

УДК 577.152.3.047  
©Коллектив авторов

## ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ АЛЬБУМИНА И АКТИНА МИОКАРДА ЧЕЛОВЕКА

*М.А. Ковалева<sup>1</sup>, Л.И. Ковалев<sup>1</sup>, М.В. Серебрякова<sup>2</sup>, С.А. Мошковский<sup>2</sup>, С.С. Шишкин<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук, 119071 Москва,  
Ленинский проспект, стр., 33, стр. 2; тел.: (095) 9525886; факс: (095) 9542732;  
эл. почта: kovalyov@inbi.ras.ru

<sup>2</sup>ГУ НИИ биомедицинской химии РАМН им. В.Н.Ореховича, 119121 Москва,  
Погодинская ул., 10

В ткани миокарда человека протеомными технологиями выявлены продукты 2-х генов ( $\alpha$ -актина и альбумина), представленные в виде фрагментов, появление и нарастание количества которых коррелирует с возрастом. Зависимые от возраста варианты отличались от зрелых форм отсутствием фрагментов N-концевой части аминокислотной последовательности. При хронической ишемической болезни сердца (ХИБС) зависимые от возраста белки в комплексе встречались в 50% случаев в возрастной группе 31-40 лет, а в контрольной группе такое сочетание имелось только у 10% обследованных лиц. Дальнейшие исследования в этой области, возможно, позволят расшифровать молекулярные механизмы нарушения работоспособности и/или старения сердечной мышцы, а также механизмов адаптации - дезадаптации при ХИБС.

**Ключевые слова:** миокард, человек, протеомика, возрастные изменения.

**ВВЕДЕНИЕ.** Итоговые публикации результатов по секвенированию и картированию генома человека свидетельствуют о реальном приближении к завершению структурного этапа геномных исследований [1-3]. Как следствие, в центр внимания молекулярной биологии переместились работы, направленные на изучение функционирования генома в разных условиях (функциональная геномика [4]), среди которых важное место занимает протеомный анализ [5, 6]. Одним из элементов протеомной стратегии считают получение обобщенных данных о белках, синтезирующихся в отдельных видах клеток или тканей [7, 8]. В протеомике человека существенный интерес проявляется к изучению белков миокарда [9]. Ранее мы опубликовали серию работ по результатам протеомного анализа белков миокарда человека на представительной выборке из аутопсийных и биопсийных образцов [10], с идентификацией ряда белков микросеквенированием и другими методами [11], а также с выявлением изменений в спектре белков на ранних стадиях онтогенеза и др. [12, 13]. Данная статья продолжает эти исследования и содержит новые материалы о группе белков миокарда человека, появление которых коррелирует с возрастом, а также ассоциировано с хронической ишемической болезнью сердца (ХИБС).

**МЕТОДИКА.** Изучены аутопаты миокарда (n=90) и скелетной мышцы (n=30), взятые не позднее 4 ч после смерти, без признаков сердечно-сосудистой патологии, а также образцы миокарда от лиц (n=40), страдавших разными формами сердечно-сосудистой патологии, полученных из лабораторий патоморфологии НИИ трансплантологии и искусственных органов МЗ РФ и Института экспериментальной кардиологии ВКНЦ РАМН. До исследования образцы хранились при -70°C.

\* - адресат для переписки

## ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ БЕЛКОВ МИОКАРДА ЧЕЛОВЕКА

Приготовление белковых экстрактов, проведение их фракционирования двумерным электрофорезом по О'Фарреллу в собственной модификации и анализ полученных электрофореграмм (2DE) выполняли, как описано ранее [10, 11]. Для визуализации белков использовали окрашивание гелей кумасси голубым R-250 [14] и/или азотнокислым серебром [15]. Денситометрию отдельных фрагментов двумерных электрофореграмм проводили на комплексе цифровой обработки видеоинформации СВИТ и лазерном денситометре Ultrascan XL (Pharmacia-LKB, Швеция), используя компьютерную обработку результатов с помощью пакета программ Gelscan 2 [11, 16].

Обработку гелей, гидролиз трипсином и экстракцию пептидов для идентификации белков проводили согласно протоколам [17] с некоторыми модификациями [18].

