



УДК 577.152+616.127+599.323.4

Применение ионообменной хроматографии для очистки аконитатгидратазы из миокарда крысы в условиях нормы и при индукции апоптоза

Йама Нинон Инес., Попова Т.Н., Рахманова Т.И.

ГОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж

Аннотация

С помощью фракционирования сульфатом аммония, гель-фильтрации на сефадексе G-25, ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе, гель-хроматографии на Тоауреарл HW-65 осуществлена очистка аконитатгидратазы (АГ; КФ. 4.2.1.3) из миокарда крысы в условиях нормы и при индукции апоптоза ФНО- α . Получены высокоочищенные ферментные препараты с удельной активностью 30,4 и 17,4 Е на мг белка, выходом 12,6 и 13,0%, соответственно. Оптимум рН АГ из нормального миокарда равен 8,0, из патологически измененного миокарда 7,8. При развитии апоптоза не происходит изменение молекулярной массы АГ, которая составляет $50,0 \pm 5,0$ кДа

Введение

В норме фактор некроза опухоли- α (ФНО- α) играет фундаментальную физиологическую роль в иммунорегуляции. Синтез и секрецию ФНО- α клетками иммунной системы и другими клетками индуцируют липосахариды и другие компоненты микроорганизмов [1], вследствие этого его уровень возрастает при инфицировании или поступлении в организм бактериальных эндотоксинов. Кроме того, ФНО- α принимает участие в регуляции апоптоза клеток. Но в некоторых случаях, ФНО- α проявляет многочисленные системные и локальные эффекты, многие из которых могут играть важную роль в развитии патологии миокарда.

Обладая способностью индуцировать апоптоз, ФНО- α также способен вызвать генерацию в клеточной мембране активных форм кислорода (АФК), что приводит к активации процессов свободнорадикального окисления (СРО) [2] и высвобождению каталитически активных ионов Fe^{2+} из вне- и внутриклеточных депо [3]. Снижение внутриклеточного уровня Fe^{2+} может достигаться за счет увеличения содержания цитрата. В этой связи интерес вызывает изучение особенностей функционирования ферментов, ответственных за накопление и утилизацию цитрата и прежде всего, аконитатгидратазы.

Аконитатгидратаза (АГ; КФ. 4.2.1.3) – фермент, катализирующий реакцию обратимой изомеризации цитрата в изоцитрат. Общеизвестен факт O_2^- -индуцируемого подавления активности АГ, что позволяет рассматривать данный

фермент в качестве чувствительной мишени действия АФК в условиях интенсификации СРО [4].

Целью данной работы явилась разработка способа очистки АГ из миокарда крысы в условиях нормы и при индукции апоптоза ФНО- α с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-25, ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе и гель-хроматографии на Тоаурpearl HW-65.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования использовали белых лабораторных крыс, содержащихся на стандартном рационе вивария. Сердце извлекали у самцов, массой 200-250 г. Для индукции апоптоза животным вводили актиномицин D внутривенно в дозе 20мкг на кг веса животного, через 20 минут вводили ФНО- α (1 мкг/кг). Материал для исследований забирали на 12-й час после введения ФНО- α [2]. Активность фермента определяли спектрофотометрически при 233 нм в среде следующего состава: 50мМ трис-НСl буфер (рН 8), содержащий 0,6мМ цитрат. О скорости АГ - реакции судили по возрастанию оптической плотности в ходе катализируемого ферментом превращения цитрата в цис-аконитат. За единицу активности (Е) АГ принимали количество фермента, катализирующее превращение 1мкмоль субстрата в 1 мин при 25°C. Определение белка проводили по методу Лоури [5].

Очистка АГ из нормального и патологически измененного миокарда крысы включала несколько этапов. Навеску ткани гомогенизировали в фарфоровой ступке в 4-кратном объеме охлажденной среды выделения следующего состава: 50мМ трис-НСl буфер (рН 7,8), содержащий 1мМ ЭДТА и 2% β -меркаптоэтанол. Гомогенат фильтровали и центрифугировали при 7000g 10 мин. Полученный супернатант подвергали фракционированию сульфатом аммония в границах насыщения 40-65%. Кристаллический сульфат аммония добавляли в количестве, соответствующем нижней границе насыщения. Смесь центрифугировали при 10000g в течение 15 мин. Затем к надосадочной жидкости добавляли сульфат аммония в количестве, соответствующем верхнему пределу насыщения. После центрифугирования при 15000g в течение 10 мин получали осадок, содержащий АГ. Полученный осадок растворяли в минимальном объеме исходной среды выделения.

Освобождение от низкомолекулярных примесей осуществляли с помощью гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-25 (1,4 x 20 см). Ферментный препарат наносили в количестве не более 20-25% от объема колонки. В качестве среды элюции для АГ использовали 10мМ трис-НСl буфер (рН 8,0), содержащий 0,1мМ ЭДТА и 1% β -меркаптоэтанол. Кроме этого, в среду элюции добавляли 10мкМ Fe^{2+} , что предотвращало потерю активности фермента в ходе гель-фильтрационной хроматографии на G-25 вследствие изменения исходной структуры Fe-S-кластера в активном центре АГ. Скорость элюции составляла 20-25мл/час.

