



УДК 591.111.1:577.152.342*17'14:57.086.83:576.524

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПРОТЕИНАЗЫ, ОБУСЛАВЛИВАЮЩЕЙ АНТИАДГЕЗИОННЫЕ СВОЙСТВА СЫВОРОТКИ КРОВИ СОБАКИ

© 2000 г. Т. А. Муранова[#], И. Г. Швыркова, А. И. Рыкунова

Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142292, Пущино, Московская обл.

Поступила в редакцию 13.04.99 г. Принята к печати 16.09.99 г.

Установлено, что обнаруженный ранее антиадгезионный эффект сыворотки крови собаки связан с протеолитической активностью компонентов сыворотки. В результате последовательного фракционирования сыворотки выделена протеиназа, обуславливающая ее антиадгезионную активность, идентифицированная как плазмин.

Ключевые слова: адгезия клеток; плазмин; плазминоген; сыворотка крови.

ВВЕДЕНИЕ

Рост клеточной колонии, выращиваемой в культуре, связан с образованием множества адгезионных контактов выросших клеток с материалом посуды (пластик, стекло), используемой при культивировании. Адгезия клеток осуществляется через адгезионные белки (фибронектин, витронектин и др.), присутствующие в культуральной среде либо в составе сыворотки, либо специально внесенные в бессывороточную среду для культивирования клеток. Присутствие в культуральной среде сыворотки крови быка, мыши, крысы, человека обеспечивает необходимые условия для стабильной клеточной адгезии, не нарушаемой при последующей инкубации системы на холоду. Однако в случае использования сыворотки крови собаки при выращивании клеток был обнаружен эффект полного открепления от подложки (стекло, пластик) клеточного монослоя после инкубации культуры на холоду. Это было показано на культуре эндотелиальных клеток аорты собаки 1–8-го пассажей, а также на фибробластах постоянных линий ВНК-21, ККХ, Н, СЗН, ЗТЗ, ЗТ6 [1]. Данная работа посвящена выделению и идентификации фактора, обуславливающего антиадгезионные свойства сыворотки крови собаки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для выделения компонентов сыворотки крови собаки, вызывающих антиадгезионный эффект, было проведено последовательное фракционирование сыворотки. Функциональное тестирование всех полученных фракций на антиадгезионную

активность проводили на культуре фибробластоподобных клеток сирийского хомячка (линия клеток ВНК-21), выращенных в среде, содержащей сыворотку крови быка. Антиадгезионный эффект оценивали по интенсивности открепления клеток от подложки после добавления сыворотки крови собаки или ее фракций в бессывороточную культуральную среду и инкубации клеток при 37°C в течение 5 ч с последующей инкубацией на холоду или без холодной инкубации. Перед тестированием объем фракций приводили к объему исходной сыворотки. Чтобы проверить вероятность влияния на клетки буферных растворов, используемых при выделении антиадгезионного фактора, были проведены контрольные эксперименты, в которых клетки инкубировали, вводя в бессывороточную культуральную среду соответствующий буфер вместо сыворотки или ее фракций. В контрольных экспериментах изменений в культуре клеток не наблюдали.

Первый этап исследований – предварительное фракционирование сыворотки крови собаки методом ультрафильтрации на приборе “Amicon” с использованием мембран с различной пропускной способностью, с целью разделения компонентов по молекулярной массе. Установлено, что антиадгезионной активностью обладала фракция сыворотки крови, содержащая компоненты с молекулярной массой около 100 кДа. Это позволило сделать предположение о протеолитической природе антиадгезионного фактора.

Для проверки этого предположения проведена серия экспериментов с ингибиторами протеиназ. Добавление лейпептина, фенилметилсульфонилфторида (PMSF) или соевого ингибитора трипсина к сыворотке крови собаки приводило к значительному уменьшению антиадгезионного действия сыворотки (табл. 1), что позволило предположить,

[#] Автор для переписки (тел.: (27) 73-08-82; факс: (27) 79-05-27; e-mail: muranova@fibkh.serpukhov.su).

