

# ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ  
УДК 577.152.3

## ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЕ ПОВЕДЕНИЕ $\beta 1$ СУБЪЕДИНИЦЫ ИНТЕГРИНА ИЗ ГЛАДКИХ МЫШЦ ЧЕЛОВЕКА.

В.М.БЕЛКИН, Н.И.КОЗЛОВА<sup>1</sup>, В.В.БЫЧКОВА<sup>1</sup>, Б.В.ШЕХОНИН<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт биомедицинской химии РАМН, 119832 Москва, Погодинская ул., 10, факс: (095) 245-08-57.

<sup>2</sup>Институт экспериментальной кардиологии, кардиологический научный центр РАМН, 121522 Москва, 3-я Череповецкая ул., 15а, факс: (095) 415-00-35.

Тотальная фракция интегринов семейства  $\beta 1$  была выделена из детергентного экстракта гладких мышц человека на колонке с иммобилизованными моноклональными антителами к  $\beta 1$  субъединице интегрин. Электрофоретический анализ и последующий иммуноблоттинг выявили ранее неописанный в литературе высокомолекулярный материал (205 кДа — невосстановленный и 230 кДа — восстановленный), иммунологически родственный  $\beta 1$  субъединице интегрин. Пептидное картирование с использованием протеиназ V-8 и  $\alpha$ -химотрипсина показало, что белок с молекулярной массой 205 кДа является димером  $\beta 1$  субъединицы интегрин, а не новой вариантной субъединицей этого интегринового семейства. Восстановление электрофоретического образца дитиотриэтолом приводило к исчезновению белковой полосы 205 кДа и увеличению  $\beta 1$  иммунореактивного материала в области 130 кДа, что свидетельствовало о дисульфидной природе димера  $\beta 1$  субъединицы интегрин. Полипептид с молекулярной массой 230 кДа оказался частично восстановленным димером  $\beta 1$  субъединицы интегрин, образованным дисульфидными связями, недоступными для действия восстанавливающих агентов. Обсуждается возможность димеризации интегриновых рецепторов *in vivo* в процессе формирования адгезивных клеточных контактов.

**Ключевые слова:**  $\beta 1$  субъединица интегрин, димеризация, дисульфидные связи.

**Введение.** Интегрины — многочисленное суперсемейство трансмембранных рецепторов, являющихся важнейшим структурно-функциональным компонентом клеточных адгезивных контактов [1]. Семейство интегринов  $\beta 1$  наиболее обширное и изученное. Молекула интегрин семейства  $\beta 1$  является гетеродимером, состоящим из  $\beta 1$  субъединицы, нековалентно связанной с различными неродственными  $\alpha$  субъединицами [1]. Недавние исследования показали, что интегрины не только специфически взаимодействуют с определенными матриксными и цитоскелетными белками, но и вовлечены в процесс передачи внутриклеточного сигнала [2]. За последние 10 лет интегрины этого семейства выделялись из различных тканей [3, 4, 5, 6], а также из меченых [7, 8, 9] и немеченых [10] культивируемых клеток. Ни в одной из работ, где выделялись или идентифицировались интегрины семейства  $\beta 1$ , не сообщается о существовании высокомолекулярного материала (более 140 кДа), иммунологически родственного  $\beta 1$  субъединице интегрин. В нашей предыдущей работе [11] было показано, что при выделении суммарного препарата интегринов семейства  $\beta 1$  на колонке с иммобилизованными антителами к  $\beta 1$  субъединице интегрин была обнаружена четкая полоса с кажущейся молекулярной массой 230 кДа (после восстановления). Белок с такой молекулярной массой не соответствовал ранее известным  $\alpha$  или  $\beta$  субъединицам интегринов. Это могла быть новая  $\alpha$  субъединица, находящаяся в составе нековалентного гетеродимера

молекулы интегрина,  $\beta 1$  вариантная субъединица интегрина или димер  $\beta 1$  субъединицы интегрина. Исходно мы предположили, что 230 кДа белок является новой вариантной  $\beta 1$  субъединицей, так как он реагировал с поликлональными антителами к  $\beta 1$  субъединице интегрина и имел молекулярную массу меньше, чем две  $\beta 1$  субъединицы интегрина (260 кДа). До настоящего времени литературные данные о существовании димеров  $\beta 1$  субъединицы интегрина отсутствуют. В данной работе было показано, что в невосстановленных условиях 230 кДа белок имеет молекулярную массу всего 205 кДа и является димером  $\beta 1$  субъединицы интегрина.

