

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.152.3

© Коллектив авторов

ОГРАНИЧЕННЫЙ ПРОТЕОЛИЗ ИНТЕГРИНА $\alpha\nu\beta 3$ ИЗ ПЛАЦЕНТЫ ЧЕЛОВЕКА.

О.Н. ЛУБКОВА¹, Т.А. ГУРЕЕВА², Э.А. ДИЛАКЯН², Н.И. СОЛОВЬЕВА²,
В.М. БЕЛКИН¹.

¹Гематологический Научный Центр РАМН, 125167 Москва, Новозыковский проезд 4а; факс (095) 214-92-69; Эл. почта: ybelkin@blood.ru

²Институт биомедицинской химии РАМН им. В.Н.Ореховича, 119832 Москва, Погодинская 10; факс (095) 245-08-57.

Выделение интегрин $\alpha\nu\beta 3$ из плаценты человека с одновременным использованием двух аффинных сорбентов – иммобилизованных моноклональных антител к интегрину $\alpha\nu\beta 3$ и иммобилизованного RGD-содержащего декапептида, позволило выделить частично деградированную фракцию этого интегрин, способную, тем не менее, взаимодействовать со своим лигандом. Интегрин $\alpha\nu\beta 3$ подвергшийся ограниченному протеолизу, обладал меньшей аффинностью к RGD-пептиду по сравнению с интактным интегрином. При инкубации частично деградированного интегрин $\alpha\nu\beta 3$ при 37°C происходила его дальнейшая деградация. Добавление ингибиторов сериновых протеиназ (фенилметилсульфонил-фторида, лейпептина и апротинина) полностью подавляло дальнейшую деградацию интегрин $\alpha\nu\beta 3$. Интактная молекула интегрин $\alpha\nu\beta 3$ была нечувствительна к действию сериновых протеиназ, содержащихся в препарате частично деградированного интегрин. В препаратах интактного и частично деградированного интегрин $\alpha\nu\beta 3$ обнаружена специфическая активность двух сериновых протеиназ – активатора плазминогена урокиназного типа (уАП) и дипептидилпептидазы IV (ДПП 4). Полученные результаты свидетельствуют о том, что интегрин $\alpha\nu\beta 3$ из плаценты человека совыделяется с сериновыми протеиназами. Высказывается предположение о том, что определенная часть экстрагируемого тритоном X-100 из плаценты человека функционально активного интегрин $\alpha\nu\beta 3$ образует устойчивый комплекс с сериновыми протеиназами.

Ключевые слова: плацента человека, интегрин $\alpha\nu\beta 3$, протеолиз, сериновые протеиназы.

ВВЕДЕНИЕ. В последнее время появляется все больше данных свидетельствующих о том, что интегрины, основные адгезивные рецепторы многих типов клеток [1], образуют прочные комплексы с такими функционально значимыми молекулами как металлопротеиназа ММП-2 [2], рецептор урокиназы [3,4] и металлопротеиназы из семейства адамолизинов [5]. В случае образования гетеромолекулярного комплекса интегрин $\alpha v \beta 3$ с ММП-2 клетка приобретает способность с высокой степенью эффективности осуществлять протеолиз белков внеклеточного матрикса непосредственно в местах контактов клетка-матрикс, реализуя таким образом свои инвазивные свойства [6]. В настоящее время мало что известно о протеолизе самих интегринов и как он осуществляется *in vivo*. Есть данные о том, что $\beta 3$ субъединица интегрин $\alpha v \beta 3$ может подвергаться ограниченному протеолизу металлопротеиназой МТ1-ММП, в результате чего резко увеличивается сродство интегрин к другой металлопротеиназе – ММП-2 [7]. Полученные в настоящей работе данные указывают на то, что интегрин $\alpha v \beta 3$ совыделяется с сериновыми протеиназами, что, в свою очередь, может быть обусловлено образованием устойчивых комплексов между ними. Ограниченный протеолиз, в результате которого происходит снижение аффинности интегрин к RGD-пептиду, осуществляется в две стадии. На первой стадии неизвестная протеиназа отщепляет от αv субъединицы фрагмент в 7 кДа. До этого протеолиза молекула устойчива к действию сериновых протеиназ. На второй стадии (после отщепления от αv субъединицы фрагмента в 7 кДа неизвестной протеиназой), появляется чувствительность к сериновым протеиназам.