Таблица 1. Влияние ингибиторов на антиадгезионный эффект сыворотки собаки (n – число независимых экспериментов)

Ингибитор	Концентрация ингибитора в среде, мг/мл	Открепленные клетки, % (усредненные данные, n 6)
Лейпептин	0.03	20
Соевый ингибитор трипсина	2	0
PMSF	0.35	25
В отсутствие ингибиторов	–	100

что антиадгезионный фактор представляет собой протеиназу с молекулярной массой около 100 кДа.

Разделение компонентов сыворотки крови собаки проводили различными методами. Методом фракционного осаждения белков сульфатом аммония (от 10 до 80%) было показано, что 30% концентрация сульфата аммония обеспечивала осаждение компонента, обладающего антиадгезионной активностью, при отделении значительного количества других белков. После растворения фракции, содержащей антиадгезионный фактор (фракция А) в 0.01 М Na-фосфатном буфере (рН 8.5), и внесения ее в бессывороточную культуральную среду при концентрации белка в среде 2.8 мг/мл антиадгезионный эффект наблюдали уже после инкубации культуры фибробластов при 37°C в течение 5 ч (табл. 2) без дополнительной холодной инкубации, которая была необходима для открепления клеток при использовании цельной сыворотки крови собаки [1].

Дальнейшее разделение фракции А проводили методом ионообменной хроматографии. Изоэлектрическое осаждение белков сыворотки при различных значениях рН позволило выяснить, что искомым компонентом осаждается при значении

рН около 5 и, следовательно, имеет pI 5. Исходя из полученных данных, в качестве ионообменника был выбран анионит DEAE-целлюлоза. Фракцию А, полученную после осаждения 30% сульфатом аммония, предварительно диализовали против 0.01 М Na-фосфатного буфера (рН 8.5) для удаления остаточного сульфата аммония и подвергали ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе при рН 8.5 в том же буфере, используя ступенчатый градиент концентрации NaCl (0.05–0.2 М). Как показало тестирование на антиадгезионную активность, в использованных условиях антиадгезионный фактор не сорбировался на DEAE-целлюлозе (фракция А-1), хотя в результате проведенного хроматографического разделения удалось отделить часть сопутствующих белков (табл. 2).

Так как ионообменная хроматография на катионообменниках при значениях рН ниже 6 была невозможна в связи с плохой растворимостью фактора в этом диапазоне рН, повторно был использован метод анионообменной хроматографии, но при другом значении рН. Хроматографию активной фракции А-1 проводили на DEAE-целлюлозе в 0.01 М Na-фосфатном буфере (рН 7.0) в ступенчатом градиенте концентрации NaCl (0.05 М – 0.2 М – 1 М) (рис. 1). Как показало тестирование полученных фракций антиадгезионный фактор элюировался при концентрации NaCl 0.2 М (фракция А-1-2). Анализ методом SDS-электрофореза в ПААГ показал, что основными компонентами фракции являются белки с молекулярными массами около 28, 55 и 97 кДа и два минорных компонента (рис. 2, дорожка 2).

Для идентификации белков их переносили с ПААГ на мембрану Immobilon-P методом электроблоттинга и определяли N -концевые аминокислотные последовательности (8–15 а. о.). При сравнении полученных последовательностей с белковыми последовательностями, представленными в базе данных DNASTAR, представленной в системе ATLAS

Таблица 2. Схема выделения фактора, обуславливающего антиадгезионную активность сыворотки крови собаки

Этап выделения	Концентрация белка в культуральной среде, обеспечивающая 100% открепление клеток от субстрата после инкубации при 37°C в течение 5 ч
Цельная сыворотка крови собаки	8–12 мг/мл*
Осаждение белков сыворотки крови собаки 30% сульфатом аммония (осадок – фракция А)	2.8 мг/мл
Хроматография фракции А на DEAE-целлюлозе при рН 8.5 (фракция А-1)	1.2 мг/мл
Хроматография фракции А-1 на DEAE-целлюлозе при рН 7.0 (фракция А-1-2)	0.6 мг/мл
Аффинная хроматография фракции А-1-2 на лизин-сефарозе (фракция плазминогена)	0.05 мг/мл

* Для открепления клеток необходима дополнительная холодная инкубация клеточной культуры при 4°C в течение 12 ч.