**МЕТОДИКА.** Моноклональные антитела 102DF7 против  $\beta 1$  субъединицы интегрина были получены от И.Виртанена (Department of Anatomy, Helsinki University, Finland) [12]. Кроличьи поликлональные антитела к цитоплазматическому домену  $\beta 1$  субъединицы интегрина были любезно предоставлены Г. Тароно (Department of Genetic, Biology and Medical Chemistry, University of Torino, Torino, Italy) [13]. Антисыворотку против интегрина  $\alpha \beta 1$  получали внутрикожной иммунизацией 1 мг чистого рецептора, смешанного с полным адъювантом Фрейнда "Sigma". Повторную иммунизацию проводили через четыре недели 0,5 мг антигена.  $\alpha \beta 1$  интегрин выделяли по методу, описанному ранее [14]. Антитела к  $\beta 1$  субъединице интегрина выделяли из этой сыворотки, используя в качестве афинного сорбента нитроцеллюлозные полоски с иммобилизованными  $\alpha 1$  и  $\beta 1$  субъединицами интегрина. В работе использовали козлиные антитела против IgG кролика фирмы "Amersham" (Англия).

Интегрины выделяли из гладких мышц человека (матка, операционный материал) по методу, описанному ранее [14]. Детергентный экстракт концентрировали в пять раз и пропускали через колонку объемом 3 мл, содержащую 40 мг иммобилизованных на BgCN сефарозе "Pharmacia" (Швеция) моноклональных антител 102DG7 против  $\beta 1$  субъединицы интегрина. Колонку отмывали 20 объемами хроматографического буфера: 20 mM трис-HCl, pH 7,4, 1 mM  $MgCl_2$ , 0,1 % тритон X-100, 1 M NaCl, 1 mM PMSF; 5 объемами буфера, содержащего 0,2 M  $Na_2CO_3$ , 0,1 % тритон X-100, 1 mM  $MgCl_2$ , pH 10,5 и затем 10 объемами хроматографического буфера без NaCl. Интегрины элюировали 0,2 M глицином pH 2,2 с 0,1 % тритоном X-100, элюат нейтрализовали 0,1 объема 1 M трис-HCl pH 8,5 и диализовали против хроматографического буфера без NaCl.

Электрофоретический анализ белков проводили в присутствии 0,1 % ДС-Na по методу, описанному ранее [15]. В большей части экспериментов использовали полиакриламидный гель 5-15 %. Тканевые и клеточные образцы гомогенизировали в буфере: 40 mM трис-HCl, pH 6,8, 4 % SDS, 10 % глицерин, кипятили в течение 5 мин, после чего определяли концентрацию белка при помощи реагентов фирмы "Pierce" (Англия). Каждый электрофоретический образец содержал 0,15 мг белка. После определения белка добавляли 10 mM дитиотриэтола и образцы кипятили еще 5 мин. Одномерное пептидное картирование по Кливленду [16] осуществляли с применением протеиназы V-8 из *S.aureus* и  $\alpha$ -химотрипсина "Sigma" (США). В этих опытах для электрофоретического анализа использовали градиентный гель 5-20%.

Иммуноблоттинг проводили согласно процедуре, описанной Тоубин с соавторами [17]. Места локализации антигена выявляли при помощи прямой иммунопероксидазной реакции или  $^{125}I$ -меченных вторых антител (1 мг/мл,  $5 \cdot 10^6$  имп/мг). Антитела против IgG кролика иодировали по методу с применением хлорамина Т (18) и использовали в дальнейшем для получения радиоавтографов или количе-



ственного иммуноблоттинга. Количественный иммуноблоттинг проводили как было описано ранее [11]. Иммуноблотты высушивали и экспонировали на рентгеновской пленке "Kodak" (США) в течение 24 часов при 70°C для выявления полипептидов  $\beta 1$  субъединицы. Затем участки нитроцеллюлозы, соответствующие  $\beta 1$  субъединице интегрина, вырезали, радиоактивность измеряли в  $\gamma$ -счетчике.

