



УДК 577.32

© 2008

Л. Ф. Суходуб, М. Гелінські, О. М. Калінкевич, Р. Рюль,  
А. Шпрінгер, М. Ліншайд, В. Помпе

**Роль неколагенових білків у *in vitro* мінералізації:  
дослідження зв'язування кальцію з остеокальцином  
методом наноспрей мас-спектрометрії**

(Представлено академіком НАН України С. В. Комісаренком)

*The NSI-MS technology is used to study the calcium-osteocalcin (OC) and calcium phosphate-OC interactions and the influence of the most abundant noncollagenous protein of bone on the in-vitro mineralization. NSI-FTICR mass spectra show peaks of osteocalcin in pure and oxygenated forms. Both forms are shown to bind three Ca<sup>2+</sup> ions per one OC molecule. Binding with pure OC is characterized by much stronger interactions due to the possible ionic bridging with Gla residues of the OC molecule. The previous NSI-FTICR studies of the more complicated OC + Ca/P system demonstrate the presence of small stable calcium-phosphate clusters bound with OC.*

Остеокальцин (ОК) є основним, найбільш поширеним неколагеновим білком міжклітинного матриксу кісткової тканини. Первинна структура ОК серед хребетних характеризується високою консервативністю. ОК складаються з 46–50 амінокислот (у людини — 49) та містять три залишки  $\gamma$ -карбоксільованої глутамінової кислоти (Gla) у позиціях 17, 21 та 24. Точний молекулярний механізм дії цього білка досі не з'ясований. Відомо, однак, що ОК впливає на біомінералізацію через його здатність з високою спорідненістю зв'язуватись з гідроксилapatитом (ГА), що складає мінеральну фазу кісток та зубів [1–4]. Крім того, ОК виконує сигнальну роль у взаємодії остеокластів та остеобластів.

Нещодавно методом рентгеноструктурного аналізу на роздільній здатності 2,0 Å була розшифрована структура свинячого ОК [5]. Показано, що свинячий ОК утворює щільну глобулярну структуру, яка складається з N-кінця, трьох  $\alpha$ -спіралей ( $\alpha_1 - \alpha_3$ ) та короткого витягнутого ланцюга. Три залишки Gla розташовані на поверхні  $\alpha_1$ -спіралі, разом із залишком Arg-30 з цієї самої спіралі вони координують п'ять іонів Ca<sup>2+</sup>, з утворенням сандвіч-структури з цих іонів та двох молекул свинячого ОК (рис. 1). Ці зв'язані іони Ca<sup>2+</sup> відтворюють просторове розташування іонів Ca<sup>2+</sup> у площині (100) ГА (у площині, паралельній до осі c кристала) [5]. Результати <sup>1</sup>H-ЯМР досліджень бичачого ОК та зв'язування

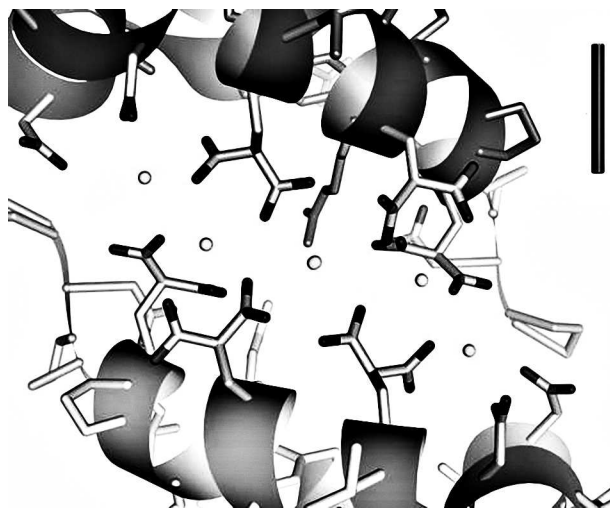


Рис. 1. Угорі та внизу ділянки  $\alpha$ -спіралей двох різних молекул ОК. Іони  $\text{Ca}^{2+}$  позначені кульками, на  $\alpha$ -спіралях позначені залишки Gla та Asp. Масштабна лінійка справа угорі дорівнює 5 Å [5, 6]

з ним іонів кальцію [7] приводять до подібного висновку про переважну взаємодію між ОК та площиною (100) кристаліту ГА, де відстань між іонами кальцію дорівнює 9,43 Å: один атом кальцію координований трьома атомами кисню з бокових ланцюгів (два з Asp-30 та один з Gla-24); другий атом кальцію координований до чотирьох атомів кисню (два з бокового ланцюга Gla-24 та два з бокового ланцюга Gla-21); третій атом кальцію координований до двох атомів кисню з бокового ланцюга Gla-17.

