



УДК 541

Исследование тромбоцитарных белков по составу и молекулярной массе транспортными методами

Малахова И.И., Егорова О.С., Горшков Н.И.

*Учреждение Российской академии наук Институт высокомолекулярных соединений РАН,
Санкт-Петербург*

Журлов О.С., Иванов Ю.Б.

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург

Карцова А.А., Красиков В.Д.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

Поступила в редакцию 25.04.2012 г.

Аннотация

В противоинойфекционной защите организма, кроме нейтрофилов, заметную роль играют тромбоциты, поскольку они взаимодействуют с патогенными микроорганизмами *in vitro* с высвобождением низкомолекулярных бактерицидных белков. Дефенсины человека – семейство катионных и анионных антибактериальных белков (пептидов) с молекулярными массами 3-5 кДа, обладающих различным вкладом в антибактериальную защиту организма. Настоящая публикация посвящена анализу леофилизированных низкомолекулярных антибактериальных тромбоцитарных белков транспортными методами – тонкослойной хроматографии на монолитных метакрилатных (глицидилметакрилат-этиленгликольдиметакрилат (ГМА-ЭДМА)) слоях и электрофореза на полиакриламидном геле. Методами ТСХ и гель-электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия получено распределение по молекулярным массам аналитов с помощью индивидуальных и стандартных смесей белков. Проведение электрофореза на полиакриламидном геле в кислой и щелочной среде позволило исследовать электрофоретическую подвижность катионных и анионных белков в анализируемых образцах.

Ключевые слова: транспортные методы, хроматография, электрофорез, монолитные полимерные сорбенты, тромбоденсин, катионные (анионные) белки.

Platelets play an important role in anti-infective host defense except for neutrophils as they interact with the pathogens *in vitro* with the release of low molecular weight bactericidal proteins. Human trombicidins - a family of cationic and anionic antimicrobial proteins (peptides) with molecular masses of 3 – 5 kDa with various contributions to antibacterial defense. Current publication is devoted to analysis of low molecular weight antibacterial platelet protein by transports methods - thin-layer chromatography based on glycidyl methacrylate - ethylene glycol dimethacrylate (GMA-EDMA)) monolithic methacrylate layers and electrophoresis on polyacrylamide gels. TLC and sodium dodecyl sulfate polyacryamide gel electrophoresis obtained by the molecular weight distribution of analytes using individual and mixtures of standard proteins. Electrophoresis in various buffer systems (alkaline and acid-based) made it possible to study the electrophoretic mobility of cationic and anionic proteins in the analyzed samples.

Keywords: transports methods, chromatography, electrophoresis, monolithic polymeric sorbents, trombicidins, low molecular weight cationic (anionic) proteins

Введение

В последнее десятилетие формирование устойчивости микроорганизмов ко многим современным антимикробным препаратам диктует необходимость поиска новых средств терапии инфекционных заболеваний. В настоящее время в качестве

бактерицидных препаратов в основном применяются синтетические и полусинтетические антибиотики (*хинолины, фторхинолы, аминогликозиды* и др.), к которым у большинства микроорганизмов быстро формируется устойчивость [1,2]. Кроме того, данные препараты обладают токсическим действием на органы и системы организма человека и животных, способствуя развитию дисбактериоза.

В противоинфекционной защите организма, кроме нейтрофилов, важную роль играют тромбоциты, поскольку они осаждаются на патогенных микроорганизмах, обладая противогрибковым, бактерицидным действием [3]. Исследования роли отдельных тромбоцитарных белков и пептидов в подобных процессах и поиск способов их выделения и очистки является актуальной задачей биохимии и медицины. Комплексные исследования, проводимые нами с целью разработки новых способов выделения и анализа целевых биопрепаратов из крови человека и животных с использованием таких физико-химических методов, как хроматография, капиллярный электрофорез и гель-электрофорез, направлены на выделение и изучение тромбоцитарных белков – *тромбодифензинов* [4,5].

Как известно, в физической химии полимеров к транспортным методам относят ультрацентрифугирование, диффузию, электрофорез и хроматографическое разделение макромолекул в растворах [6]. Несомненная связь этих методов между собой позволяет нам продолжить изучение этих белков не только хроматографическими [7], но и электрофоретическими методами [8].

Среди стандартных методов идентификации (определения ММ) белков основную роль играют электрофорез в полиакриламидном геле, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) и тонкослойная хроматография (ТСХ). Причем успехи планарных электрофоретических методов обусловлены хорошей чувствительностью, простотой и относительно невысокой стоимости метода, а для хроматографии в тонком слое в значительной степени – с развитием аффинной ТСХ и разработкой новых сорбентов.