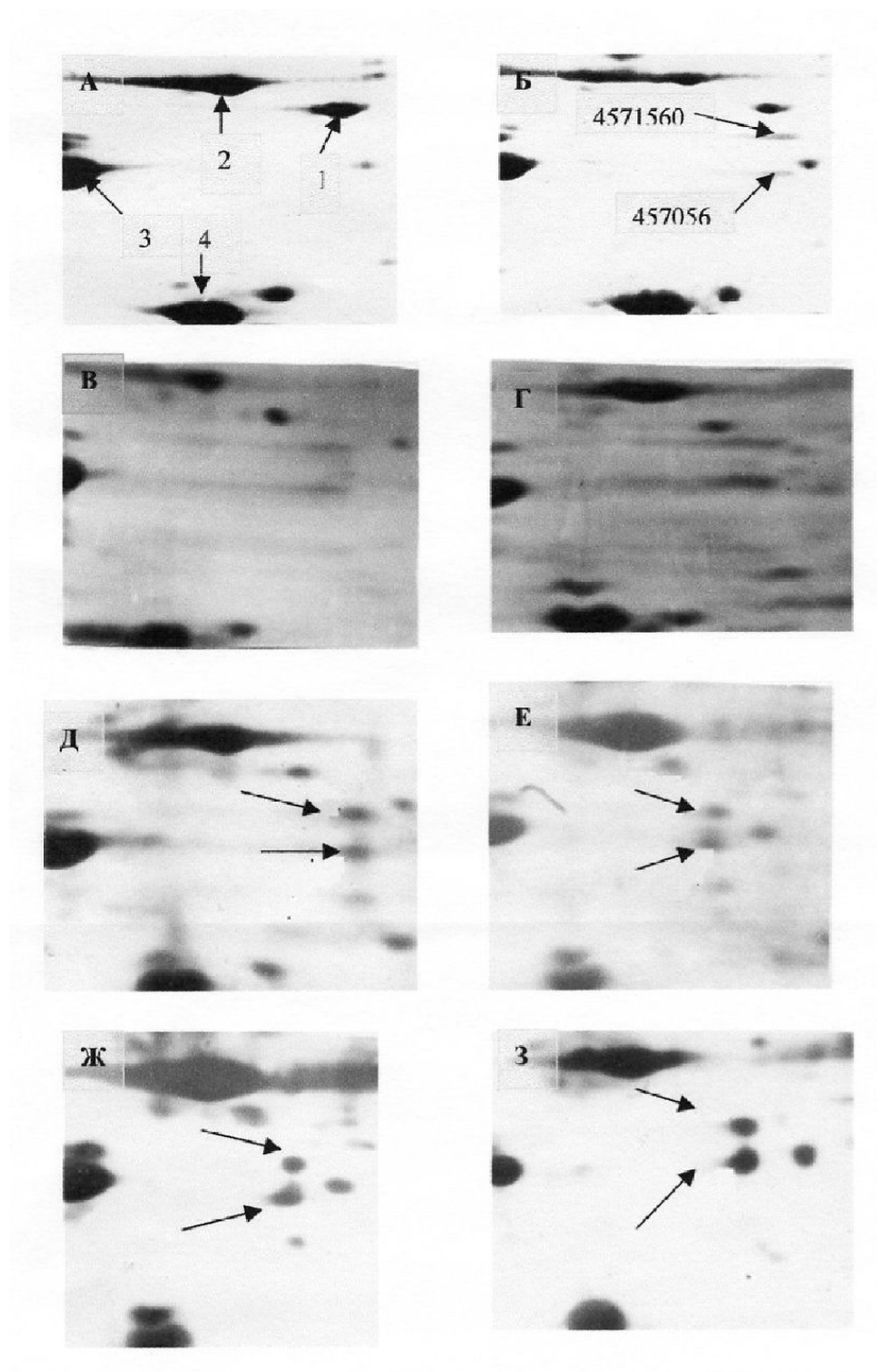
Образец (0,5 мкл) смешивали на мишени с таким же объемом раствора 2,5-дигидроксibenзойной к-ты ("Sigma", США) 20 мг/мл в 20%-ном ацетонитриле, 0,1%-ной трифторуксусной кислоте и высушивали на воздухе.