**Результаты и обсуждение.** Для выделения интегринов семейства  $\beta 1$  использовали колонку с иммобилизованными моноклональными антителами 102DF7 к  $\beta 1$  субъединице. Электрофоретический анализ невосстановленного образца элюата в присутствии ДС-На выявил три основные белковые полосы с кажущейся молекулярной массой 120, 195 и 205 кДа (рис. 1, 1). Основываясь на электрофоретической подвижности и результатах иммуноблоттинга белковая полоса 195 кДа была идентифицирована как  $\alpha 1$  субъединица интегрина (данные не приведены). Иммуноблоттинг выявил, что белковые полосы 120 и 205 кДа реагируют с антителами к  $\beta 1$  субъединице (рис. 1, 3). Результат иммуноблоттинга не зависел от того, использовали антитела к цитодомену или ко всей  $\beta 1$  субъединице. Известно, что 120 кДа — это кажущаяся молекулярная масса  $\beta 1$  субъединицы, в то время как белок 205 кДа, реагирующий с антителами к  $\beta 1$  субъединице интегрина, ранее не был описан в литературе. После восстановления белковая полоса 205 кДа исчезает (рис. 1, 2), а высокомолекулярный материал, реагирующий с антителами к  $\beta 1$  субъединице интегрина, мигрирует в область 230 кДа (рис. 1, 4). С помощью количественного иммуноблоттинга было установлено, что белковая полоса 230 кДа содержит приблизительно 10 % радиоактивности, обнаруживаемой в области 205 кДа до восстановления. Исчезновение белковой полосы 205 кДа также сопровождалось увеличением радиоактивности в области восстановленной  $\beta 1$  субъединицы интегрина (130 кДа). Такое изменение электрофоретической подвижности после восстановления напоминает поведение  $\beta 1$  субъединицы интегрина, кажущаяся молекулярная масса которой увеличивается со 120 кДа до 130 кДа. Хорошо известно, что это изменение в электрофоретической подвижности обусловлено разрывом многочисленных внутрицепочечных дисульфидных связей [1].  $\beta 1$  субъединица интегрина содержит 56 цистеинов (7,3%), половина из которых находятся в 180 аминокислотном цистеинбогатом домене.

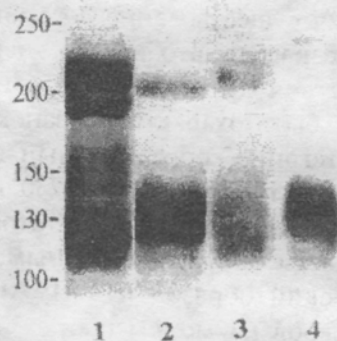


Рис. 1. Анализ интегринов семейства  $\beta 1$ . 1, 2 — окраска кумаси R-250; 3, 4 — иммуноблоттинг с поликлональными антителами к  $\beta 1$  субъединице интегрина. 1, 3 — невосстановленные образцы; 2, 4 — восстановленные образцы. Молекулярные массы маркеров 250, 200, 150, 130 и 100 кДа отмечены слева.

Возможны два объяснения полученных данных. Первое состоит в том, что 205 кДа белок является димером  $\beta 1$  субъединицы интегрина. Второе объяснение предполагает, что данный белок является новой вариантной формой  $\beta 1$  субъединицы интегрина. Для выяснения, какое из этих предположений верно, мы провели одномерное пептидное картирование по методу Кливленда [16]. Куски геля, соответствующие белковым полоскам 120 и 205 кДа, были вырезаны из геля после проведения первого электрофореза и проанализированы во втором. Протеолитическое расщепление протеазами V8 и  $\alpha$ -химотрипсином продемонстрировало наличие идентичных полипептидов (данные не приведены). Исходя из результатов этого опыта, было сделано заключение, что белок 205 кДа является димером  $\beta 1$  субъединицы интегрина, а не новой вариантной субъединицей.