МЕТОДИКА. RGD-содержащий декапептид ("Sigma"). иммобилизовали на Affi-Gel 10 ("Bio-Rad") в концентрации 10 мг на мл геля. В работе использовали сорбент с иммобилизованными моноклональными антителами LM 609 фирмы "Chemicon".

Получение детергентного экстракта из плаценты проводили по ранее описанной методике [8]. В тканевой экстракт, содержащий интегрин $\alpha v \beta 3$, добавляли двухвалентные катионы (Mn^{2+} до 2 мМ, а Ca^{2+} и Mg^{2+} до 1 мМ) и NaCl до 0,15 М. Выделение интегрин $\alpha v \beta 3$ проводили на колонке с иммобилизованным RGD-пептидом (к-RGD) или колонке с иммобилизованными моноклональными антителами (к-МКА) к интегрину $\alpha v \beta 3$. Колонки отмывали 20 объемами буфера: 20 мМ трис-HCl pH 7,2, 0,15 М NaCl, 2 мМ $MnCl_2$, 1 мМ $CaCl_2$, 1 мМ $MgCl_2$, 0,04% тритон X-100. Элюцию интегрин с к-МКА проводили 0,1 М карбонатным буфером pH 10,5 с 0,04% тритоном X-100, а с к-RGD буфером: 20 мМ трис-HCl, 20 мМ ЭДТА pH 7,2, 0,04% тритон X-100. Элюаты интегринов концентрировали в ячейке "Amicon" на фильтре XM-50 и диализовали против буфера: 20 мМ трис-HCl pH 7,5, 150 мМ NaCl, 1 мМ $MgCl_2$, 0,04% тритон X-100.

Электрофоретический анализ белков проводили в присутствии 0,1% ДС-На по методу, описанному ранее [9]. Гель окрашивали серебром. Определение концентрации белка проводили по методу Лоури.

Активность активатора плазминогена урокиназного типа (уАП) и дипептидиламинопептидазы IV (ДПП-IV) определяли по гидролизу флуорогенных синтетических субстратов, производных 7-амино-4-метилкумарина карбобензокен-L-глицил-L-глицил-L-аргинина (Z-gly-gly-arg

МСА; pH 7,5) и глицил-пролина (gly-pro MCA; pH 7,8), соответственно по описанным ранее методам (10).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Опыт по выделению интегрина $\alpha\nu\beta 3$ проводили двумя способами. Детергентный экстракт пропускали непосредственно через к-RGD или последовательно – сначала через к-МКА, а затем через к-RGD. Электрофоретический анализ двух элюатов показал, что интегрин $\alpha\nu\beta 3$, полученный при непосредственном пропускании экстракта через к-RGD, ничем не отличается от интегрина, полученного на к-МКА, и представлен двумя мажорными белковыми полосами, соответствующими $\alpha\nu$ (145 кДа) и $\beta 3$ (95 кДа) субъединицам интегрина $\alpha\nu\beta 3$ (рис.1 А, дорожки 1 и 2). При постановке опыта, в котором экстракт последовательно пропускался через к-МКА, а затем через к-RGD, значительная доля интегрина $\alpha\nu\beta 3$, связавшегося со вторым сорбентом, оказалась подвержена частичной протеолитической деградации (рис.1 А, дорожки 3 и 4). Две данных дорожки представляют наиболее типичную картину протеолиза, наблюдаемую в разных опытах. Так как при данной постановке опыта сорбент с иммобилизованными антителами брали с большим избытком относительно присутствующего в экстракте интегрина $\alpha\nu\beta 3$, то с иммобилизованным RGD-пептидом связывался интегрин, который утратил способность взаимодействия с антителом LM 609, но тем не менее, сохранил способность взаимодействовать с RGD-пептидом. “Минимальный” протеолиз, при котором интегрин уже не узнается моноклональными антителами, и имеет отношение почти исключительно к его $\alpha\nu$ субъединице представлен на рис.1 А, (дорожка 3). В этом случае $\alpha\nu$ субъединица представлена в виде двух близко идущих полос с молекулярной массой 145 и 138 кДа. “Максимально” наблюдаемый протеолиз затрагивает уже обе субъединицы интегрина о чем можно судить по значительному уменьшению интенсивности белковых полос в области 145 и 95 кДа (Рис.1 А, дорожка 4). Различия в протеолизе можно объяснить двумя обстоятельствами – различиями в исходном материале, из которого выделяется интегрин (плацента), или тем, что в разных опытах использовали разные количества ингибитора сериновых протеиназ фенилметилсульфонилфторида (PMSF). Незначительное количество PMSF (от 1 до 0,5 мМ) добавляли в детергентный экстракт для сохранности аффинных сорбентов. Отсутствие протеолитических компонентов в препарате интегрина, полученного в опыте где использовалась только к-RGD (рис.1 А, 2), объясняется большим сродством интактного интегрина $\alpha\nu\beta 3$ к RGD пептиду, по сравнению с частично деградированным рецептором, а так же более низкой емкостью этого сорбента по сравнению с к-МКА.