Масс-спектры получали на MALDI-TOF-масс-спектрометре Reflex III ("Bruker", США) с УФ-лазером (336 нм) в режиме положительных ионов в диапазоне масс 500-8000 Да. Полученные масс-спектры калибровали, используя значения масс пиков аутолиза трипсина. Идентификацию белков по наборам значений масс пептидов после трипсинолиза проводили с использованием опции Peptide Fingerprint программы Mascot ("Matrix Science", США) с точностью определения массы  $MH^+$ , равной 0,01%, допуская возможность модификации цистеинов акриламидом и окисления метионинов. При поиске использовали базы данных Национального центра биотехнологической информации США (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Проведенное исследование охватывало 300 наиболее представленных и четко детектируемых белковых пятен, которые стандартно получали из каждого изучавшегося образца миокарда человека применявшейся модификацией 2DE [10, 11], с нанесением от 500 до 1000 мкг суммарного белка и окрашиванием кумасси голубым R-250, что позволяло детектировать пятна, содержащие не менее 0,1 мкг белка в пятне. Эти белки распределялись в диапазоне молекулярных масс от 12,5 до 300 кДа и pI от 4,5 до 7,5. По данному белковому спектру проанализировано 90 образцов миокарда, полученных от лиц погибших в результате несчастного случая, без явных признаков сердечной патологии, учитывая их распределение по полу и возрасту. Различий по полу выявлено не было. Однако в анализируемом спектре белков миокарда наблюдали качественные различия, коррелировавшие с возрастом, по пяти белковым фракциям (пятнам), располагающимся на 2DE в виде двух различных групп (табл. 1, рис. 1, 2).

Таблица 1. Распределение образцов по возрасту и найденным возрастным вариантам.

Возрастные группы	Общее количество лиц в группе	Число лиц, имевших фрагменты $\alpha$ -актина	Число лиц, имевших фрагменты альбумина
10 - 20 лет	8	0	0
21 - 30 лет	15	4	0
31 - 40 лет	35	21	3
41 - 50 лет	18	14	7
более 51 года	14	14	12
Всего	90	63	22