**Мас-спектрометрія.** Після відкриття іонізації електроспреем (ESI) [8] та лазерної десорбції з матриці (MALDI) [9] мас-спектрометрія (МС) стала вельми корисною методикою у дослідженні біополімерів, таких як нуклеїнові кислоти, білки та полісахариди, комплементарною до більш традиційних біофізичних методів [10]. Нові м'якоіонізаційні методики дозволяють детектувати лабільні біохімічні модифікації біомолекул, такі як глікозилювання, карбоксилювання, окиснення та фосфорилювання. Прикладом лабільної посттрансляційної модифікації є утворення залишків Gla у ОК. Субформи ОК з різним числом залишків Gla досліджувалися за допомогою ВЕРХ (високоєфективна рідинна хроматографія)/ESI МС у комбінації з тандемною МС з електронзахватною дисоціацією (ECD) з метою локалізації залишків Gla у бичачому та людському ОК [11]. Методика MALDI також застосовувалася для характеристики ОК у сучасних та давніх зразках [12], але отримані спектри показали повне декарбоксилювання зразка під час іонізації [13]. Для мас-спектрометричної ідентифікації багатокомпонентних комплексів найбільш придатною методикою є ESI у комбінації з мас-спектрометрією іонно-циклотронного резонансу з перетвореннями Фур'є. Останнім часом за допомогою такої методики досліджували зв'язування ОК з  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  та  $\text{La}^{3+}$  [14].

Ми досліджували комплексоутворення ОК-кальцій та ОК-фосфат кальцію за допомогою наноспрей (NSI) FTICR мас-спектрометрії, щоб отримати інформацію щодо гетерогенної нуклеації фосфату кальцію на протеїні.

**Матеріали та методи.** *Приготування зразків.* Білки були придбані у формі розчину в Calciobiochem (постачання в 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,4, та 75 mM NaCl) та Biomol (постачання в 0,01 M Tris, 0,015 M хлорид натрію, 2 mM хлорид кальцію, pH 7,4, 50% гліцерин, хч).

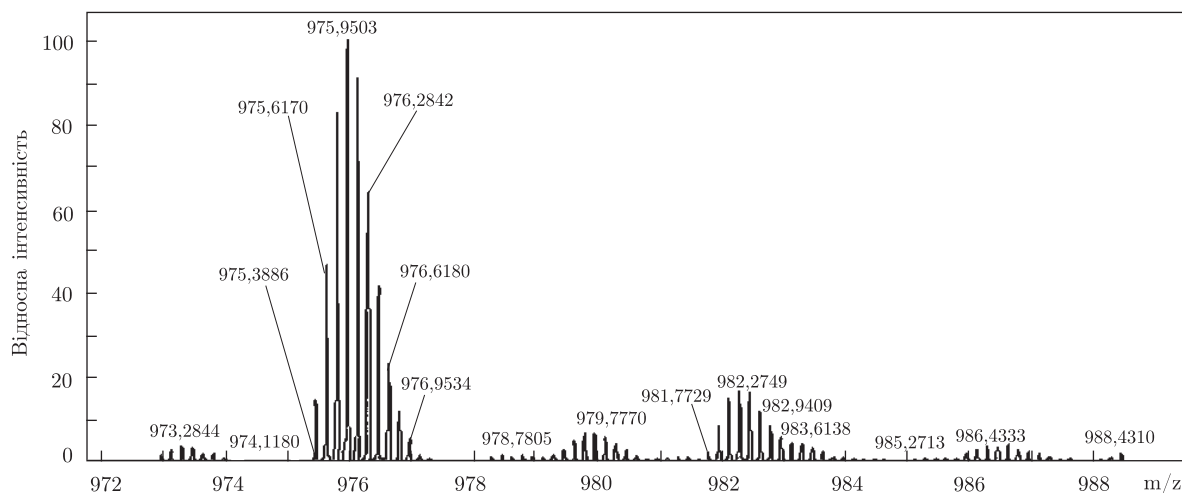


Рис. 2. Мас-спектр ESI ОК (973,28) і ОК + О (близько 975,95), ОК + Са (979,77) та ОК + О + Са (982,27)

