

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.122

©Коллектив авторов

ИЗУЧЕНИЕ ЖЕЛАТИНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ В БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЯХ, ПОЛУЧЕННЫХ ЭЛЕКТРОФОРЕЗОМ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ.

*Л.И. Ковалев¹, П.З. Хасигов², П.Г. Рубачев², Л.И. Обельчук², С.В. Грачев²,
М.А.Ковалева¹, С.С.Шишкин¹.*

¹ Медико-генетический научный центр РАМН, 115478, Москва,
ул. Москворечье .1; факс: (095) 324-07-02

² Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова, 119881, Москва.
Б. Пироговская ул., 2/6; (095)248-01-81

Представлена модификация метода определения желатиназной активности белковых фракций, полученных одно - и двухмерным электрофорезом в полиакриламидном геле. Показано присутствие фракции 115-125 кДа среди белков коркового вещества и клубочков почек человека, а также в ткани миокарда, обладающей желатиназной активностью.

Ключевые слова: желатиназа, зимограммы, модификации метода, ткани человека.

ВВЕДЕНИЕ. Системные исследования белков отдельных биологических видов, включая человека, стали основой протеомики - сравнительно молодой и активно развивающейся дисциплины [1-3]. Электрофоретические методы фракционирования и, прежде всего, различные модификации двумерного электрофореза по О'Фарреллу в сочетании с тонким анализом индивидуальных свойств белков, который основывается на секвенировании фрагментов аминокислотной последовательности и на иммунохимическом тестировании, а также (где возможно) на определении функциональной активности и т.д., позволили описывать и характеризовать многие тысячи белков, создавая белковый комплемент генома для определенного вида организмов. Так, сравнительно недавно был построен протеом дрожжей [4], а исследования протеома человека постоянно интенсифицируются [5,6]. В связи с этим разработки методов определения энзиматических свойств белков, получаемых электрофоретическим фракционированием различных экстрактов, приобретают особенное значение.

Известно, что способностью гидролизовать желатин обладает группа протеолитических ферментов, относящихся к семейству металлопротеиназ матрикса [7]. Эти ферменты принимают участие в процессах деградации фибриллярных коллагенов, они могут расщеплять коллагены разных типов, а также эластин,

фибронектин, ламинин и др., что дает основание думать об их вовлечении в метаболизм базальных мембран [8]. Особый интерес вызывают наблюдения об увеличении желатиназной активности в метастазирующих опухолях [9]. Очевидно, что исследования желатиназной активности в белковых фракциях, полученных электрофорезом в полиакриламидном геле, позволят дополнить арсенал протеомных методов и расширят изучение металлопротеиназ матрикса.

В данной работе представлена модификация метода определения желатиназной активности в белковых фракциях, полученных электрофорезом в полиакриламидном геле, и показано присутствие желатиназ среди белков клубочков почек человека.

МЕТОДИКА. Определение желатиназной активности проводили в специально приготовленных пластинах полиакриламидного геля (ПААГ), которые содержали желатин в концентрации 0,1% или 0,2%. В работе использовался 10% фармакопейный желатин отечественного производства.

Пластины ПААГ получали, создавая градиент концентрации акриламида (от 5% до 25%) из "легкого" и "тяжелого" растворов полимеризационной смеси, как описано ранее [10]. Непосредственно перед формированием пластин ПААГ в оба эти раствора добавляли разогретый 10% раствор желатина до достижения требуемой концентрации. После полимеризации пластины ПААГ использовались в электрофоретическом анализе различных белковых образцов. Среди них препарат коллагеназы из *Cl. histolyticum* ("Sigma" США) применялся в качестве стандартного образца фермента с желатиназной активностью. Кроме того, определение активности проводилось также в белковых экстрактах, полученных из аутопатов миокарда и почки человека, а также ряда морфологических структур нефрона человека, которые выделяли, как описано ранее [11].

Образцы аутопсийных тканей со сроком аутолиза не более 3 ч и препарат коллагеназы (стандарт) гомогенизировали или растворяли в различных растворах: а) буфере Лэммли с 30% глицерина, б) буфере Лэммли с 30% мочевиной, в) в лизис-буфере, включающем 8 М мочевины, 5% меркаптоэтанола, 2% тритона X-100 и 2% амфолинов pH 3,5-10 [10].

Пробы, содержащие от 1 до 250 мкг белка, фракционировали одномерным электрофорезом по Лэммли или двумерным электрофорезом по О'Фарреллу в модификации, описанной ранее [10]. Содержание белка в экстрактах определяли методом Флорес [12].

Пластины ПААГ после завершения фракционирования для удаления избытка додецилсульфата Na отмывали в 2% р-ре тритона X-100, затем проводили протеолиз, инкубируя в течение 24 час или 48 час при 37 °С, и окрашивали Кумас-си голубым R-250, как описано ранее [10].