Неожиданные результаты были получены в контрольных трэках, где анализируемые 120 и 205 кДа полипептиды не подвергались обработке протеазами. В обоих случаях наблюдался один и тот же набор белковых полос: 120 кДа — мономер  $\beta 1$  субъединицы интегрина, 205 кДа — димер  $\beta 1$  субъединицы интегрина, а также полоса 290 кДа (рис. 2А, 1 и 2). Картина иммуноблоттинга с антителами к  $\beta 1$  субъединице интегрина была идентична окрашиванию геля серебром. Из полученных данных следует, что белковая полоса 290 кДа также реагирует с антителами к  $\beta 1$  субъединице интегрина и может быть идентифицирована согласно ее молекулярной массе, как тример  $\beta 1$  субъединицы интегрина. В результате этого опыта было обнаружено, что в процессе электрофореза в присутствии ДС-На мономер  $\beta 1$  субъединицы интегрина может легко образовывать димеры и тримеры. С другой стороны, димеры  $\beta 1$  субъединицы интегрина частично распадаются до мономеров. Количественный иммуноблоттинг с  $^{125}\text{I}$  мечеными вторыми антителами показал, что соотношение радиоактивности между мономером, димером и тримером практически не зависело от того, 120 или 205 кДа форма  $\beta 1$  субъединицы интегрина подвергалась анализу во втором электрофорезе (табл. ). По-видимому, в процессе проведения второго электрофореза устанавливается количественное равновесие между мономерной, димерной и тримерной формами.

Как следует из данных электрофореза (рис. 1) и количественного иммуноблоттинга, восстановление электрофоретического образца приводит к перемещению большей части  $\beta 1$  иммунореакционного материала из области димера (205 кДа) в область мономера (130 кДа). Наиболее вероятное объяснение этого факта состоит в том, что 205 кДа форма  $\beta 1$  субъединицы интегрина является дисульфидносвязанным димером. В то же время существование восстановленного димера  $\beta 1$  субъединицы интегрина (230 кДа) означает, что не все дисульфидные связи между мономерами доступны для действия дитиотриэтола (рис. 1, 2 и 4). Таким образом, полипептид 230 кДа может быть охарактеризован как частично восстановленный димер  $\beta 1$  субъединицы интегрина, образованный за счет дисульфидных связей. Другая возможность состоит в том, что белок 230 кДа является восстановленным агрегатом, а 205 кДа — невосстановленным агрегатом двух  $\beta 1$  субъединиц. Однако, это предположение представляется маловероятным, так как добавление 8 М мочевины в электрофоретический образец и в ПААГ не оказывало никакого действия на диссоциацию димеров на мономеры.



Таблица

**Количественный анализ мономерной (120 кДа) и димерной (205 кДа) форм  $\beta 1$  субъединицы интегрина во втором электрофорезе**

Форма $\beta 1$ субъединицы (первый электрофорез)	%радиоактивности (второй электрофорез)		
	120 кДа	205 кДа	290 кДа
120 кДа	71	26	3
205 кДа	65	31	4

После электрофореза элюата с анти- $\beta 1$ -сепарозы участки геля, соответствующие мономеру (120 кДа) и димеру (205 кДа)  $\beta 1$  субъединицы, вырезали из первого геля и переносили на второй. Количественный иммуноблоттинг проводили с  $^{125}\text{I}$ -мечеными антителами. За 100% принимали суммарную радиоактивность, содержащуюся в мономере, димере и тримере.

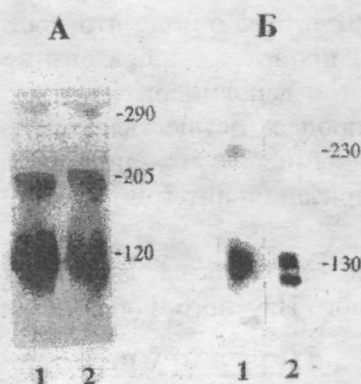


Рис. 2. Анализ мономерных и димерных форм  $\beta 1$  субъединицы интегрина. А. Участки гелей, соответствующие невосстановленным мономерной и димерной формам  $\beta 1$  субъединицы были вырезаны из первого геля и проанализированы во втором электрофорезе. Гель окрашен серебром. 1 — 120 кДа мономер  $\beta 1$  субъединицы; 2 — 205 кДа димер  $\beta 1$  субъединицы. Б. Радиоиммуноблоттинг тотальных белковых экстрактов с поликлональными антителами к цитодому  $\beta 1$  субъединицы интегрина и последующая радиоавтография. Образцы восстановлены 10 мМ дитиотриэтолом. 1 — гладкие мышцы человека (матка); 2 — эмбриональные фибропласты человека.