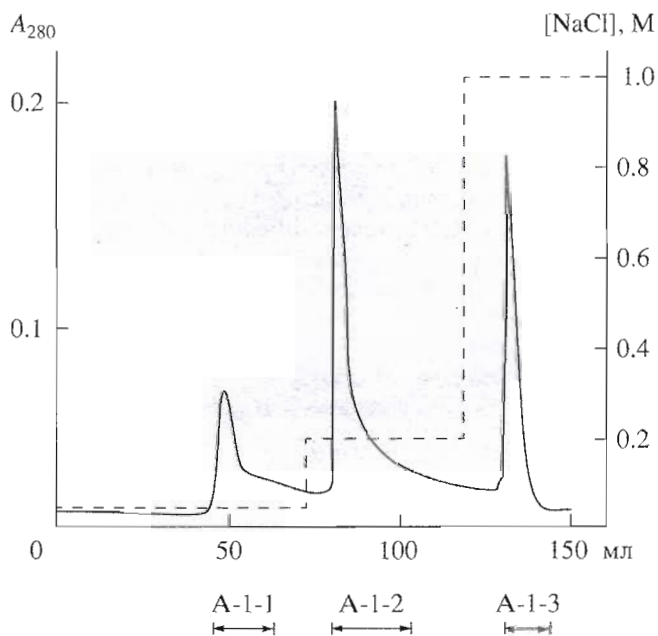


Рис. 1. Хроматография фракции А-1 (табл. 1) на DEAE-целлюлозе, уравновешенной 0.01 М Na-фосфатным буфером (рН 7.0) в градиенте концентрации NaCl (условия см. в разделе "Эксперимент. часть"). Пунктирной линией показано изменение концентрации NaCl.

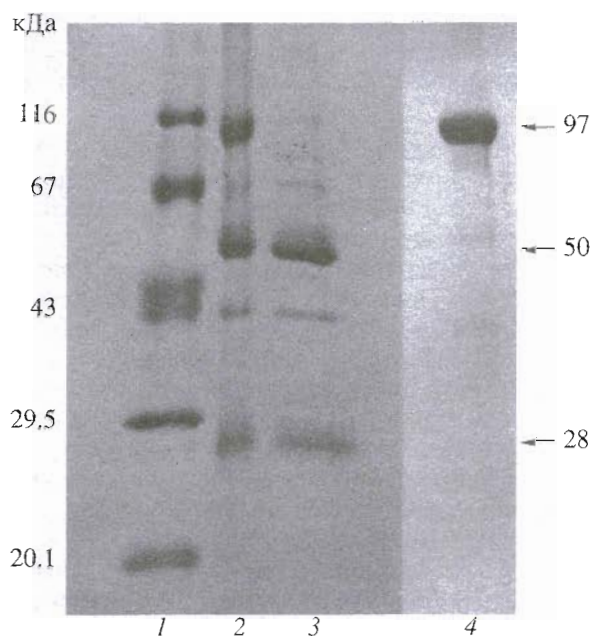


Рис. 2. SDS-электрофорез в ПААГ фракции А-1-2 (рис. 1) (2) и этой же фракции после отделения 97 кДа-белка хроматографией на Lys-сефарозе (3); 1 – маркеры молекулярных масс; 4 – фракция 97 кДа после хроматографии на Lys-сефарозе. Справа стрелками показано положение анализируемых белков фракции А-1-2.