Для дальнейшей характеристики препаратов интегрина $\alpha\nu\beta 3$ (рис.1 А, 1,2,4) их инкубировали при 37°C в течении 18 часов в отсутствие (рис.1 Б, 5,6,7) и присутствии (рис.1 Б, 8,9,10) ингибиторов протеиназ. В качестве ингибиторов сериновых протеиназ использовали PMSF (в концентрации 1мМ), лейпептин (10 мкг/мл) и апротинин (10 мкг/мл). Цистеиновые протеиназы ингибировали E-64, а металлопротеазы - 20 мМ ЭДТА. Как видно из представленной электрофореграммы, препараты интегринов, полученные на к-МКА и на к-RGD, после непосредственного пропускания через нее тритонового экстракта не изменяют своей электрофоретической подвижности (рис.1 Б, 5,6), а частично деградированный интегрин $\alpha\nu\beta 3$ подвергается дальнейшему существенному

протеолизу (рис.1 Б, 7). Из ингибиторов протеиназ эффективными оказались только ингибиторы сериновых протеиназ (рис.1 Б, 8,9,10). На основании полученных данных был сделан вывод о том, что определенная популяция частично деградированных молекул интегрина $\alpha v \beta 3$, полученного из плаценты человека, совыделяется с сериновыми протеиназами и, возможно, образует с ними устойчивые комплексы. Отсутствие протеолиза после инкубации при 37°C изначально недеградированных препаратов интегрин $\alpha v \beta 3$ можно объяснить двумя обстоятельствами: отсутствием сериновых протеиназ в этих препаратах или устойчивостью интактной молекулы к данному типу протеиназ. Для проверки последнего предположения интактный и протеолитически расщепленный препараты интегрин $\alpha v \beta 3$ смешали в равном отношении и проинкубировали при 37°C. Даже после инкубации при 37°C в течении недели

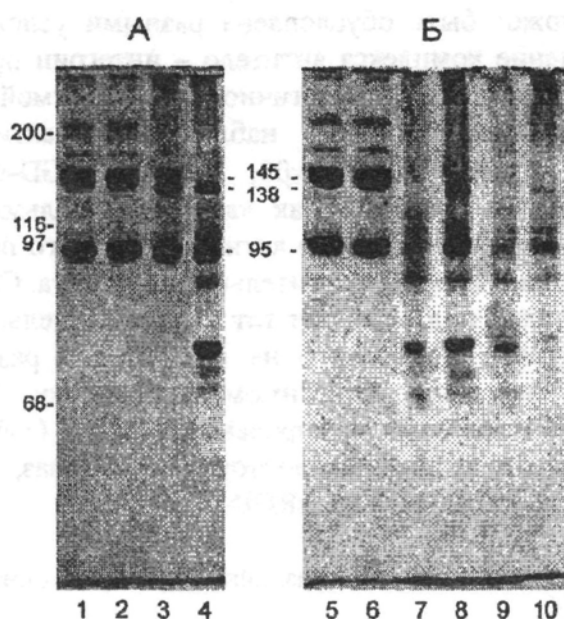


Рисунок 1.