Как показано на рис. 2 Б, 1, восстановленный димер  $\beta 1$  субъединицы интегрина (230 кДа) может быть идентифицирован не только в обогащенных препаратах интегринов семейства  $\beta 1$ , но и в исходном экстракте гладких мышц. В образце эмбриональных фибропластов человека 230 кДа димер не был обнаружен (рис. 2 Б, 2), хотя оба трэка по данным количественного иммуноблоттинга содержали одинаковое количество  $\beta 1$  иммунореакционного материала. Радиоиммуноблоттинг образцов других тканей (сердечная мышца, кожа, мозг, печень, легкое, плацента) также не выявил полосы 230 кДа (данные не приведены). Однако, анализ этих тканей нельзя адекватно сравнить с гладкими мышцами и фибропластами, так как последние содержат существенно больше  $\beta 1$  иммунореактивного материала на одно и то же количество анализируемого белка.

Несмотря на то, что все результаты данной работы были получены в денатурирующих условиях электрофореза в присутствии ДС-НА, нельзя исключить, что димеризация интегриновых молекул за счет дисульфидных связей может происходить и *in vivo*. Этот процесс мог бы стабилизировать структуру кластеров интегриновых рецепторов в формирующихся адгезивных клеточных контактах. Класте-

рирование интегринов необходимо для активации внутриклеточного интегринзависимого ответа [19]. Другое возможное последствие димеризации интегринов может быть связано с изменением в структуре внеклеточного цистеинбогатого домена  $\beta 1$  субъединицы интегрина, что, в свою очередь, может повлиять на конформацию цитодомена. В настоящее время известна обратная ситуация, когда внеклеточные лигандные свойства интегринов регулируются посредством изменения структуры цитодомена  $\beta 1$  субъединицы интегрина [20]. Специфическая конформация интегринавого димера может быть существенна для эффективного взаимодействия с определенными цитоскелетными и протеинфосфокиназами. В заключение следует отметить, что дисульфидная димеризация рецептора является необходимой стадией в сигнальных процессах для многих полипептидных белковых ростовых факторов, включая эпидермальный и тромбоцитарный, а также инсулин [21]. Таким образом, было показано, что в условиях большой локальной концентрации денатурированной  $\beta 1$  субъединицы, что достигается во время электрофореза в присутствии ДС- $\text{Na}$ , происходит образование дисульфидносшитых димеров, часть из которых обратимо деполимеризуется на мономеры. Мы предположили, что этот равновесный процесс осуществляется за счет обратимой реакции между внутри-и межмолекулярными дисульфидными связями. Для доказательства нашего предположения о димеризации интегринов семейства  $\beta 1$  *in vivo* необходима дальнейшая работа.

Работа, изложенная в нашей статье, была частично профинансирована за счет гранта N M2N000 Международного Научного Фонда и гранта N 95-04-12953a РФФИ.