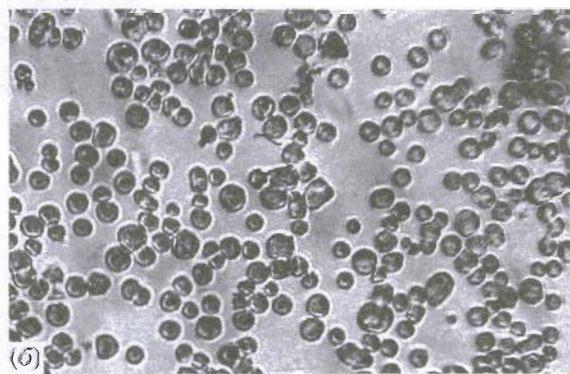
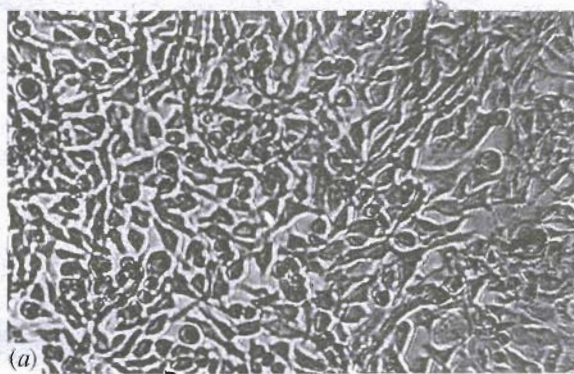


Рис. 3. Моновлой клеток ВНК-21, выросших в пластиковых флаконах в стандартных условиях (см. "Эксперимент. часть") (а), и клетки ВНК-21, открепленные от подложки в результате инкубации в течение 5 ч при 37°C в бессывороточной среде, содержащей 50 мкг/мл плазминогена из сыворотки крови собаки (б).

(<http://vms.mips.biochem.mpg.de/mips/pnograms/atlas.html>), установлено, что основными компонентами фракции А-1-2 являются легкая цепь Ig А (28 кДа), тяжелая цепь Ig А (55 кДа) и плазминоген (97 кДа).

Поскольку предварительные эксперименты по ингибированию антиадгезионной активности сыворотки собаки ингибиторами протеиназ указывали на протеолитическую природу фактора, нами сделано предположение, что антиадгезионная активность фракции А-1-2, а следовательно,

сыворотки собаки обусловлена протеолитической активностью плазмина.

Для подтверждения этого предположения плазминоген отделили от других компонентов фракции А-1-2 методом аффинной хроматографии на Lys-сефарозе [2]. Как было показано методом SDS-электрофореза, полученный белковый препарат давал единичную полосу, соответствующую белку с молекулярной массой около 97 кДа, и не содержали примесей других белков (рис. 2). Гомогенность препарата также под-

тверждена анализом его *N*-концевой аминокислотной последовательности, которая соответствовала *N*-концевой последовательности плазминогена.

Тестирование на культуре клеток ВНК-21 подтвердило, что внесение именно плазминогена в бессывороточную культуральную среду вызывает отделение монослоя клеток от субстрата, т.е. наблюдается антиадгезионный эффект (рис. 3). Известно, что ряд клеток, в том числе фибробласты, способен синтезировать и секретировать активаторы плазминогена [3–7]. В случае, когда в бессывороточную (не содержащую ингибиторов плазмина и других протеиназ) культуральную среду вносится плазминоген, концентрация активаторов плазминогена достаточна для превращения плазминогена в плазмин [8]. Фракция А-1-2, лишенная плазминогена (рис. 2, дорожка 3), не обладала антиадгезионными свойствами. Сыворотка, не содержащая плазминоген (после отделения его методом аффинной хроматографии на Lys-сефарозе), также не проявляла антиадгезионную активность при добавлении к культуре клеток.

Таким образом, из сыворотки крови собаки выделен компонент, ответственный за антиадгезионную активность, идентифицированный как плазминоген. В табл. 2 представлена схема его выделения. Очевидно, что антиадгезионная активность сыворотки собаки связана с протеолитической активностью плазмина, предшественником которого является плазминоген. Несмотря на то что плазминоген является компонентом сыворотки крови всех млекопитающих, антиадгезионный эффект мы наблюдали только при использовании сыворотки крови собаки. Вероятно, процессы регулирования работы плазминовой системы сыворотки собаки, включающие активацию плазминогена и ингибирование плазмина, а возможно, и активаторов плазминогена, отличаются от таковых в изученных нами сыворотках крови других млекопитающих (быка, мыши, крысы, человека).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Сыворотку крови собаки получали по методу [9].