Перед вимірюваннями вихідний розчин ОК діалізували (мембрана 2 кДа) проти ультрачистої води (18,2 кОм) протягом 12 год та розводили до необхідної концентрації за допомогою ультраочищеної води, розчину  $\text{CaCl}_2$  (рН 7,4) та  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (з  $\text{HCl}$  до рН 7,4) і насичували фосфатом кальцію. Для поліпшення якості мас-спектрів додавали 0,1% розчин мурашиної кислоти. Концентрація ОК була постійною в усіх вимірюваннях — 0,23 пмоль/мкл.

**NSI-MS.** Мас-спектрометричні дослідження ОК та його комплексів з іонами кальцію та фосфатами кальцію проводили на гібридній установці NSI-FTICR-MS (Finnigan LTQ FTMS, Thermo Electron Co., Бремен). Параметри NSI: напруга спрею 1,1 кВ, статичні наноголки; параметри введення: напруга/температура вхідного капіляра 40 В/210 °С; інші параметри: оптимізовано по тетрапептиду (MRFA), параметри FTICR: масова точність з використанням зовнішнього калібрування 4 ppm, роздільна здатність близько 100 000 при  $m/z$  400, число інжектів іонів  $5 \cdot 10^5$ .

**Результати дослідження та їх обговорення.** *Вимірювання чистого ОК.* На рис. 2 наведено область шестизарядних іонів ОК. Молекулярні іони  $(M + 6H)^{6+}$  відповідають молекулі з середньою та моноізотопною масою 5833,70 і 5830,68 відповідно, що збігається з очікуваними середньою та моноізотопною молекулярними масами для ОК з трьома залишками Glu: 5834,4 та 5830,6 відповідно. На мас-спектрі також присутній інший ізотопний кластер піків (з максимумом інтенсивності для піка з  $m/z$  975,9503), який дає масу молекули, на 16,02 а. о. м. вищу від маси ОК. Ця група піків має значно вищу інтенсивність порівняно з кластером чистого ОК при даних експериментальних умовах.

На нашу думку, розглянута група піків пов'язана з іонами ОК + О. Позиція атома кисню у послідовності ОК не може бути визначена з чистого мас-спектрометричного експерименту, для цього потрібні квантово-хімічні розрахунки, які розпочаті нашою групою. Ми можемо зробити висновок, що зразок “чистого” ОК показує відносно високий вміст аддуктів з кальцієм навіть після діалізу ОК у буфері, що містить фосфати.

Ми також вивчали ті ж самі зразки ОК за допомогою MALDI-MS (рис. 3). На мас-спектрі спостерігалися одно- та двозарядні іони ОК. Однак дослідження комплексоутворення ОК за допомогою цієї методики неможливе через декарбоксілювання залишків Glu молекул ОК, що відбувається під час іонізації.