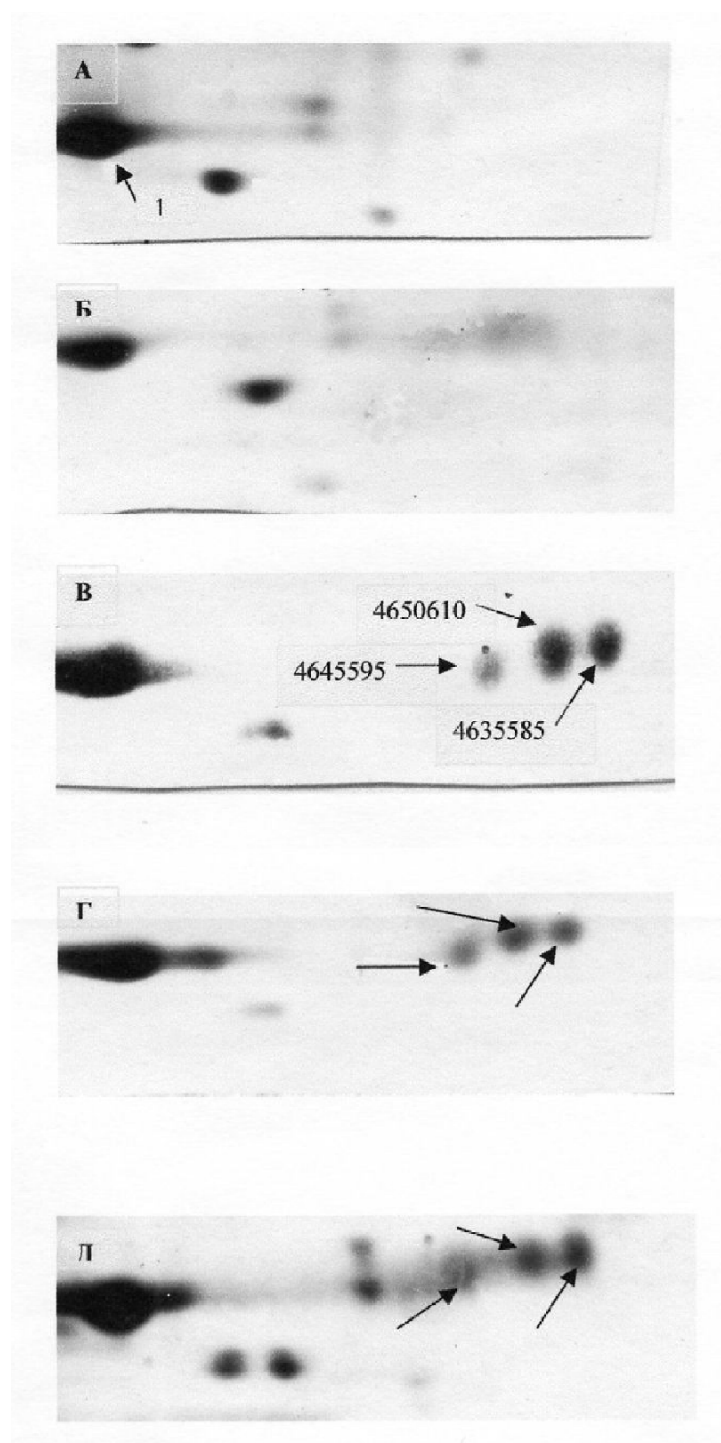


**Рисунок 1.**

Фрагменты двумерных электрофореграмм с зонами белков, коррелирующих с возрастом (продуктов гена  $\alpha$ -актина, 4520560 и 4571560).

А - 10-20 лет, Б - 21-30 лет, В - 31-40 лет, Г - 41-50 лет, Д - 51 и более, Е, Ж, З - случаи ХИБС в возрасте до 35 лет.

1 - тропонин Т, 2 - актин, 3 -  $\alpha$ -тропомиозин, 4 - лёгкая цепь миозина 1. Стрелками показаны зависимые от возраста белки.



**Рисунок 2.**

Фрагменты двумерных электрофореграмм с зонами белков 4635585, 46455595 и 5650610 (продуктов гена альбумина), коррелирующие с возрастом.

А – 10-20 лет, Б – 21-30 лет, В – 31-40 лет, Г - 41-50 лет, Д – 51 и более. 1 – актин.

Стрелками показаны зависимые от возраста белки.



Два белка, составившие группу I, характеризовались одинаковой pI (5,60), но разной мол. массой (33,2 и 37,3 кДа) и выявлялись при окраске кумасси голубым R-250 у ряда представителей из возрастной категории 21-30 лет (25% случаев). В соответствии с ранее предложенной классификацией эти белковые фракции (пятна) получили номера - 4520560 и 4571560 [11]. Важно подчеркнуть, что белки 4520560 и 4571560 не были обнаружены ни у одного из обследованных в более ранней возрастной категории (лица моложе 21 года) даже при использовании более чувствительного метода детекции - окрашивания азотнокислым серебром. В старших возрастных категориях отмечалась определенная тенденция к увеличению с возрастом числа лиц, имевших пятна 4520560 и 4571560 при параллельном увеличении содержания в них белка (рис. 1 А-Д, табл. 1).

Группа II зависимых от возраста белков включала 3 фракции со следующими характеристиками - 43.2/5.85, 44.10/5.95 и 44.2/6.10 (мол. масса/pI), обозначенные номерами 4635585, 4645595 и 4650610 [11] (рис. 2). Белки этой группы обнаруживались у отдельных представителей в возрастной категории 31-40 лет с тенденцией к нарастанию представленности в старших возрастных категориях.

Более того, поскольку практически у каждого из обследованных лиц старше 50 лет присутствовал весь комплекс из 5 отмеченных белков; можно было предположить, что появление данных белков, вероятно, отражает возрастные изменения в миокарде человека.

С помощью сравнительной компьютерной денситометрии 2DE, полученных для 5 различных образцов миокарда, и 2DE коммерческих белков с известными концентрациями нанесённого материала, было определено относительное количество каждого из выявленных зависимых от возраста белков. Результаты показали, что в соответствующих фракциях имеется до 0,5 мкг белка в пятне или, соответственно 0,05% от содержания общего белка, при этом в некоторых образцах для всех 5 обнаруженных зависимых от возраста белков суммарная представленность достигала 0,25% от общего белка. Таким образом, эти белки можно отнести к мажорным белкам сердечной мышцы.

При параллельно проведенном анализе образцов скелетной мышцы человека (n=30) по тем же возрастным категориям, обнаружить появление подобных зависимых от возраста белков не удалось. Особенно наглядно такое различие между сердечной и скелетными мышцами демонстрировали те случаи, когда у одного и того же лица зависимые от возраста белки детектировались в миокарде, но их не было в образцах скелетной мышцы. Соответственно, обнаруженные зависимые от возраста белки, по-видимому, являются специфичным для сердечной мышцы.