Известно, что на немодифицированных кремнеземных сорбентах происходит необратимая адсорбция биополимеров как нативных, так и обладающих четвертичной структурой. Использование новых монолитных сополимерных метакрилатных сорбентов, обладающих умеренно гидрофобными свойствами [9], позволяет значительно упростить задачу как на стадии предварительного выделения белков из тромбоцитарной массы, так и на стадии определения их молекулярных масс. В предыдущей статье [10] были приведены данные по ступенчатой процедуре очистки и выделения низкомолекулярных тромбоцитарных белков (ТКБ) методами твердофазной экстракции (ТФЭ) и обращенно-фазовой жидкостной хроматографии. Полученные данные свидетельствуют о катионно-анионной природе тромбоцитарных низкомолекулярных белков (ТНБ) с ММ от 3 до 5 кДа, находящихся в сложной смеси с высокомолекулярными «примесными» белками (*«тяжелый» белковый матрикс*). Настоящая работа акцентирует внимание на разработке транспортных планарных методов аналитического контроля ТНБ в сложной смеси примесных белков и пептидов.

Эксперимент

Химические реактивы и стандартные вещества.

В работе использовали растворители и химические реактивы марок ХЧ, ОСЧ, ЧДА (Нева-Реактив, Криохром, Реахим, Россия). Стандарты белков фирм “Sigma” (3кДа – 42 кДа) и “Fermentas” (10 кДа – 170 кДа), США.

Выделение тромбоцитарной массы белка.

Использовались лиофилизированные препараты, содержащие смесь антимикробных пептидов из тромбоцитов человека (ТНБ), получаемые из стандартного тромбоконцентрата (станция переливания крови), содержащего $0,55 \times 10^{11}$ тромбоцитов.

Леофилизированный препарат «А» - это кислотный ацетатный экстракт; 50 мл тромбоцитарной массы разводили уксусной кислотой в соотношении 1:5 (5 частей уксусной кислоты), подвергали 3-х кратному замораживанию при -25°C и оттаиванию ($+3^{\circ}\text{C}$ – $+5^{\circ}\text{C}$). Центрифугировали при 8.000 об/мин; концентрация ацетата в конечном препарате - 5%; леофилизировали в ампулах.

Леофилизированные препараты «В» - «D» – тромбоконцентрат (со станции переливания крови) отмывали от сыворотки фосфатным буфером $\text{pH}=6,8$. На первом этапе тромбоконцентрат подвергли 3-х кратному замораживанию (-110°C) и оттаиванию ($+3^{\circ}\text{C}$ - $+5^{\circ}\text{C}$), а затем центрифугировали при 8000 об/мин в течение 30 мин. Надосадок фильтровали через мембранные фильтры Dugaroge 0,22 мкм. Фильтрат подвергали ультрафильтрации (8000 об/мин*60 минут) через фильтры фирмы Corning Spin-X UF 6ml с низкой сорбцией белка, пропускающие белки менее 10 кДа. Затем фильтрат леофилизировали.

Образец «В» – содержит тромбоцитарные белки до ультрафильтрации («С»+«D»). Образец «С» предстает собой смесь тромбоцитарных белков, которые не прошли через мембрану при ультрафильтрации. Образец «D» – содержит тромбоцитарные белки – ультрафильтрат менее 10 кДа.

Исходная концентрация леофилизированного белка в 0.01% уксусной кислоте составила 2мг/мл.

Тонкослойная хроматография.

Планарную (тонкослойную) хроматографию проводили методом восходящего элюирования при помощи "Базового набора для ТСХ" фирмы "Ленхром" (Россия). Аналитический контроль результатов осуществляли с помощью видеоденситометра "ДенСкан", расчет параметров удерживания и идентификации молекулярных масс проводили с помощью специальной программы «Dens» (НТЦ «Ленхром», Россия) в люминесцентной (365нм) области спектра. Стандартные белки и дефенсины разделяли в виде их производных с флуорескаминем (Рис.1).