После отмывки несвязавшегося красителя в дистиллированной воде гели фотографировали и сканировали на денситометре Ultrascan XL (фирма LKB, Швеция).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. При фракционировании белков различными высокоразрешающими электрофоретическими методами обычно используются растворы, содержащие детергенты и другие денатурирующие агенты, которые инактивируют или ингибируют действие многих ферментов. Особенно жесткому воздействию подвергаются белки при фракционировании двумерным электрофорезом по О'Фарреллу, поскольку в этой методике применяются 8 М мочевины, 2-меркаптоэтанол, тритон X-100, додецилсульфат Na [13]. Для того, чтобы оценить влияние указанных соединений на определение желатиназной активности в белковых фракциях, полученных электрофорезом в ПААГ, вначале была проведена серия экспериментов с использованием препарата коллагеназы из *Cl. histolyticum* в качестве стандартного образца фермента с желатиназной активностью. По результатам предварительных опытов была разработана модификация, отличающаяся от предыдущих методик [14-17] следующим: повышенным содержанием желатина в пластине ПААГ (0,2% вместо 0,1%) и большей концентрацией тритона X-100 в отмывочном буфере (2% вместо

0,2%). Кроме того, для удаления несвязавшегося красителя применяли дистиллированную воду, а не смесь 10% уксусной к-ты и 25% изопропанола. Вместе все это обеспечило резкое усиление контрастности зимограмм и получение четких зон ферментной активности (рис. 1).

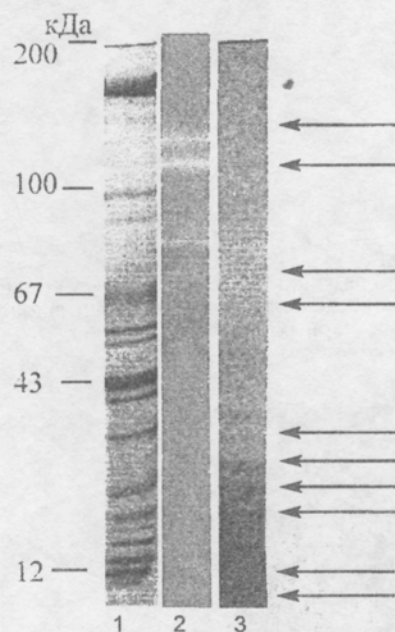


Рисунок 1.

Зимограмма препарата коллагеназы *Cl. histolyticum* в одномерном электрофорезе (2) в буфере содержащем 30% глицерин или 30% мочевины и (3) в лизис-буфер по О'Фарреллу. Дорожка 1 - стандарт мол.массы (миокард человека). Стрелками отмечены фракции, проявляющие желатинолитическую активность.

Как видно из рис.1, стандартная коллагеназа сохраняла желатинолитическую активность после нахождения в растворах а и б, содержащих мочевины, меркаптоэтанол и SDS. При одномерном электрофорезе этот препарат давал две основные и две минорные зоны активности с молекулярными массами 110 и 102 кДа, а также 80 и 70 кДа, соответственно. Более того, по результатам денситометрии обнаружилась линейная зависимость активности фермента от количества белка, внесенного в пробу для фракционирования в диапазоне концентраций от 1 до 5 мкг, что, в принципе, позволяет проводить таким способом количественное определение активности. Вместе с тем при использовании раствора в спектр белковых полос, проявляющих ферментативную активность, менялся. Появилось не менее 5 дополнительных фракций с мол.массой от 12,5 до 70 кДа при уменьшении количества материала в основных фракциях (рис.1).

После двумерного электрофореза по О'Фарреллу функциональная активность коллагеназы из *Cl. histolyticum* уверенно определялась и давала картину, сопоставимую с данными одномерного электрофореза (рис.2).

В ряде работ попытки прямого определения активности желатиназ в различных нормальных тканях человека или биологических жидкостях (сыворотка крови, кистозная жидкость, моча) показали, что обычно требуется не менее, чем 20-кратное концентрирование образцов анализируемого объекта [14-17].

В нашем исследовании при использовании модифицированного метода определения активности в образцах миокарда, суммарной почки, корковом и мозговом веществе, а также в выделенных клубочках почки человека после проведения одномерного электрофореза, удалось детектировать специфическую активность в препарате клубочков (рис.3),

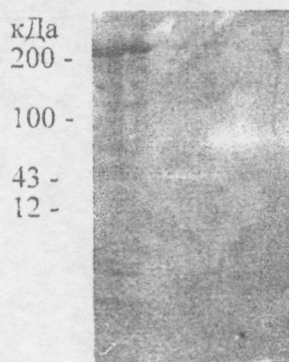


Рисунок 2.

Фрагмент зимограммы коллагеназы *Cl. histolyticum* по результатам двумерного фракционирования. Отмечены стрелками пятна коллагеназы, проявляющие желатинолитическую активность. Сбоку указаны значения молекулярных масс.