На следующем этапе исследований была проведена идентификация зависимых от возраста белков методом масс-спектрометрии (MALDI-TOF). Параллельно на тех же 2DE с помощью MALDI-TOF проанализировали и два других белка (4540492, 4318709), которые были ранее идентифицированы микросеквенированием как  $\alpha$ -тропомиозин и  $\alpha$ -В кристаллин [11, 13]. Обобщённые результаты идентификации представлены в таблице 2.

Как видно из этих материалов, состав пептидов, полученных из белков 4540492 и 4318709, полностью соответствовал данным ранее проведенной идентификации, что свидетельствовало о полной воспроизводимости результатов микросеквенирования и MALDI-TOF.

Массы пептидов, обнаруженных в белках 4520560 и 4571560, показали их принадлежность к первичной структуре  $\alpha$ -актина (NCBI protein, gi:4885049). Молекула сердечной изоформы  $\alpha$ -актина содержит 377 аминокислотных остатков, и значение её мол. массы оценивается величиной 41,7 кДа. Вместе с тем, у белков 4520560 и 4571560 мол. массы были заметно меньшими - на 8,5 и 4,4 кДа, соответственно. При этом в белке 4571560 были выявлены только пептиды, которые присутствовали в последовательности  $\alpha$ -актина, начиная с 53 позиции до 374 из 377, а в 4520560 с 87 по 374 позицию. Таким образом, можно считать, что белки 4520560 и 4571560 являются укороченными производными  $\alpha$ -актина, у которых отсутствуют N-концевые участки, имеющиеся в полной последовательности  $\alpha$ -актина.

## ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ БЕЛКОВ МИОКАРДА ЧЕЛОВЕКА

Таблица 2. Белки миокарда человека, идентифицированные MALDI-TOF масс-спектрометрией.

№ пептида	Выявленные пептиды и координаты пептидов	Название белка	Ссылка гена № белка в SWISS-PROT	pI/Mw теоретич.	pI/Mw эксперимент.	% совпа- дения*
4540492	18-28 QLHDLVSLQK 232-244 SIDDLDELTYAQK	тропонин $\alpha$ -цепь	TPM1 (P09499)	4,64/90,4	4,92/90,4	50
4918709	12-22 KPFETTHPSK 108-116 QDENGFIR	$\alpha$ -B- кристатин	CRAB P02511	7,10/29,1	7,09/29,8	57
4520560	87-97 IWHHIFYNELR 362-374 QEYDEAGPSIVHR	$\alpha$ -актин сердечный изоформ	ACTC P68032	5,24/41,7	5,60/39,2	99
4571560	53-63 DSYVGLDAQSK 362-374 QEYDEAGPSIVHR	$\alpha$ -актин сердечный изоформ	ACTC P68032	5,24/41,7	5,60/37,3	91
4635585	250-257 AEFAEVSK 570-581 AVMDLFAAFVEK	альбумин	ALBU P02768	5,92/69,4	5,85/49,2	92
4645595	237-242 AWAVAR 599-609 LVAASQAALGL	альбумин	ALBU P02768	5,92/69,4	5,95/44,1	92
4650610	237-242 AWAVAR 570-581 AVMDLFAAFVEK	альбумин	ALBU P02768	5,92/69,4	6,10/44,2	25

Примечание: \* - процент совпадения выявленных масс триптических пептидов с аминокислотной последовательностью соответствующего белка.

MALDI-TOF анализ зависимых от возраста белков группы II выявил в каждом из них пептиды, присутствующие в первичной структуре альбумина (gi:4502027), но при этом мол. масса каждого из изучаемых белков существенно ниже, чем у альбумина. Согласно базе данных SWISS-PROT, молекула предшественника альбумина человека включает 609 аминокислотных остатков и имеет мол. массу в 69,4 кДа. Соответственно, уменьшение мол. массы белков 4635585 (43.2/5.85), 4645595 (44.10/5.95) и 4650610 (44.20/6.10) по сравнению с обычным альбумином составляет 25,9–24,9 кДа, что отражает потерю 235–240 аминокислотных остатков. Проведенный анализ показал, что в каждом из белков группы II обнаруживаются лишь пептиды, перекрывающие часть последовательности альбумина, начинающуюся с 237 позиции и практически до С-конца для белков 4645595 и 4650610, а для белка 4635585 - с 250 позиции. Обобщая полученные материалы, можно сделать заключение, что белки группы II представляют собой укороченные производные альбумина, у которых отсутствует N-концевая часть обычной молекулы. В этом отношении белки группы II оказались похожими на белки группы I, которые по приведенным выше данным являются лишенными N-концевой части производными мажорного мышечного белка -  $\alpha$ -актина.

