



УДК 577.112.088.3:543.544

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА БИОПОЛИМЕРОВ МЕТОДОМ
АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ
X*. БИОСПЕЦИФИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ПОЛУЧЕНИЮ
КОЛЛАГЕНОВЫХ ПЕПТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ УЧАСТОК
СВЯЗЫВАНИЯ С ФИБРОНЕКТИНОМ

Митина В. Х., Французова Н. А., Кляшницкий Б. А.

*Институт биологической и медицинской химии Академии
медицинских наук СССР, Москва*

Предложен биоспецифический способ одностадийного выделения коллагеновых пептидов, содержащих участок связывания с фибронектином. Осуществлено выделение $\alpha 1\text{CB7}$ пептида бромцианового расщепления коллагена типа I аффинной хроматографией на адсорбентах, содержащих иммобилизованный желатилсвязывающий домен фибронектина с молекулярной массой 45 кДа. Предлагаемый метод обеспечивает сокращение стадий выделения пептидов по сравнению с известным способом и позволяет за короткое время получать высокоочищенный $\alpha 1\text{CB7}$ -пептид, пригодный для биохимических исследований.

Коллагеновые пептиды, содержащие участок связывания с фибронектином, представляют значительный интерес как для изучения механизмов биосинтеза коллагена и его взаимодействия с различными биополимерами (фибронектин, коллагеназы), так и в прикладном аспекте, в частности для использования в качестве лигандов в биоспецифических адсорбентах. Такого рода биоспецифические адсорбенты могут быть использованы для выделения фибронектина [1] и для очистки коллагеназы животных, поскольку единственное для каждой α -цепи место расщепления коллагена этим ферментом и участок связывания с фибронектином локализованы в одних и тех же бромциановых пептидах ($\alpha 1\text{CB7}$ и $\alpha 2\text{CB5}$) [2, 3]. Биоспецифические взаимодействия, положенные в основу настоящей работы, представлены в виде схемы на рис. 1. Доступность коллагеновых пептидов, содержащих участок связывания с фибронектином, будет способствовать биохимическим исследованиям функционирования компонентов соединительной ткани и межклеточного матрикса и дальнейшему развитию методов выделения и очистки биополимеров, имеющих сродство к коллагену.

Существующий метод получения указанных выше бромциановых пептидов, заключающийся в фрагментации α -цепей коллагена бромистым цианом с последующей ионообменной хроматографией пептидной смеси на СМ-целлюлозе, представляет собой достаточно длительный и трудоемкий процесс [4]. Кроме того, для получения электрофоретически гомогенных пептидов может понадобиться дополнительная хроматография получаемых препаратов на СМ-целлюлозе и биогеле А.

Цель настоящей работы — изучение возможности альтернативного биоспецифического подхода к получению коллагеновых пептидов, содержащих участок связывания с фибронектином, путем хроматографии соответствующих пептидных смесей на адсорбентах с иммобилизованным желатилсвязывающим доменом фибронектина с молекулярной массой 45 кДа (Д45). Основанием для постановки такой задачи послужила работа [5], в которой описано применение адсорбента Д45-сефароза для выделения нативных коллагенов. Оценка возможностей биоспецифического подхода проводилась на примере выделения $\alpha 1\text{CB7}$ -пептида из смеси бромциано-

* Сообщение IX см. [1].

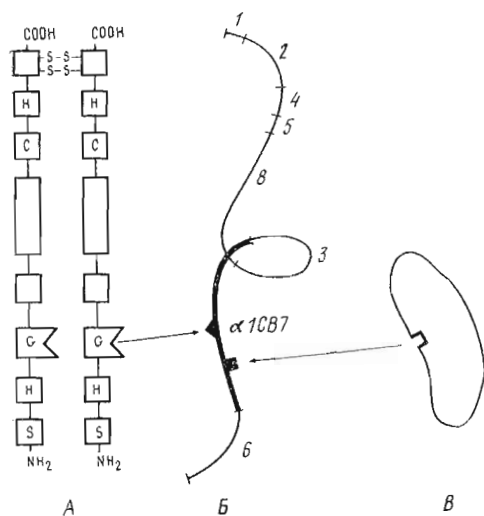


Рис. 1

Рис. 1. Схема биоспецифического взаимодействия $\alpha 1CB7$ -пептида $\alpha 1$ -цепи коллагена с фибронектином и животной коллагеназой. А — фибронектин (Н — гепаринсвязывающий домен, С — домен, ответственный за связывание с клетками, S — домен, связывающий *Staphylococcus aureus*, G — желатинсвязывающий домен; Б — $\alpha 1$ -цепь коллагена (жирной линией выделен $\alpha 1CB7$ -пептид), В — коллагеназа