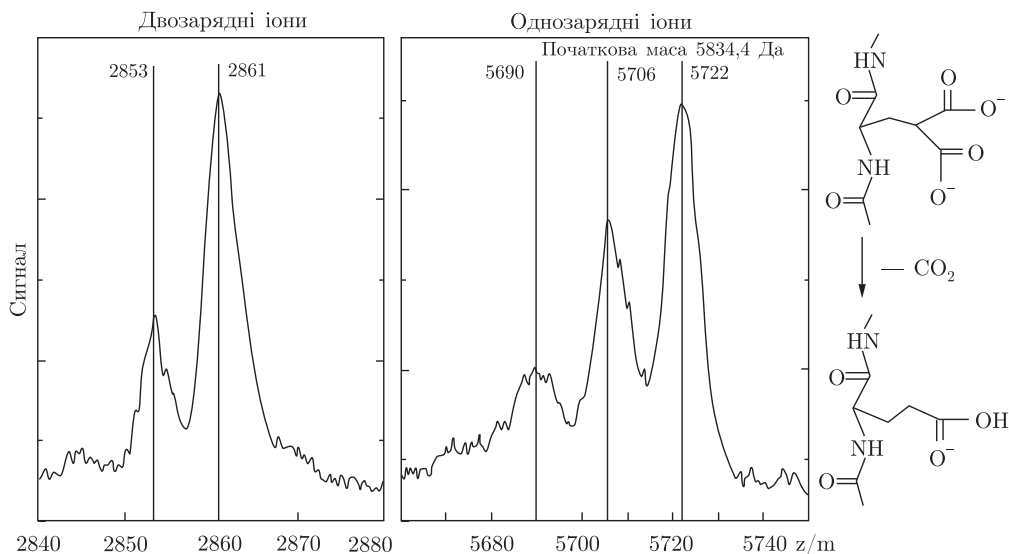


Рис. 3. Мас-спектр MALDI ОК та схема декарбоксілювання ОК під час іонізації

На мас-спектрах NSI ми спостерігаємо кілька інших цікавих піків. Можна розрізнити дві групи кластерів: ОК + 40,28 а. о. м. (пік з максимумом інтенсивності на  $m/z$  979,7770) та ОК+О + 40,6 а. о. м. (пік з максимумом інтенсивності на  $m/z$  982,2749). Виходячи зі значення маси можна припустити, що ці кластери пов'язані зі зв'язуванням одного іона  $\text{Ca}^{2+}$  з молекулами ОК та ОК + О, яке супроводжується втратою двох протонів у кожному випадку. Щоб отримати більш інтенсивні спектри, ми провели серії вимірювань ОК з  $\text{CaCl}_2$  при різних співвідношеннях концентрацій.

**Комплекси ОК- $\text{Ca}^{2+}$ .** На рис. 4 показано спектр NSI-FTICR суміші ОК +  $\text{CaCl}_2$ , що містить 0,025% мурашиної кислоти. На цьому спектрі розрізняються дві групи кластерів: ОК +  $(\text{Ca}^{2+})_n$ , де  $n = 0, 1, 2$ , — піки максимальної інтенсивності з  $m/z$  973,454; 979,611; 985,935, та ОК + О +  $(\text{Ca}^{2+})_n$ ,  $n = 0, 1, 2$ , — піки максимальної інтенсивності з  $m/z$  975,951; 982,274; 988,598. Кластери, що дають найсильніший сигнал у спектрі, відповідають іонам ОК+О+ $\text{Ca}^{2+}$ . Відношення інтенсивностей піків ОК+О до піків ОК становить 50 : 2. Однак "чиста" форма ОК характеризується більш сильною взаємодією з іонами кальцію. Відношення інтенсивностей піків іонів ОК до інтенсивностей піків іонів ОК +  $\text{Ca}^{2+}$  для випадку з першим іоном кальцію становить 12 : 2 (чистий ОК) та 100 : 50 (окиснена форма ОК) (див. рис. 4). Таким чином, можна зробити висновок, що окиснена форма ОК має значно меншу спорідненість до іонів кальцію порівняно з чистою формою. Неокиснена форма ОК характеризується значно сильнішим зв'язуванням з іонами кальцію, оскільки, вірогідно, групи  $\text{COO}^-$  залишків Glu включені в специфічне комплексоутворення.

Подальші експерименти були проведені зі значно більшими концентраціями  $\text{CaCl}_2$  у сумішах ОК +  $\text{CaCl}_2$ . На всіх отриманих мас-спектрах розрізняються дві групи піків: окиснена форма ОК з трьома іонами кальцію та ОК з тим же числом іонів кальцію, але без додаткового атома кисню. Співвідношення інтенсивностей відповідних піків становить:

з О: 100 (0 Ca, 6 H) : 50 (1 Ca, 4 H) : 9 (2 Ca, 2 H) : 0,8 (3 Ca, 0 H);

без О: 60 (0 Ca, 6 H) : 100 (1 Ca, 4 H) : 100 (2 Ca, 2 H) : 60 (3 Ca, 0 H).