Электрофоретический анализ интактного и частично деградированного интегрин $\alpha v \beta 3$.

Гель окрашен серебром. А. Элюаты интегрин $\alpha v \beta 3$ с аффинных колонок: 1. Элюат с к-МКА; 2. Элюат с к-RGD; 3. Элюат с к-RGD после предварительного пропускания детергентного экстракта через к-МКА ("минимальный" протеолиз); 4. Элюат аналогичный 3 ("максимальный" протеолиз).

Б. Протеолиз интактного и частично деградированного интегрин $\alpha v \beta 3$ в отсутствие (5,6,7) и присутствии (8,9,10) ингибиторов протеиназ при 37°C в течении 18 часов:

5. Элюат с к-МКА; 6. Элюат с к-RGD; 7. Элюат с к-RGD после предварительного пропускания детергентного экстракта через к-МКА ("максимальный" протеолиз);

8. Протеолиз в присутствии ингибиторов сериновых протеиназ – аprotинин, лейпептин, и PMSF; 9. Протеолиз в присутствии ингибитора цистеиновых протеиназ – E-64; 10. Протеолиз в присутствии ингибитора металлопротеиназ – 20 мМ ЭДТА.

белковые полосы, соответствующие αv и $\beta 3$ субъединицам интегрин, не претерпевали никаких изменений (данные не приведены). В пользу устойчивости интактных молекул интегрин так же свидетельствует тот факт, что и в частично деградированном препарате остатки полноценной αv

субъединицы (145 кДа) практически не претерпевают каких либо изменений после инкубации при 37°C, в то время как самый большой фрагмент $\alpha\upsilon$ субъединицы (137 кДа) практически полностью исчезает из этой области (рис.1, 4 и 7).

В различных препаратах интегрин $\alpha\upsilon\beta 3$ исследовали активность сериновых протеиназ: уАП и ДПП IV. В первых трех опытах выделение проводили в присутствии PMSF, а в четвертом опыте - в отсутствии ингибиторов сериновых протеиназ. Как видно из представленных данных трех опытов, большая активность сериновых протеиназ ассоциирована с препаратами частично деградированного интегрин $\alpha\upsilon\beta 3$, - для уАП приблизительно в 2 раза, а для ДПП IV в 10 раз. Однако, данная разница в активности протеиназ может быть обусловлена разными условиями элюции белка с колонок. Разрушение комплекса антитело - интегрин происходит при pH 10,5, что может приводить к частичной необратимой денатурации ферментов. Наиболее вероятно, что наблюдаемая активность уАП ассоциирована именно с интегрином $\alpha\upsilon\beta 3$, а не с RGD-пептидом или моноклональными антителами LM 609, так как при использовании разных аффинных сорбентов наблюдается удельная активность одного порядка (табл.), несмотря на жесткие условия элюции с антительного сорбента. Справедливость данного предположения также подтверждает тот факт, что удельная активность уАП в препарате интегрин, полученного на к-RGD, в 8 раз выше чем в исходном детергентном экстракте, наносимом на колонку. Максимальная активность уАП и ДПП-IV была зарегистрирована в опыте 4 (табл.), в котором выделение проводили в отсутствии ингибиторов протеиназ, а в качестве аффинного сорбента использовали только к-RGD.

Таблица. Активность уАП и ДПП IV в различных препаратах интегрин $\alpha\upsilon\beta 3$.