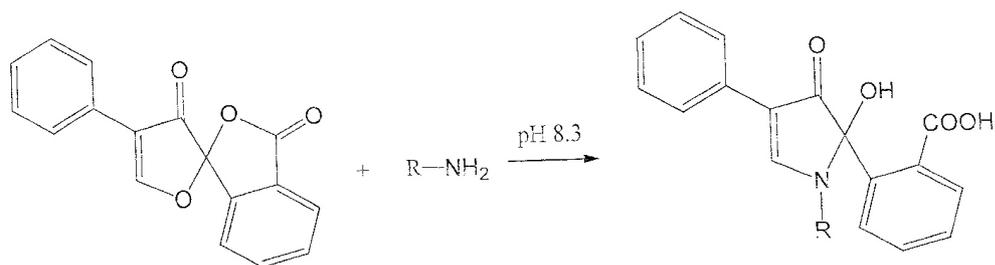


Рис. 1.Схема взаимодействия белка с флуоресцентной меткой

Получение монолитных полимерных ТСХ-пластинок на основе глицидилметакрилата-этиленгликольдиметакрилата (ГМА-ЭДМА) проводили на разработанных нами установках для фотополимеризации. В качестве сомономеров использовали ГМА и ЭДМА; фотоиницирование радикальной полимеризации осуществляли с помощью инициатора Дарокур-1173. В качестве порогенного растворителя выбран циклогексанол. Монолитные слои с заданной реологией были

ковалентно связаны с силинизированной стеклянной подложкой согласно следующей схеме (рис.2).

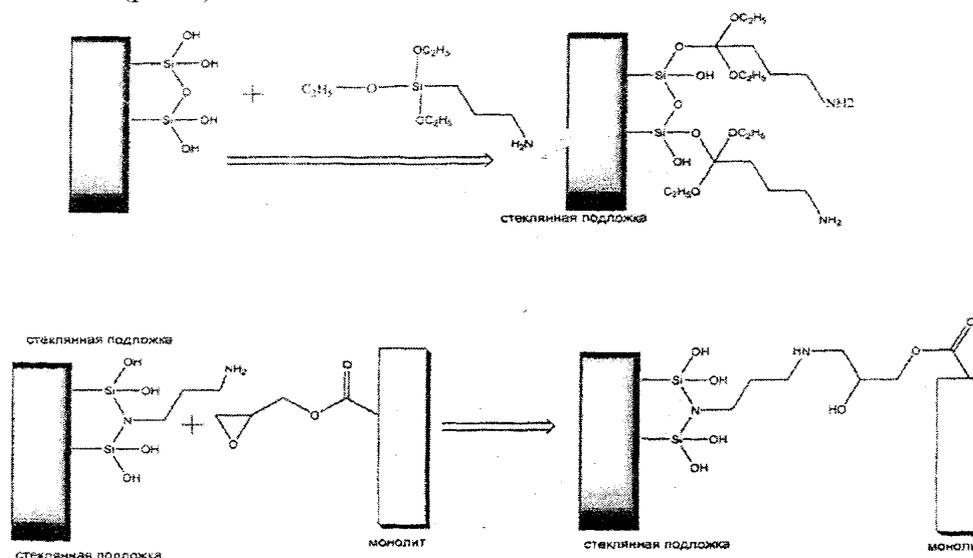


Рис. 2. Модификация поверхности стеклянной подложки для монолитной ТСХ;
а) силинизация стекла с использованием 3-аминопропилтриэтоксисилана;
б) связывание монолитного слоя (ГМА-ЭДМА) с силинизированной поверхностью

Электрофорез.

Эксперименты проводили в электрофоретической камере “Hoefel” (Германия) при силе тока $I = 30 \text{ mA}$ и $U=160 \text{ V}$. Электрофорез осуществляли на полиакриламидных (ПААГ) гелях, размеры которых задавались полимеризационной формой (80x70x20 мм). Для полимеризации акриламида использовали: сомомеры – акриламид и N,N'-метиленабисакриламид; инициатор с катализатором – 10%-ый раствор персульфата аммония (PSA) и тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД), соответственно. Полимеризация геля проводилась в течение 1-1.5 ч при комнатной температуре.

Идентификацию молекулярных масс (ММ) анализируемых смесей белков проводили с помощью видеоденситометра фирмы “BioRad” (США) и программы “Quantity One”.

Обсуждение результатов

Полученные лиофилизированные белки были исследованы методами ВЭТСХ с целью определения распределения по молекулярным массам, а также идентификации низкомолекулярных тромбоцитарных белков с ММ менее 10 кДа.

На рис. 3 представлена хроматограмма флюоресцирующих производных индивидуальных белков *химотрипсина*, *миоглобина*, *инсулина* и *трихогиалина*, а также анализируемого образца «А» на монолитном слое.