Це свідчить про те, що третій іон кальцію також зв'язується переважно з чистим ОК порівняно з окисненою формою ОК. Причина такого сильного зв'язування, найімовірніше,

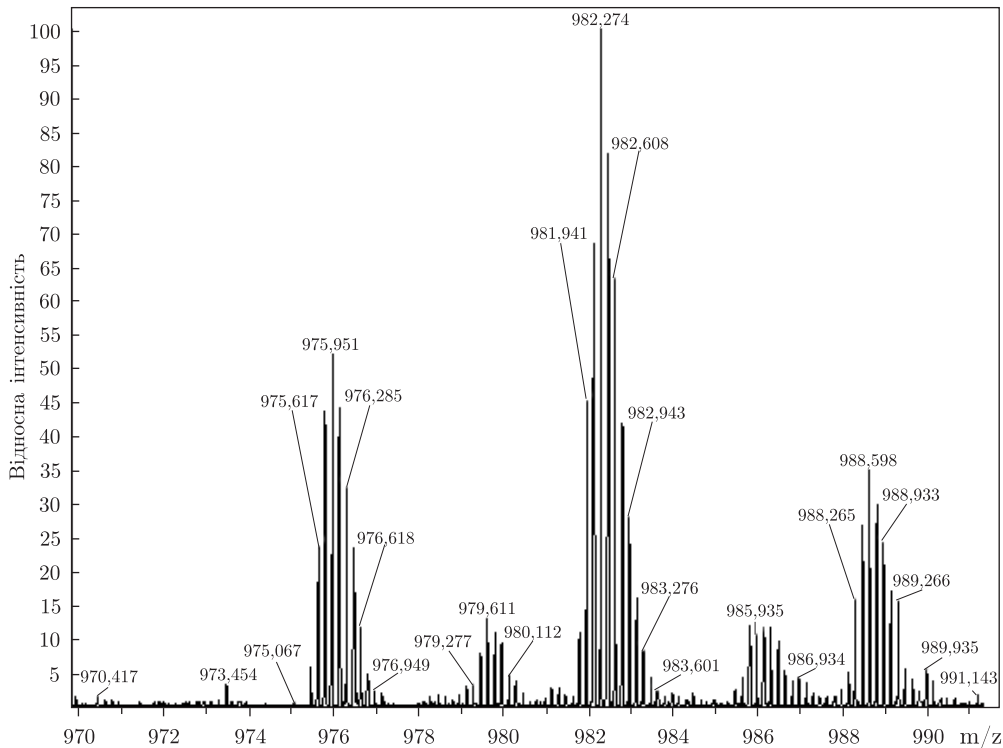


Рис. 4. Мас-спектр ESI ОК з CaCl<sub>2</sub>

пов'язана з тим, що всі три іони кальцію стабілізовані іонними містками із залишками Gla-24, Gla-21 та Gla-17 пептиду ОК [5].

*Комплекси ОК-Са/Р.* Отримані мас-спектри NSI-FTICR (не зображені на рисунках) суміші ОК з насиченим розчином фосфату кальцію з додаванням 0,02% МК та зарядовим станом +5 відображають найперші кроки енуклеації фосфату кальцію на ОК. Наприклад, піки в районі 1194 та 1203, найбільш вірогідно, пов'язані з комплексами  $[Ca^{2+} \dots (HPO_4)^{2-}]^0$  та  $[Ca^{2+} \dots (HPO_4)^{2-} \dots Ca^{2+}]^{2+}$  або  $[Ca^{2+} \dots (PO_4)^{3-} \dots Ca^{2+}]^+$ , що можна розглядати як найменші агрегації при асоціації іонів фосфатів кальцію у водних розчинах, подібні до описаних за допомогою квантово-хімічного та молекулярно-механічного моделювання, що проводив Zahn [15]. Ми припускаємо, що спостережувані ефекти викликані специфічними нековалентними взаємодіями протеїну (ОК) з іонами кальцію. Отже, завдяки високій спорідненості ОК до фосфату кальцію макромолекула ОК закріплюється на поверхні кристала, що росте. У результаті ОК набуває здатності покривати ділянки росту і таким чином перешкоджати подальшій інкорпорації кальцію та фосфатів у кристаліт нативних кісток. Наявність інших ділянок кислих амінокислот у молекулі ОК та характер комплексоутворення [ОК–О — іон кальцію] у мас-спектрометричному експерименті (див. рис. 4) наводять на думку про додатковий вплив середньої частини білкової молекули ОК у інгібуванні росту мінералу.