## ЛИТЕРАТУРА

- 1 Hynes R.O. // *Cell*. — 1987. — V. 48. — P. 549-554.
- 2 Juliano R.L., Haskil S.J. // *Cell Biol.* — 1993. — V. 120. — P. 577-585.
- 3 Chen W.-T., Hasegawa T. J. // *Cell Biol.* — 1985. — V. 100. — P. 1103-1114.
- 4 Petela R., Pierchbacher M.D., Argraves S., Susuki S., Ruoslahti E. *Methods in Enzymology*. — 1987. — V. 144. — P. 475-489.
- 5 Tarone G., Mascarello P., Zibetti M., Giancotti F.G. *Eur. J. Biochem.* — 1988. — V. 172. — P. 713-718.
- 6 Kelly T., Molony L., Burrige K. J. *Biol. Chem.* — 1987. — V. 262. — P. 17189-17198.
- 7 Petela R., Pierchbacher M.D., Ruoslahti E. // *Cell*. — 1985. — V. 40. — P. 191-198.
- 8 Clyman R.I., Tumer D.C., Kramer R.H. *Arteriosclerosis*. — 1990. — V. 10. — P. 402-409.
- 9 Gehlsen K.R., Dillner L., Engvall E., Ruoslahti E. // *Science*. — 1988. — V. 241. — P. 1228-1232.
- 10 Akiyama S.K., Yamada K.M. // *J. Biol. Chem.* — 1987. — V. 262. — P. 17536-17542.
- 11 Belkin V.M., Belkin A.M., Koteliarsky V.E. // *J. Cell Biol.* — 1990. — V. 111. — P. 2159-2170.
- 12 Ylanne J., Virtanen I. // *Int. J. Cancer*. — 1989. — V. 43. — P. 1126-1136.
- 13 Balzac F., Belkin A.M., Koteliarsky V.E., Balabanov Y.A., Altruda F., Silengo L., Tarone G. // *J. Cell Biol.* — 1993. — V. 121. — P. 171-178.
- 14 Белкин В.М., Белкин А.М., Дольникова А.Э., Тарасова Е.А., Котелянский В.Э. // *Биохимия*. — 1991. — Т. 56. — с. 2198-2206.
- 15 Laemmli U.K. // *Nature*. — 1970. — V. 227. — P. 680-683.
- 16 Cleveland D.W., Fischer S.G., Kirschner M.W., Laemmli U.K. // *J. Biol. Chem.* — 1977. — V. 252. — P. 1102-1106.
- 17 Towbin H., Stachelin T., Gordon J. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 1979. — V. 76. — P. 4350-4357.
- 18 Hunter W.M., Greenwood F.L. // *Ibid.* — 1962. — V. 194. — P. 495-496.
- 19 Migamoto S., Akiyama S.K., Yamada K.M. // *Science*. — 1995. — V. 267. — P. 883-885.
- 20 O'Toole T.E., Ylanne J., Culley B.M. // *J. Biol. Chem.* — 1995. — V. 270. — P. 8553-8558.
- 21 Ullrich A., Schlessinger J. // *Cell*. — 1990. — V. 61. — P. 203-212.



## ELECTROPHORETIC BEHAVIOR OF $\beta 1$ INTEGRIN SUBUNIT FROM HUMAN SMOOTH MUSCLE.

*Belkin<sup>1</sup> V.M., Kozlova<sup>1</sup> N.I., Bychkova<sup>1</sup> V.V., Chekhonin<sup>2</sup> B.V.*

1 Institute of Biomedical Chemistry, RAMN, Pogodinskaya St.10, 119832 Moscow, Russia. Fax: (7) (095) (2450854). 2 Institute of Experimental Cardiology, Cardiology Research Center, RAMN, 3-th Cherepkovskaya St. 15a, 121522 Moscow, Russia. Fax: (7) (095) (4152962).

Total fraction of  $\beta 1$  integrin family was isolated from human smooth muscle by affinity chromatography on immobilized anti- $\beta 1$  monoclonal antibodies. SDS-PAGE analysis and subsequent immunoblotting demonstrated that integrin samples contain unknown before high molecular mass (205 kD-nonreduced and 230 kD-reduced) material immunologically related to  $\beta 1$  integrin subunit. Onedimensional peptide mapping showed that the 205 kD protein is not a novel  $\beta 1$  related integrin subunit, but a  $\beta 1$  integrin subunit dimer. Reduction of electrophoretic samples with dithiothreitol led to the removal of the major part of the  $\beta 1$  immunoreactive material from 205 kD to 130 kD region, indicating a disulfide nature of  $\beta 1$  integrin subunit dimer. The 230 kD protein turned out to be an only partly reduced  $\beta 1$  integrin disulfide bonded dimer. Possible in vivo existence of the disulfide bonded dimer and oligomer integrin forms is discussed.

**Key words:**  $\beta 1$  integrin subunit; Dimerization; Disulfide bonds.