Из представленных данных видно, что для низкомолекулярных белков химотрипсина (ММ=25000 Да, $R_f=0.42$), миоглобина (ММ=17000 Да, $R_f=0.82$) и инсулина (ММ=6000 Да, $R_f=0.89$) удалось получить разделение строго в соответствии с молекулярными массами. Высокомолекулярный белок трихогиалин остается на старте (ММ=190000 Да, $R_f=0$). Таким образом, можно сделать вывод, что белки с меньшей молекулярной массой имеют большую подвижность на монолитном слое, чем белки с большей молекулярной массой и могут быть хорошо

разделены на монолитных сополимерных пластинках. В тромбоцитарной массе образца «А» («1» на рис.3) присутствует «тяжелый матрикс» (хроматографическое пятно с $R_f=0$), состоящий из высокомолекулярных белков и белки с $MM \sim 7000-17000$ Да ($R_f=0.84$) и $MM \sim 25000$ Да ($R_f=0.43$).

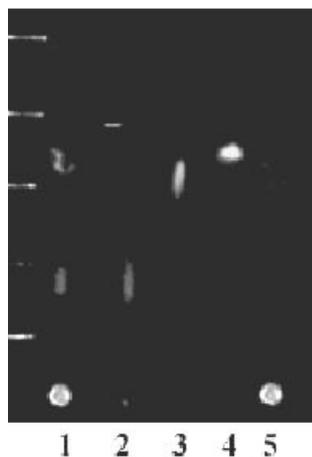


Рис. 3.. Хроматограмма производных флуорескамина ТКБ (образец «А») и стандартных белков на пластинках с ГМА-ЭДМА слоем (ООО «НЦ» ЛенХром). Элюент: 0,1% водный р-р ТФУ-ацетонитрил (30:70).

Детектирование: $\lambda=365$ нм.
1 – образец «Д», 2 – химотрипсин,
3 – миоглобин, 4 – инсулин,
5 – трихогиалин

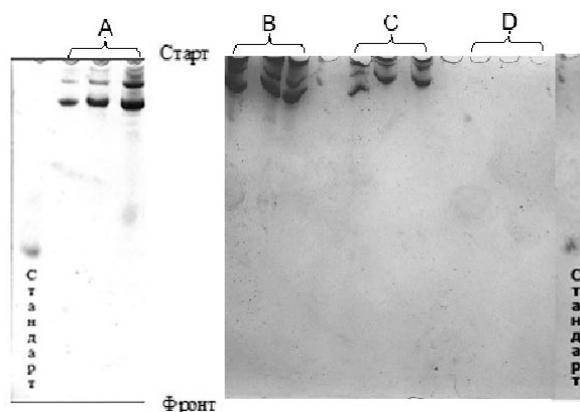


Рис. 4. Электрофорез в кислой среде (5%-ная уксусная кислота), pH 2.2. Стандарт – лизоцим, «А», «В», «С», «D» – леофилизированные белки. Объем наносимых проб белка – 5, 7, 10 мкл. Раствор для проб – 9М мочевины+15%-ная уксусная кислота. Соотношение проба : раствор для проб – 2:1 (объемн.), соотв. Детектирование: окрашивание раствором Кумасси в течение 30 мин

Как уже упоминалось ранее, тромбоденсинины имеют молекулярную массу меньше 10 кДа, однако по результатам ТСХ в ожидаемой низкомолекулярной области их нет. Связи с этим, возник вопрос о составе белковой смеси и распределением по молекулярным массам белков. Для выяснения этого обстоятельства был осуществлен ряд экспериментов в условиях гель-электрофореза на полиакриламидном геле.

С помощью электрофореза в кислой буферной системе можно оценить спектр катионных белков по подвижности и заряду. Это качественный метод, показывающий только нативную (присущую ему в живой клетке) форму белка. Детектирование белков осуществляли с помощью 1% раствора красителя Кумасси G-250, приготовленном в смеси формалин : метанол : вода в соотношениях 15:27:58.

Как видно из Рис.4, разделение белковых смесей происходит до 15 кДа (сравнение проводили по подвижности стандартного белка – лизоцима с молекулярной массой $MM = 14.5$ кДа), что говорит о малой подвижности присутствующих белков.

В последнее время рядом авторов было показано, что в крови человека и животных кроме тромбоцитарных катионных белков (ТКБ) образуется и ряд анионных белков (ТАБ), обладающих различным вкладом в антибактериальную защиту организма при слабокислых и слабощелочных pH [11]. Был проведен электрофорез и в щелочной среде, который так же является качественным методом, как и кислый электрофорез, только в этом случае белки двигаются от анода к катоду.