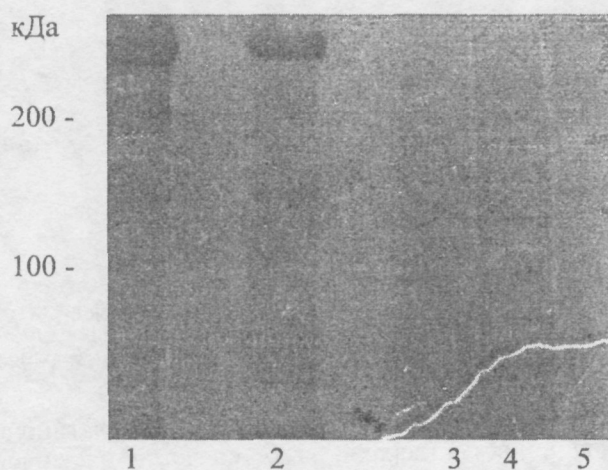


Рисунок 3.

Фрагмент одномерной зимограммы препарата тканей человека: 1,2 дорожки - ткань сердца человека с разной количественной нагрузкой, 3 - мозговое вещество почки человека, 4 - корковое вещество почки, 5 - клубочки почки. Сбоку указаны значения молекулярных масс.

где обнаруживалась полоса с мол.массой в 115-120 кДа, соответствующая по этому параметру желатиназе В. Кроме этого соответствующая фракция детектировалась в ткани коркового вещества почки и в ткани миокарда. В последней она имела несколько большую мол. массу – 120-125 кДа. Таким образом, предложенная модификация обеспечивает повышение чувствительности анализа желатиназной активности и позволяет выявлять напрямую специфическую активность желатиназ в некоторых тканях человека.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Арчаков А.И. (2000) *Вопр. мед.химии*, **46**, 335-343.
2. Шишкин С.С., Ковалев Л.И., Громов П.С. (2000) "Функциональная геномика человека и протеомика как раздел функциональной генетики человека", Москва-Уфа. Из-во "Гилем", с.17-50.

3. Jung E., Heller M., Sanchez J.Ch., Hochstrasser G. (2000) Electrophoresis, **21**, 3369-3377.
4. Santussi A., Trabalzini L., Bovalini L., Ferro E., Neri P., Martelli P. (2000) Electrophoresis, **21**, 3717-3723.
5. Jung E., Hoogand Ch., Chiappe D., Sanchez J.Ch., Hochstrasser D. (2000) Electrophoresis, **21**, 3483-3487.
6. Gururajan R., Grenet J., Lahti J.M., Kidd V.J. (1998) Genomics. **7**, 101-106.
7. Liano E., Pendas A.M., Fueyo A., Knauer V., Murphy G., Lopez-Otin C. (1999). J. Biol. Chem., **274**, 4570-4576.
8. Wilhelm S.M., Collier I., Marmer B.L., Eisen A.Z., Grant G.A., Goldberg G. (1989) J. Biol. Chem. **264**, 2055-2060.
9. Kleiner D., Stetler-Stevenson W.G. (1999) Cancer Chemother. Pharmacol. Suppl. **S42-51**.
10. Kovalyov L.I., Shishkin S.S., Efimochkin A.S., Kovalyova M.A., Ershova E.S., Egorov T.A., Musalyamov A.K. (1995) Electrophoresis, **16**, 1160-1169.
11. Обельчук Л.И., Цомартова Д.А., Ковалев Л.И., Хасигов П.З., Рубачев П.Г., Грачев С.В., Шишкин С.С., Березов Т.Т. (1997) Биохимия, **62**, 225-234.
12. Flores R. (1978) Anal. Biochem. **7**, 605-611.
13. O'Farrell P.H. (1975) J. Biol. Chem., **250**, 4007-4021.
14. Heussen C., Dowdle E.B. (1980) Anal. Biochem. **102**, 196-202.
15. Fujimoto S., Hamai K., Sato Y., Yamamoto Y., Eto T. (1996) Nephrology. **2**, 329-317.
16. Sato Y., Fujimoto S., Hamai K., Eto T. (1998) Nephron., **78**, 195-200.
17. Rankin C.A., Itoh Y., Tiaan Ch., Ziemer D.M., Calvet J.P., Gattone V.H. (1999). J. Amer. Soc. Nephrol. **10**. 2. 210-217 5.

Поступила 14.02.01.

THE STUDY OF GELATINASE ACTIVITY IN PROTEIN FRACTIONS OBTAINED BY ELECTROPHORESIS IN POLYACRILAMIDE GELS.

L.I. Kovalyov¹, P.Z. Khasigov², P.G. Rubachev², L.I. Obelchuk², S.V. Grachev², M.A. Kovalyova¹, S.S. Shishkin¹.

¹Center of Medical Genetics, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Moskvorech'e 1, Moscow, 115478 Russia, fax (7-095) 324-07-02

²Sechenov Moscow Medical Academy, ul. B. Pirogovskaya 2/6, Moscow, 119881 Russia; fax (7-095) 248-01-81

The modification of a method of determination gelatinolytic activity in protein fractions obtained by one and two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis is presented. The presence of a fraction 115-125 kD among human proteins of cortex matter and glomerulus of kidney and also in myocardium having gelatinolytic activity is demonstrated.

Key words: gelatinase, zymography, modification of methods, human tissue