Дальнейшую очистку фермента проводили с помощью ионообменной хроматографии на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой (1,2 x 13см). Среда элюции имела тот же состав, что и буфер, используемый на предыдущей стадии. После сорбции белка на колонке проводили десорбцию фермента с помощью ступенчатого градиента КСl в той же среде элюции. Колонку промывали 100мМ КСl (20 мл), что позволяло достичь удаления сопутствующих белков на данной стадии. Фермент десорбировался при использовании 200мМ КСl. Скорость элюции составляла 20-25 мл/час.

Завершающим этапом очистки была гель-хроматография на колонке с Тоаурpearl HW-65 (2,2 x 65см). Ферментный препарат наносили в количестве не более 1-3% от общего объема колонки. Элюцию проводили со скоростью 20мл/час средой того же состава, что и на предыдущих стадиях.

Все этапы выделения и очистки фермента осуществляли при температуре 0-4°C. Разработанный способ очистки позволил получить ферментативные препараты АГ из сердца крыс в условиях нормы и при индукции апоптоза, которые были использованы для изучения некоторых физико-химических свойств фермента.

Опыты проводили в 3-4-кратной биологической повторности, аналитические определения в каждой пробе – в 2-х повторностях. Статистическую обработку данных проводили на IBM PC/AT с использованием программы “Stadia”[8].

Результаты и их обсуждение

В результате 127- и 134-кратной очистки были получены препараты АГ из нормального и патологически измененного миокарда крысы, с удельной активностью 30,4 и 17,4 Е на мг белка, выходом 12,6 и 13,0%, соответственно (табл. 1). Необходимо отметить, что в гомогенате сердца крыс, подвергнутых воздействию ФНО- α наблюдалось снижение удельной активности АГ в 1,8 раза, относительно данного показателя в условиях нормы. Можно предполагать, что такое снижение удельной активности АГ при введении ФНО- α , связано с интенсификацией процессов свободнорадикального окисления, и следовательно, с разрушением железо-серного кластера данного фермента свободными радикалами, содержание которых увеличивается при патологии миокарда (рис. 1).

Таблица.1. Очистка аконитатгидратазы из миокарда крысы в норме и при индукции апоптоза ФНО- α

Стадия очистки	Условия опыта	Общая активность, $E_{общ}$	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	норма	$12,08 \pm 0,60$	$0,24 \pm 0,01$	100,00	1,00
	ФНО- α	$6,72 \pm 0,34$	$0,13 \pm 0,01$	100,00	1,00
Фракционирование	норма	$7,29 \pm 0,36$	$1,46 \pm 0,07$	60,40	6,10
	ФНО- α	$3,95 \pm 0,20$	$0,80 \pm 0,04$	59,00	6,15
Гель Фильтрация На сефадексе G-25	норма	$7,55 \pm 0,37$	$1,51 \pm 0,07$	62,50	6,30
	ФНО- α	$3,98 \pm 0,20$	$0,80 \pm 0,04$	59,00	6,15
Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	норма	$4,25 \pm 0,20$	$8,50 \pm 0,42$	35,20	35,42
	ФНО- α	$2,42 \pm 0,12$	$4,84 \pm 0,24$	36,00	37,20
Гель-хроматография на	норма	$1,52 \pm 0,07$	$30,40 \pm 1,52$	12,60	127,00

Тоаурpearl HW-65	ФНО- α	$0,87 \pm 0,04$	$17,40 \pm 0,87$	13,00	134,00
------------------	---------------	-----------------	------------------	-------	--------

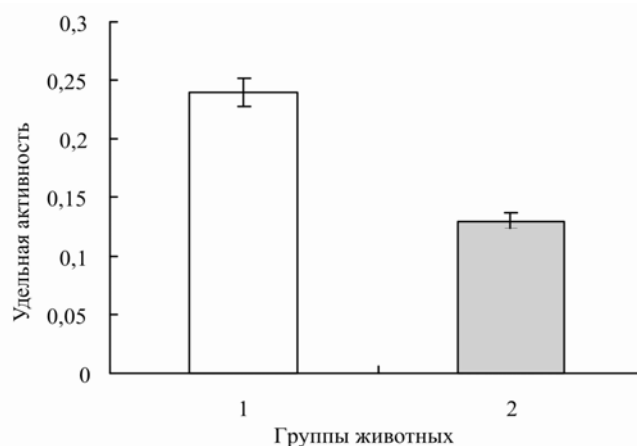


Рис. 1. Удельная активность аконитатгидратазы в миокарде крысы контрольной группы (1) и при введении ФНО- α (2)

В ходе ионообменной хроматографии на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой фермент десорбировался в виде одного пика. Причем, фермент, как из нормального, так и из патологически измененного миокарда десорбировался с носителя при одной и той же концентрации KCl (200мМ). Данная стадия позволила освободить ферментный препарат от значительного количества сопутствующих белков. В ходе ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе степень очистки возрастала в 6 раз. Применение гель-хроматографии на колонке с Тоаурpearl HW-65 не только способствовало увеличению степени очистки, но также и позволило определить молекулярную массу фермента. Установлено, что при развитии апоптоза не происходит изменения молекулярной массы АГ, которая составляет $50,0 \pm 5,0$ кДа.