сериновые протеи- назы	Активность*						
	1		2		3		4
	к-МКА	к-RGD	к-МКА	к-RGD	к-МКА	к-RGD	к-RGD
уАП	8,3	16,6	10,1	23,3	8,1	14,7	38,0
ДПП 4	139	1640	145	2110	156	1562	8800

Активность уАП и ДПП IV определяли по гидролизу флуорогенных синтетических субстратов, производных 7-амино-4 метилкумарина карбобензоке-*L*-глицил-*L*-глицил-*L*-аргинина (Z-gly-gly-arg MCA; pH 7,5) и глицил-пролина (gly-pro MCA; pH 7,8), соответственно. 1,2,3,4 - № опыта. В опытах 1,2,3 выделение проводили в присутствии PMSF. Элюат с к-RGD получен после предварительного пропускания детергентного экстракта через к-МКА. В опыте № 4 выделение проводили без ингибиторов протеиназ. Элюат с колонки получен после непосредственного пропускания детергентного экстракта через к-RGD.

*Активность ферментов выражали в пмоль/мин на 1 мг белка.

Таким образом, в данной работе было показано, что отщепление от $\alpha\upsilon$ субъединицы интегрин $\alpha\upsilon\beta 3$ 7 кДа приводит с существенным изменениям в антигенных свойствах всей молекулы. Об этом можно судить по тому, что блокирующие клеточную адгезию моноклональные антитела LM 609 перестают узнавать данный интегрин, а область, с которой они взаимодействуют,

расположена не на N-конце $\alpha\nu$ субъединицы, а в центральной части молекулы интегрина [2]. После отщепления от $\alpha\nu$ субъединицы фрагмента в 7 кДа молекула интегрина (обе ее субъединицы) становится чувствительной к действию сериновых протеиназ. Тот факт, что интактная молекула интегрина устойчива к действию сериновых протеиназ означает, что первоначальное отщепление фрагмента $\alpha\nu$ субъединицы в 7 кДа осуществляется или другими протеиназами или для этого необходимо, чтобы интегрин $\alpha\nu\beta 3$ находился на поверхности клетки в составе нативных белок-липидных адгезивных клеточных структур. Ограниченный протеолиз интегрин $\alpha\nu\beta 3$ приводит к снижению его сродства к иммобилизованному RGD пептиду по сравнению с интактной молекулой. В интактном и частично деградированном препаратах интегрин $\alpha\nu\beta 3$ обнаружена активность сериновых протеиназ уАП и ДПП IV. Насколько обнаруженная активность сериновых протеиназ обусловлена образованием непосредственного или опосредованного другими белками комплекса с интегрином $\alpha\nu\beta 3$, а не с иммобилизованным лигандом, предстоит выяснить в дальнейшей работе. В настоящее время известно, что клеточный рецептор для уАП сораспределяется на клеточной поверхности с интегрин $\alpha\nu\beta 3$ семейств $\nu 1$ и $\nu 2$ [11,12], а так же обнаруживается с ними в составе одних и тех же иммунопреципитатов [13,14].

Обнаруженный в данной работе ограниченный протеолиз интегрин $\alpha\nu\beta 3$ может иметь непосредственное значение для регуляции клеточной адгезии и миграции. Образование устойчивого комплекса интегрин – уАП, что по полученным предварительным данным представляется весьма вероятным, могло бы в значительной степени усилить инвазивные свойства клеток экспрессирующих на своей поверхности интегрин $\alpha\nu\beta 3$ и одновременно обладающих урокиназной системой протеолиза. Относительно ДПП-IV известно, что эта протеиназа может взаимодействовать с белками межклеточного матрикса – фибронектином [15,16] и коллагеном [17,18], что также делает ее потенциальным участником адгезивного процесса.