В существующих двумерных белковых базах данных миокарда человека (HP-2DPAGE и HSC 2DPAGE) содержатся результаты идентификации ряда белковых фракций-пятен, которые представляют собой укороченные производные ряда известных белков, в частности фрагментов АТФ-синтазы, десмина, миоглобина, тяжелых цепей миозина, креатинфосфокиназы,  $\alpha_1$ -антитрипсина, актина, альбумина и др. Однако описанные выше пятна, как зависимые от возраста

белки, в этих материалах не отмечены. В целом, можно думать, что нередкое и воспроизводимое появление укороченных форм разных белков в сердечной мышце носит неслучайный характер, но процессы, вызывающие их образование практически не изучены.

Поскольку объектами исследования в нашей работе, как и в подавляющем большинстве других исследований с человеческими тканями, являлись аутопсийные образцы миокарда, требовалось проверить возможность появления на 2DE продуктов ограниченного протеолиза белков, которые могут обнаруживаться как новые белковые пятна-фракции. Ранее мы проанализировали эти признаки в виде появляющихся и уверенно детектируемых пятен-фракций, которые оценили как признаки такой деградации [19]. Они отсутствовали во всех анализируемых образцах, и это позволяет считать, что выявленные зависимые от возраста белки, хотя и представляют собой укороченные производные известных мажорных белков, все же вряд ли образовались за счет посмертного аутолиза. По всей видимости, подобные белки, присутствующие в заметных количествах в ткани миокарда, могут возникать как результат специфичного протеолиза, хотя для некоторых из них нельзя исключить и вероятность появления/нарастания за счет альтернативного (нуклеинового/белкового) сплайсинга.

В связи с важным значением ряда коррелирующих с возрастом заболеваний сердечно-сосудистой системы, представилось интересным провести сравнительный анализ белков миокарда, полученных из аутопсийных образцов от лиц моложе 50 лет, имевших заболевания сердечно-сосудистой системы, и в контрольной группе, которую составили биоматериалы лиц того же возраста, но без признаков явной сердечно-сосудистой патологии. Исследованная выборка представляла аутопсийные образцы от лиц с сердечно-сосудистой патологией (n=40), включала дилатационную кардиопатию (12 случаев), гипертрофическую кардиомиопатию (2 случая), миокардит (5 случаев), патологию клапанов (5 случаев) и хроническую ишемическую болезнь сердца (ХИБС, 16 случаев). Все диагнозы были установлены с учетом клинических и морфологических данных в соответствующих медицинских учреждениях.

Некоторые отличия от контрольной группы по пяти зависимым от возраста пятнам белков обнаружились только у пациентов с хронической ишемической болезнью сердца (ХИБС). В сравниваемых выборках весь набор из 5 зависимых от возраста пятен выявлялся у существенно большего числа больных ХИБС, чем у лиц того же возраста, но без этой патологии. Особо следует отметить, что в контрольной группе все 5 пятен вместе не были обнаружены ни у кого моложе 35 лет, тогда как в группе из 10 больных с ХИБС при возрасте моложе 35 лет 8 имели полный набор. Таким образом, полученные данные позволяют думать, что указанные зависимые от возраста белки, вероятно, каким-то образом вовлечены в патогенез хронической ишемии миокарда и, возможно, являются ее молекулярными маркерами.