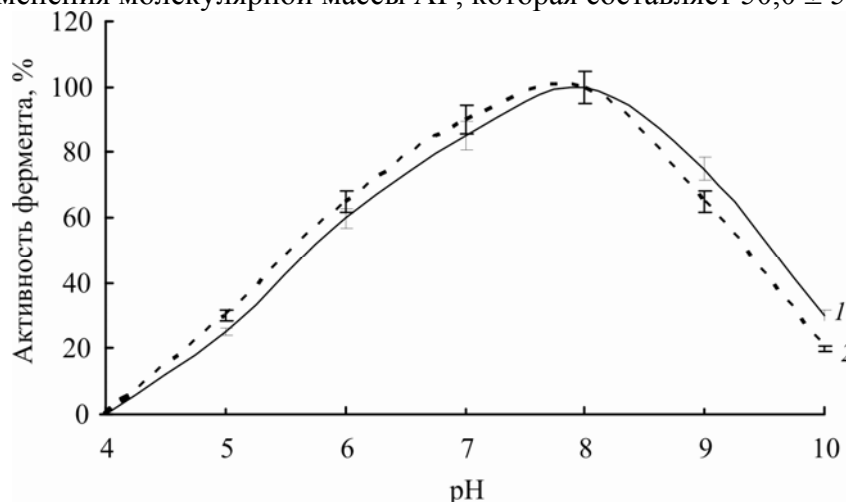


Рис. 2. Зависимость скорости АГ-реакции от концентрации ионов водорода в условиях нормы (1) и при индукции апоптоза (2)

Изучение зависимости скорости реакции от концентрации ионов H^+ показало, что АГ, как в условиях нормы, так и при патологии проявляет активность в диапазоне значений pH от 6 до 9. Выявленный оптимум pH АГ из нормального миокарда равен 8,0. АГ из патологически измененного миокарда проявляла максимальную активность при pH 7,8 (рис.2).

Заключение

Таким образом, с помощью процедур выделения, включающих гель-хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе и на Тоаурpearl HW-65, в результате 127- и 134-кратной очистки были получены ферментные препараты АГ из миокарда крысы в норме и при патологии, с удельной активностью 30,4 и 17,4 Е на мг белка соответственно, что позволило изучить некоторые физико-химические свойства фермента.

Работа поддержана финансированием Министерства образования и науки РФ по программе "Развитие научного потенциала высшей школы" РНП.2.1.1.4429

Список литературы

1. Старикова Э. А. Изменения поверхностного фенотипа эндотелиальных клеток влиянием провоспалительных и противовоспалительных цитокинов // Мед. Иммунология. 2003. Т.5. 349. С. 39-48.
2. Yogge Zhao. Activation of pro-death Bcl-2 family proteins and mitochondria apoptosis pathway in tumor necrosis-induced liver injury // The journal of Biological Chemistry. 2001. №29. P. 27432-27440
3. Осипов А. Н. Активные формы кислорода и их роль в организме // Успехи биол. Химии. 1990. Т. 31. С. 180-208
4. Gardner P.R. Aconitase is a sensitive and critical target of oxygen poisoning in cultured mammalian cells and in rat lungs // Proc. Nat. Acad. Sci. 1994. V. 91. №25. P. 12248-12252
5. Lowry O.H. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. V.194. No.1. P.265-275
6. Пальцев М.А. Молекулярная медицина и прогресс фундаментальных наук // М.: Медицина. 2000. 198 с.
7. Прохорова М.И. Методы биохимических исследований. // Изд. ЛГУ, Л. 1982
8. Ллойд Э. Справочник по прикладной статистике. // М.: Финансы и статистика, 1990. С. 496-513

Application of chromatography in the purification of aconitatehydratase from rat heart at norm conditions and under apoptosis induced by tumor necrosis factor - α

Yama Ninon Ines, Popova T.N., prof., doc.biol.Sc., Rakhmanova T.I., doc.biol.Sc.
Voronezh State University, Voronezh

Aconitatehydratase (AH; EC. 4.2.1.3) was purified from rat heart at norm conditions and under apoptosis induced by tumor necrosis factor α by ammonium sulphate fractionation, gel-filtration on Sephadex G-25, ion-exchange chromatography on DEAE-Cellulose, gel- chromatography on Тоаурpearl HW-65. Highly purified enzyme preparations were obtained, with specific activity of 30,4 and 17,4 E per mg of protein, a yield of 12,6 and 13,0 %, accordingly. The optimum of pH for AH from the normal myocardium is 8,0, from the pathologic heart - 7,8. Under apoptosis the molecular weight of AH did not change and was equal to $50,0 \pm 5,0$. kDa.

Ключевые слова: крыса, миокард, свободнорадикальное окисление, аконитатгидратаза, фактор некроза опухоли α