun H., Halsall H. B.: Anal. Biochem. 257, 176 (1998).
43. Barron L. D.: Adv. Spectrosc. 21, 235 (1993).
44. Hug W.: Chimia 48, 386 (1994).
45. Barron L. D., Ford S. J., Bell A. F., Wilson G., Hecht L., Cooper A.: Faraday Discuss. Chem. Soc. 99, 217 (1994).
46. Bell A. F., Ford S. J., Hecht L., Wilson G., Barron L. D.: Int. J. Biol. Macromol. 16, 277 (1994).
47. Sokolov K. V., Byramova N. E., Mochalova L. V., Tuzikov A. B., Shivan S. D., Bovin N. V., Nabiev I. R.: Appl. Spectrosc. 47, 535 (1993).
48. Kálal P., Kalous V.: Collect. Czech. Chem. Commun. 49, 165 (1984).
49. Karpenko V., Horálková J., Kodíček M.: Collect. Czech. Chem. Commun. 59, 2190 (1994).
50. Karpenko V., Horálková J., Kodíček M.: Collect. Czech. Chem. Commun. 62, 1533 (1997).
51. Svobodová X., Karpenko V., Kalous V.: Collect. Czech. Chem. Commun. 42, 1742 (1977).
52. Anzenbacher P., Hudeček J.: Chem. Listy 75, 180 (1981).
53. Karpenko V., Šinkorová L., Janáčková L.: Collect. Czech. Chem. Commun. 58, 2701 (1993).
54. Yamagami K., Schmid K.: J. Biol. Chem. 242, 4176 (1967).
55. Aubert J.-P., Loucheux-Lefebvre M. H.: Arch. Biochem. Biophys. 175, 400 (1976).
56. Karpenko V., Šinkorová L., Kodíček M.: Collect. Czech. Chem. Commun. 57, 641 (1992).
57. Kodíček M., Infazón A., Karpenko V.: Biochim. Biophys. Acta 1246, 10 (1995).
58. Hof M., Vajda S., Fidler V., Karpenko V.: Collect. Czech. Chem. Commun. 61, 808 (1996).

V. Kalous (Malostranské nám. 10, Prague): Structure of Orosomuroid – An Example of the Study of a Glycoprotein Investigated by Physicochemical Methods

Up-to-date information acquired by physicochemical methods (NMR, MS, ROA, TPDS) about structure of orosomuroid (α -1 acid glycoprotein) helps biochemists to deal with problems in which glycoproteins are involved.