Работа поддержана грантом РФФИ № 98-04-48898.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Hynes R.O. (1987) Cell, **48**, 549-534.
2. Brooks P.C., Stromlad S., Sanders L.C. et al. (1996) Cell, **85**, 683-693.
3. Andewreassen P.A., Kloller L., Christensen L., Duffy M.J. (1997) Int. J. Cancer, **72**, 1-22.
4. Chapman H.A. (1997) Current Opinion in Cell Biol., **9**, 714-724.
5. Wolfsberg T.G., Primakoff P., Myles D.C., Wite J. (1995) J.Cell Biol., **131**, 275-278.
6. Deryudina E.I., Bourdon M.A., Lou G-X., Reisfeld R.A., Strongin A. (1997) J. Cell Science, **110**, 516-526.
7. Deryugina E.I., Bourdon M.A., Jungwirth K. (2000) Int. J. Cancer, **86**, 15-23.

8. *Belkin V.M., Belkin A.M., Koteliansky V.E.* (1990) *J. Cell Biol.*, **111**, 2159-2170.
9. *Laemmli U.K.* (1970) *Nature*, **227**, 680-683.
10. *Локишина Л.А., Былинкина В.С., Самойлова Р.С., Гуреева Н.В., Полянская А.М.* (1993) *Биохимия*, **58**, 1104-1115.
11. *Estreicher A., Muhlhaner J., Carpentier J.L., Orci L., Vassalli J.D.* (1990) *J. Cell Biol.*, **111**, 783-792.
12. *Vaheri A., Stephens R.W., Salonen E.M., Pollanen J., Tapiovaara H.* (1990) *Cell Differentiation Dev.*, **32**, 255-262.
13. *Bohuslav J., Horejsi V., Hansmann C., et al.* (1995) *J. Exp. Med.*, **181**, 1381-1390.
14. *Weit Y., Lukashev M., Simon D.I., et al.* (1996) *Science*, **273**, 1551-1555.
15. *Piazza G.A., Gallanin H.A., Mowery J., et al.* (1989) *Biochem. J.*, **262**, 327-334.
16. *Cheng H-Ch., Abdel-Chang M., Elble R., Pauli B.U.* (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 24207-24215.
17. *Bauvois B.* (1988) *Biochem. J.*, **252**, 723-731.
18. *Hanski C., Huhle T., Crossen R., Reutter R.* (1988) *Exp Cell Res.*, **178**, 64-72.

Поступила 26.05.2000

LIMITED PROTEOLYSIS OF $\alpha v \beta 3$ INTEGRIN FROM HUMAN PLACENTA.

O.N. LUBKOVA¹, T.A. GUREEVA², E.A. DILAKYAN², N.I. SOLOVYEVA², V.M. BELKIN¹.

¹Hematological Scientific Center of the RAMS, 125167, Moscow, Novoyazikovskiy proyezd, 4a; fax (095)214- 92-69 ; e-mail: vbelkin@blood.ru

²Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry RAMS, Russia, 119832, Moscow, Pogodinskaya St., 10; fax (095) 2450857

Purification of $\alpha v \beta 3$ integrin from human placenta with successive usage of two affinity sorbents – immobilized monoclonal antibodies to $\alpha v \beta 3$ integrin and immobilized RGD-containing decapeptide allowed to purify this integrin's partially degraded fraction, that was nevertheless able to interact with its ligand. During the incubation of partially degraded $\alpha v \beta 3$ integrin at 37°C its further degradation went on. Addition of serine proteinase inhibitors: (phenylmethanesulfonyl fluoride, leupeptin and aprotinin) completely suppressed integrin further degradation of $\alpha v \beta 3$. In preparations of intact and partially degraded $\alpha v \beta 3$ integrin specific activity of two serine proteinases – urokinase and dipeptidylpeptidase IV – was discovered. $\alpha v \beta 3$ integrin, undergoing limited proteolysis, had lesser affinity towards RGD peptide, than intact integrin. The results show, that $\alpha v \beta 3$ integrin from human placenta co-purifies with serine proteinases. It is suggested that a definite part of functionally active $\alpha v \beta 3$ integrin, extracted from human placenta by triton X-100, forms a stable complex with serine proteinases.

Key words: human placenta, $\alpha v \beta 3$ integrin, proteolysis, serine proteinases.