Оценку антиадгезионной активности образцов проводили на культуре фибробластоподобных клеток сирийского хомячка (линия клеток ВНК-21, получена из Института биофизики клетки РАН). Клетки выращивали в среде DMEM (Sigma, США), содержащей 10% бычьей сыворотки, 100 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, в пластиковых флаконах или 24-луночных панелях. После формирования клеточного монослоя в стандартных условиях среду сливали, дважды промывали клетки бессывороточной средой

DMEM, помещали в ту же среду, добавляли тестируемый образец (10% объема культуральной среды) и инкубировали клетки при 37°C в течение 5 ч с дополнительной холодной инкубацией при 4°C в течение 12 ч в случае использования цельной сыворотки. Перед тестированием фракций их объем приводили к объему исходной сыворотки, разбавляя 0.01 М Na-фосфатным буфером (рН 8.0). Количество открепленных клеток рассчитывали по отношению к общему количеству клеток и выражали в процентах. В контрольных экспериментах клетки инкубировали в тех же условиях с добавлением соответствующего буфера (10% объема культуральной среды).

Аналитические процедуры. Электрофорез белковых фракций проводили по методу Лэммли [10] в 8–25% полиакриламидном геле в присутствии SDS. Концентрацию белков в растворах определяли по методу Брэдфорд [11].

Ингибирование антиадгезионной активности сыворотки крови собаки ингибиторами протеиназ осуществляли при концентрации в сыворотке лейпептина, соевого трипсинового ингибитора, PMSF (все фирмы "Sigma", США) 0.03, 2 и 0.35 мг/мл соответственно. После добавления ингибиторов сыворотку выдерживали 30 мин при комнатной температуре и добавляли к бессывороточной среде, в которой находились клетки (в количестве 10% объема культуральной среды). Клетки инкубировали при 37°C в течение 5 ч, затем 16 ч при 4°C, после чего определяли количество открепленных клеток.

Фракционирование сыворотки крови собаки методом ультрафильтрации проводили на ячейках "Amicon" с использованием мембран для ультрафильтрации с различной пропускной способностью (последовательно: XM-300, XM-100, XM-50, YM-30, PM-10. Amicon, США).

При фракционировании сыворотки крови собаки методом высаливания использовали различные концентрации сульфата аммония (10–80% с интервалом 10%), добавляя соответствующее количество насыщенного раствора сульфата аммония к 100 мл сыворотки. После выдерживания полученной смеси при комнатной температуре в течение 30 мин и при 4°C в течение 16 ч осадок отделяли центрифугированием (10000 g, 30 мин) и растворяли в 50 мл 0.01 М Na-фосфатного буфера (рН 8.5), содержащего 0.05 М NaCl. Полученный раствор диализовали против того же буфера в течение 16 ч при 4°C.

Изоэлектрическое осаждение белков сыворотки крови собаки осуществляли путем диализа анализируемого раствора против 0.05 М Na-ацетатного буфера с соответствующими значениями рН в диапазоне от 3.5 до 7.0 с интервалом 0.5 единицы рН в течение 16 ч при 4°C. Осадки отделяли

центрифугированием (18000 g, 30 мин) и растворяли в 0.01 М Na-фосфатном буфере (pH 8.5).

Ионообменную хроматографию фракции А проводили на DEAE-целлюлозе DE-52 (ОН-форма) (Fluka, Швейцария), уравновешенной 0.01 М Na-фосфатным буфером (pH 8.5), содержащим 0.05 М NaCl (колонка 1.6 × 24 см). Белки элюировали 0.2 М NaCl в том же буфере. Фракцию А-1 подвергали ионообменной хроматографии на той же колонке, уравновешенной 0.01 М Na-фосфатным буфером (pH 7.0), содержащим 0.05 М NaCl. Хроматографию проводили в ступенчатом градиенте концентрации NaCl (0.05–0.2–1 М) (см. рис. 1).