Из рис. 5 видно, что присутствующие в третьем образце анионные белки также не обладают большой активностью и недалеко уходят от старта. Из этого следует, что обсуждаемые белки имеют большую массу, и, следовательно, незначительную электрофоретическую подвижность. Последняя зависит от суммарного заряда, молекулярной массы, конфигурации и жесткости упаковки полипептидной цепи. Вклад каждого из этих факторов неизвестен и может существенно меняться в зависимости от условий электрофореза. Для получения строгой количественной корреляции между каким-либо из перечисленных параметров и электрофоретической подвижностью белка требуется исключение влияния остальных.



Рис. 5. Электрофорез в щелочной среде.

Электролитный буфер: трис-глицин, рН 8.3. Раствор для проб: глицерин – 0.25М Трис-НСl. Соотношение проба : раствор для проб – 2:1 (объемн.), соотв.

Детектирование: окрашивание раствором Кумасси в течение 30 мин. Объем наносимых проб образца «А»: 5 мкл, 10 мкл, 12 мкл.

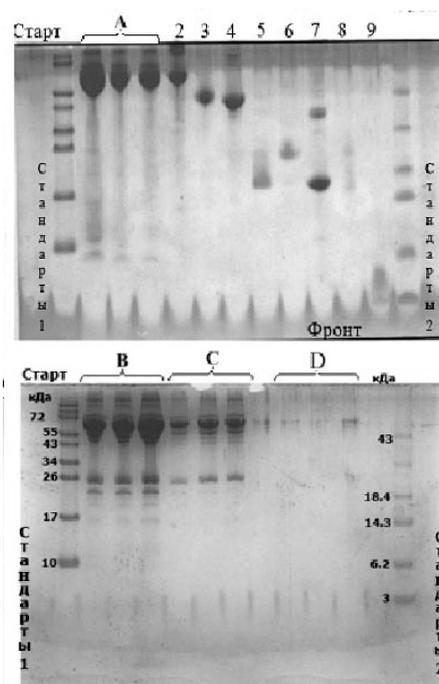


Рис. 6. Электрофорез белков в денатурирующих условиях с ДДСН.

Объем наносимых смесей стандартов – 3 мкл. Объем проб белка – 5, 7, 10 мкл.
2 – БСА (66кДа); 3 – пероксидаза (44 кДа); 4 – альбумин яичный (43 кДа); 5 – β-лактоглобулин (36.5 кДа); 6 – химотрипсिनоген (25 кДа); 7 – миоглобин кита (17 кДа); 8 – рибонуклеаза (13 кДа); 9 – инсулин свиной (6 кДа).

Катодный буфер – 0.1М Трис-Трицин, 0.1%-ый ДДСН, рН 8.25. Анодный буфер: 0.2М раствор Трис-НСl рН 8.9. Раствор для проб – 6% - ДДСН, 21% глицерина в 0.165 М Трис-НСl буфере. Соотношение проба : раствор для проб – 2:1 (объемн.) соотв. Детектирование: окрашивание раствором Кумасси в течение 30 мин.

Электрофорез в ПААГ с использованием додецилсульфата натрия (ДДСН) позволяет фракционировать белки в зависимости от значений только одного

параметра — молекулярной массы. Для этого белки в исходном растворе препарата обрабатывают не менее, чем трехкратным избытком ДДСН. В данных условиях все полипептиды имеют одинаковый удельный заряд и разделяются обратно пропорционально логарифму их молекулярной массы. Для разрыва всех S—S-связей белковый препарат обрабатывают концентрированным раствором дитиотреитола при повышенной температуре.

Результаты электрофореза в денатурирующих условиях в присутствии ДДСН показали, что комплексные препараты тромбоденсинов содержали белки с молекулярной массой в диапазоне 14-25 кДа, 44- 70 кДа и выше – образец «В»; 25-27 кД, 44-70 кДа и выше – образец «С»; от 60кДа и выше, 20-25 кДа и низкомолекулярные пептиды с массой 7,61 – 10,47 кДа – образец «А», что согласуется с результатами ТСХ; в образце «D» не были зафиксированы даже высокомолекулярные белки (Рис.6). Увеличение изначальной концентрации белка в 0.01% растворе уксусной кислоты до 20 мг/мл не позволило идентифицировать белки образца «D» и более низкомолекулярные аналиты в других образцах.