В настоящее время трудно даже предполагать какую-либо физиологическую роль для многих укороченных белков, выявляемых в ткани миокарда. Хотя для альбумина и его фрагментов известна транспортная роль, в доставке многих объектов, включая гормоны, липопротеины, аминокислоты и др. [20, 21]. Выяснение механизмов их образования, накопления и участия в метаболизме миокарда может представлять значительный интерес, как для фундаментальной науки, так и для практической медицины. Однако, исходя из полученных результатов, для фрагментов 2 зависимых от возраста белков, которые накапливаются при ХИБС, вполне вероятно их участие в процессах, которые отражают старение сердечной мышцы и сопровождаются снижением ее работоспособности.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Eving B., Green P.* (2000) *Nature*, **409**, 860-921.
2. *Blackstock W.* (2000) in *Proteomics: A Trends Guide*. (Blackstock W., Mann N. eds.) Elsevier-Science, London, pp. 12-17.
3. *Skolnick J., Fetrow J.S., Kolinski I.* (2000) *Nature Biotechnol.*, **18**, 283-287.
4. *Шишкин С.С., Ковалёв Л.И., Громов П.С.* (2000) в кн.: Многоликость современной генетики человека (под ред. Шишкина С.С.), Гилем, Москва, Уфа, с.17-50.
5. *Fields S.* (2001) *Science*, **291**, 1221-1224.
6. *Anderson N.G., Anderson L.* (1982) *Clin. Chem.*, **28**, 739-748.
7. *Klose J.* (1989) *Electrophoresis*, **10**, 140-152.
8. *Celis J., Ostergaard M., Rasmussen H., Gromov P., Gromova I., Varmark H., Palsdottir H., Magnusson N.* (1999) *Electrophoresis*, **20**, 300-309.
9. *Baker C.S., Corbett J.M., May A.J.* (1992) *Electrophoresis*, **13**, 723-726.
10. *Пуляева Е.В., Ковалёв Л.И., Цветкова М.Н., Шишкин С.С., Болдырев Н.И.* (1990) *Биохимия*, **55**, 489-498.
11. *Kovalyov L.I., Shishkin S.S., Efimochkin A.S., Kovalyova M.A., Ershova E.S., Egorov Ts.A., Musalyatov A.K.* (1995) *Electrophoresis*, **16**, 1160-1169.
12. *Цветкова М.Н., Ковалев Л.И., Феценко С.П., Шишкин С.С.* (1992) *Онтогенез*, **23**, 351-363.
13. *Лантев А.В., Шишкин С.С., Егоров Ц.А., Ковалев Л.И., Цветкова М.Н., Галюк М.А., Мусалымов А.Х., Ефимочкин А.С.* (1994) *Мол. биология*, **28**(1), 52-58.
14. *Fairbanks G., Steck T.L., Wallach D.F.H.* (1971) *Biochemistry*, **10**, 2607-2617.
15. *Blum H., Beir H., Cross H.G.* (1987) *Electrophoresis*, **8**, 126-129.
16. *Шишкин С.С., Ильинский З.В., Ковалев Л.И., Борисенко В.И., Громов П.С., Чесалин Л.С.* (1988) *Вопр. мед. химии*, **34**(2), 131-135.
17. *Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M.* (1996) *Anal. Chem.*, **68**, 850-858.
18. *Говорун В.М., Мошковский С.А., Тихонова О.В., Гоуфман Е.И., Серебрякова М.В., Момыналиев К.Т., Лохов П.Г., Хряпова Е.В., Кудрявцева Л.В., Смирнова О.В., Торопыгин И.Ю., Максимов Б.И., Арчаков А.И.* (2003) *Биохимия*, **68**(1), 52-60.
19. *Цветкова М.Н., Ковалев Л.И., Шишкин С.С.* (1993) *Вопр. мед. химии*, **32**(4), 31-34.
20. *Bosch F.X., Ribes J., Borrás J.* (1999) *Semin. Liver Dis.*, **19**, 271-285.
21. *Kawakami T., Hoshida Y., Kanai F.* (2005) *Proteomics*, **5**, 4287-4295.

Поступила: 15. 10. 2007.



## **AGE-RELATED CHANGES OF ALBUMIN AND ACTIN OF HUMAN MYOCARDIUM**

*M.A. Kovalyova<sup>1</sup>, L.I. Kovalyov<sup>1</sup>, M.V. Serebryakova<sup>2</sup>, S.A. Moshkovskii<sup>2</sup>, S.S. Shishkin<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Bakh Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Leninsky pr., 33/2, Moscow, 119071 Russia; fax: (095)954-2733, e-mail: kovalyov@inbi.ras.ru

<sup>2</sup>Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Pogodinskaya ul., 10, Moscow, 119121 Russia

In the human myocardium tissue, proteomic technologies revealed the products of 2 genes ( $\alpha$ -actin and albumin), existing as fragments; their appearance and increased contents correlated with age. The age-related variants differ from the mature forms by the absence of N-terminal fragments of the amino acid sequences. In the chronic ischemic heart disease (CIHD), these age-dependent proteins were found in 50% of cases (in the age group 31-40 years), while in the control group such combination was detected only in 10% of the examined individuals. Subsequent studies in this field would probably reveal molecular mechanisms responsible for impairment and/or ageing of the cardiac muscle and also of the adaptation - dysadaptations mechanisms in the CIHD.

**Key words:** myocardium, human, proteomics, age-related changes.