Таким чином, нами досліджено взаємодію кальцій-остеокальцин та фосфат кальцію-остеокальцин *in vitro* за допомогою мас-спектрометрії NSI-FTICR. Показано, що мас-спектри NSI-FTICR містять піки остеокальцину в "чистій" та окисненій формах. Обидві форми зв'язують три іони Ca<sup>2+</sup> на молекулу ОК. Зв'язування чистого ОК характеризується більш

сильною взаємодією завдяки можливим іонним місткам із залишками Gla у ОК. Перші дослідження NSI-FTICR більш складної системи ОК + Ca/P свідчать про наявність малих стабільних кальційфосфатних кластерів, зв'язаних з ОК.

*Автори висловлюють вдячність DFG Mercator та DFG-SPP за фінансову підтримку гранту Л. Ф. Суходуба, а також д-ру Д. Куклінгу за вимірювання за допомогою мас-спектрометрії MALDI та корисну дискусію.*

1. Hauschka P. V., Lian J. B., Cole D. E. C., Gundberg C. M. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone // *Physiol. Rev.* – 1989. – **69**. – P. 90–1047.
2. Hauschka P. V., Wians F. H. jr. Osteocalcin-hydroxyapatite interaction in the extracellular organic matrix of bone // *Anat. Rec.* – 1989. – **224**. – P. 180–188.
3. Bradt J. H., Mertig M., Teresiak A., Pompe W. Biomimetic mineralization of collagen by combined fibril assembly and calcium phosphate formation // *Chem. Mater.* – 1999. – **11**. – P. 2694–2701.
4. Flade K., Lau C, Mertig M., Pompe W. Osteocalcin-controlled dissolution-precipitation of calcium phosphate under biomimetic conditions // *Chem. Mater.* – 2001. – **13**. – P. 3596–3602.
5. Hoang Q. Q., Sicheri F., Howard A. J., Yang D. S. C. Bone recognition mechanism of porcine osteocalcin from crystal structure // *Nature*. – 2003. – **425**. – P. 977–980.
6. Pettersen E. F., Goddard T. D., Huang C. C. et al. UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis // *J. Comput. Chem.* – 2004. – **25**. – P. 1605–1612.
7. Dowd T. L., Rosen J. F., Li L., Gundberg C. M. The three-dimensional structure of bovine calcium ion bound osteocalcin using  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy // *Biochemistry*. – 2003. – **42**. – P. 7769–7779.
8. Yamashita M., Fenn J. B. Electrospray Ion Source. Another Variation on the Free-Jet Theme // *J. Phys. Chem.* – 1984. – **88 (20)**. – P. 4451–4459.
9. Karas M., Hillenkamp F. Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10000 Daltons // *Anal. Chem.* – 1988. – **60**. – P. 2299–2301.
10. Sukhodub L. F. Soft-ionization mass spectrometry study of deoxynucleoside bioclusters and deoxynucleoside-antitumor medicinal preparation clusters // *Mass Spectrom. Rev.* – 1995. – **14**. – P. 235–254.
11. Niiranen H., Budnik B. A., Zubarev R. A. et al. High-performance liquid chromatography-mass spectrometry and electron-capture dissociation tandem mass spectrometry of osteocalcin. Determination of  $\gamma$ -carboxyglutamic acid residues // *J. Chromatogr. A*. – 2002. – **962**. – P. 95–103.
12. Ostrom P. H., Schall M., Gandhi H. et al. New strategies for characterization ancient proteins using matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry // *Geochim. et cosmochim. acta*. – 2000. – **64 (6)**. – P. 1043–1050.
13. Kelleher N. L., Zubarev R. A., Bush K. et al. Localization of labile posttranslational modifications by electron capture dissociation: the case of  $\gamma$ -carboxyglutamic acid // *Anal. Chem.* – 1999. – **71**. – P. 4250–4253.
14. Nousiainen M., Derrick P. J., Kaartinen M. T. et al. A mass spectrometric study of metal binding to osteocalcin // *Chem. & Biolog.* – 2002. – **9**. – P. 195–202.
15. Zahn D. Mechanisms of calcium and phosphate ion association in aqueous solution // *Z. anorg. und allg. Chem.* – 2004. – **630**. – P. 1507–1511.

*Інститут прикладної фізики НАН України, Суми  
Дрезденський технічний університет, Німеччина  
Берлінський університет ім. Гумбольдта, Німеччина*

*Надійшло до редакції 15.01.2008*