Плазминоген выделяли из фракции А-1-2 или из сыворотки крови собаки методом аффинной хроматографии на лизин-сефарозе как описано в работе [2]. Лизин-сефарозу получали путем посадки лизина (Serva, Германия) на ВгCN-активированную сефарозу 4В (Pharmacia, Швеция) по методике фирмы "Pharmacia" [12].

Электроблоттинг белков на PVDF-мембрану "Immobilon-P" (Millipore, США) после SDS-ПААГ-электрофореза проводили на приборе 2005 Transphor Electrophoresis Unit (LKB, Швеция) в 50 mM Na-боратном буфере (pH 8.0), содержащем 20% метанола и 0.02% 2-меркаптоэтанола, с последующим окрашиванием 0.1% раствором ку-масси синего R-250 в 50% метаноле, содержащем 10% уксусной кислоты.

N-Концевые аминокислотные последовательности белков, иммобилизованных на мембране Immobilon-P, определяли методом автоматической деградации по Эдману на белковом секвенаторе 477A (Applied Biosystems, США) с автоматической идентификацией фенилтиогидантоиновых производных аминокислот на анализаторе 120А той же фирмы.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю благодарность В.В. Архипову за работу с клетками по тестированию белковых фракций. Работа частично выполнена при финансовой поддержке ГНТПР "Новейшие методы биоинженерии" по разделу "Белковая инженерия" (грант № 03.0001Н-307), а также РФФИ (грант № 94-04-13562а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Архипов В.В.* Способ получения субкультуры клеток человека и животных: А. с. 1470765 СССР. // Б. И. 1990. № 34.
2. *Deutch D.G., Mertz E.T.* // *Science*. 1970. V. 170. P. 1095–1096.
3. *Levin E.G., Loskutoff D.J.* // *J. Cell Biol.* 1982. V. 94. P. 631–636.
4. *Bykowska K., Levin E.G., Rijkin D.C., Loskutoff D.J., Collen D.* // *Biochim. Biophys. Acta*. 1982. V. 703. P. 113–115.
5. *Murata T., Nakashima Y., Yasunaga C., Maeda K., Sushiki K.* // *Exp. Mol. Pathol.* 1991. V. 55. P. 105–118.
6. *Cajot J.F., Schleuning W.D., Medcalf R.L., Bamat J., Testuz J., Liebermann L., Sordat B.* // *J. Cell Biol.* 1989. V. 109. P. 915–925.
7. *Dalbaldo C., Masouye I., Saurat J.H., Vassali J.D., Sappino A.P.* // *Cancer Res.* 1994. V. 54. P. 4547–4552.
8. *Vassali J.-D., Sappino A.-P., Belin D.* // *J. Clin. Invest.* 1991. V. 88. P. 1067–1072.
9. *Антитела. Методы.* Т. 1. Ред. Д. Кэтти. Пер. с англ. М.: Мир, 1991. С. 89–92.
10. *Laemmli U.K.* // *Nature*. 1970. V. 227. P. 680–685.
11. *Bradford M.M.* // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.
12. *Affinity Chromatography. Principles and Methods* // Pharmacia. Fine Chemicals. 1979. P. 8–15.

Identification of the Protease Responsible for the Antiadhesive Properties of Dog Blood Serum

T. A. Muranova[#], I. G. Shvyrkova, and A. I. Rykunova

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Pushchino Branch,
Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142292 Russia

The antiadhesive effect of dog blood serum described previously was shown to be associated with the proteolytic activity of the serum components. The protease exhibiting this antiadhesive effect was isolated by several fractionation stages and identified with plasmin.

Key words: cell adhesion, plasmin, plasminogen, blood serum

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (27) 73-0882; fax: +7 (27) 79-0527; e-mail: muranova@fibkh.serpukhov.su.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 3. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.