Заключение

Результаты аналитического контроля тромбоцитарных белков в представленной работе показали перспективность использования для этих целей метода ТСХ с применением макропористых монолитных метакрилатных слоев. Достоверность полученных данных подтверждается схожими результатами по определению ММ низкомолекулярных белков методом гелевого электрофореза. Однако оба транспортных метода характеризуются недостаточной чувствительностью в случае анализа смесей низкомолекулярных тромбоцитарных белков без дополнительного концентрирования, что представляет собой самостоятельную задачу.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований №11-04-97107.

Список литературы

1. Yeaman M. R. The role of platelets in antimicrobial host defence // Clin. Infect.Dis. 1997. Vol.25. P.951-968.
2. Shailaja V.V., Himabindu V., Anuradha K. Et al. In vitro activity of gatifloxacin against gram negative clinical isolates in a tertiary care hospital // Indian J. Med. Microbiol. – Vol.22. – P.222-225.
3. Mosca D.A., Hurst M.A., So W. et al. IB-367, a protegrin peptide with in vitro and in vivo activities against the microflora associated with oral mucositis // Antimicrob. Agents Chemother. – 2000. – Vol.44. – P.1803-1808.
4. Antimicrobial proteins and peptides: anti-infective molecules of mammalian leukocytes // Journal of Leukocyte Biology, - 2004. – Vol. 64. – P. 909-925.
5. Allan M. Torres, Philip W. Kuchel, The b-defensin-fold family of polypeptides // Toxicon 44, – 2004, - 581–588
6. Нефедов П.П., Лавренко П.Н. Транспортные методы в аналитической химии полимеров
7. Остерман Л. А. , Хроматография белков и нуклеиновых кислот, Москва, 1985 г.

8. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование, Москва, 1981 год.
9. F. Svec, T.B. Tennikova, Z. Deyl, Monolithic Materials : Preparation, Properties and Applications // Journal of Chromatography Library, – 2003 – Vol. 67.
10. Горшков Н.И., Малахова И.И., Журлов О.С., Иванов Ю.Б., Красиков В.Д. Жидкостная хроматография тромбоцитарных белков // Сорбционные и хроматографические процессы 2010, т.10, вып.5, с.661-668
11. Tang Y.-Q, Yeaman M. R., Selsted M. E. Antimicrobial peptides from human platelets//Infection and Immunity. 2002. Vol. 70 P. 65-6533

Егорова Ольга Сергеевна – ст. лаборант, Учреждение Российской академии наук Институт высокомолекулярных соединений РАН, С-Петербург

Малахова Ирина Ивановна – к.х.н., н.с., Учреждение Российской академии наук Институт высокомолекулярных соединений РАН, С-Петербург

Горшков Николай Иванович – к.х.н., с.н.с., Учреждение Российской академии наук Институт высокомолекулярных соединений РАН, С-Петербург

Журлов Олег Сергеевич – к.б.н., с.н.с., Государственное учреждение Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург

Иванов Юрий Борисович – д.б.н., в.н.с. Государственное учреждение Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург

Карцова Анна Алексеевна – профессор, д.х.н., Санкт-Петербургский государственный университет, химический факультет, Санкт-Петербург

Красиков Валерий Дмитриевич – д.х.н., в.н.с., Учреждение Российской академии наук Институт высокомолекулярных соединений РАН, С-Петербург

Egorova Olga S. – senior laboratorian Institute of Macromolecular Compounds Russian Academy of Sciences, St.-Petersburg

Malakhova Irina I. – PhD, researcher, Institute of Macromolecular Compounds Russian Academy of Sciences, St.-Petersburg

Gorshkov Nikolay I. – PhD, senior researcher, Institute of Macromolecular Compounds Russian Academy of Sciences, St.-Petersburg

Zhurlov Oleg S. – PhD, senior researcher, Institute of Cellular and Intercellular Symbiosis Ural Branch of Russian Academy of Sciences, Orenburg

Ivanov Yriy B. – DrSci, leading researcher, Institute of Cellular and Intercellular Symbiosis Ural Branch of Russian Academy of Sciences, Orenburg

Kartsova Anna A. – professor, PhD, Saint-Petersburg State University, department of chemistry, St.-Petersburg

Krasikov Valerii D. – DrSci, leading researcher, Institute of Macromolecular Compounds Russian Academy of Sciences, St.-Petersburg, lenchrom@hq.macro.ru