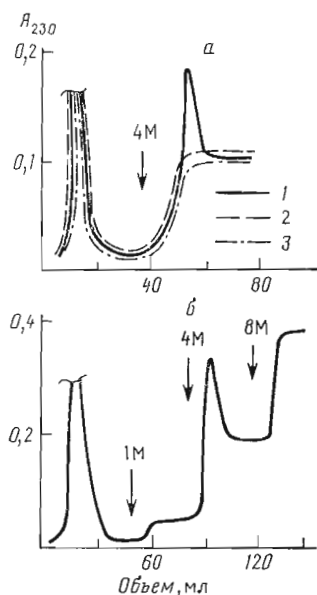


Рис. 2

Рис. 2. Хроматография на Д45-сефарозе (I) отдельных бромциановых пептидов $\alpha 1CB7$ (1), $\alpha 1CB8$ (2) и $\alpha 1CB6$ (3) (а) и смеси бромциановых пептидов $\alpha 1$ -цепи (б)

вых пептидов $\alpha 1$ -цепи коллагена типа I аффинной хроматографией на адсорбентах двух типов, содержащих иммобилизованный Д45: Д45-сефароза CL-4В (I) и Д45-гидразидомалоилсефароза CL-4В (II). Мы полагали, что эффективность такого подхода будет обусловлена тем фактом, что из 8 бромциановых пептидов $\alpha 1$ -цепи лишь $\alpha 1CB7$ -пептид будет биоспецифически взаимодействовать с иммобилизованным Д45.

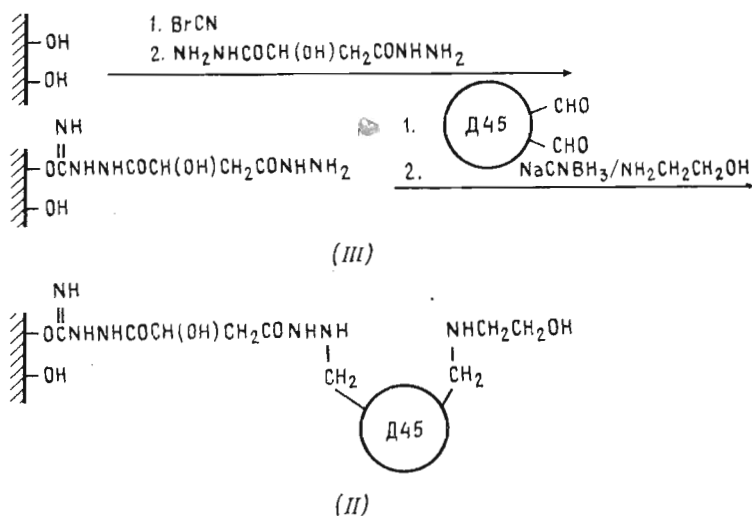
Лиганд для сорбентов (I) и (II) — домен Д45 был получен частичным протеолизом фибронектина под действием α -химотрипсина. В принципе желатинсвязывающий домен фибронектина может быть получен расщеплением фибронектина различными протеиназами, включая трипсин, плазмин, термолизин, эластазу, катепсины D, G, В и др. [6, 7]. После протеолиза трипсином желатинсвязывающая фракция содержит не менее трех компонентов, основной из которых имеет молекулярную массу 30 кДа [8]. Выход указанной фракции составлял всего 2% от веса исходного фибронектина. Более однозначно протекает протеолиз фибронектина α -химотрипсином, приводящий в основном к Д45 с выходом 5%. Частичный протеолиз фибронектина из плазмы крови человека осуществляли α -химотрипсином в течение 1 ч при 37°С при соотношении белок — фермент 300 : 1. Полученную смесь доменов хроматографировали на желатин-сефарозе [1], уравновешенной 0,025 М трис-НСI-буфером, рН 7,0, содержащим 0,5 мМ EDTA и 50 мМ NaCl. Фракция, элюированная тем же буфером с 4 М мочевиной, содержала Д45, использованный для синтеза аффинных адсорбентов (I) и (II).

Адсорбент (I) был получен стандартным методом присоединением Д45 к сефарозе CL-4В, активированной бромистым цианом [9]. Выбор в качестве носителя поперечно-сшитой сефарозы был обусловлен необходимостью последующего хроматографического выделения $\alpha 1CB7$ -пептида при 37°С, так как адсорбент на основе указанного носителя будет характеризоваться большей термической устойчивостью. Следует учитывать, что при непосредственном присоединении Д45 к сефарозе CL-4В возможно нарушение

его нативной конформации, и, как следствие, уменьшение сродства иммобилизованного Д45 к $\alpha 1\text{CB7}$ -пептиду и возникновение стерических трудностей при их биоспецифическом взаимодействии. Этих нежелательных эффектов можно, по-видимому, избежать при иммобилизации домена Д45 через его углеводную часть.

Известно, что Д45 содержит основную часть углеводных цепей фибронектина (до 60%) [10]. Кроме того, установлено, что углеводная часть фибронектина не участвует в его взаимодействии с коллагеном. Следовательно, можно было ожидать, что иммобилизация домена Д45 по углеводным цепям, не затрагивающая его белковой части, приведет к новому, более эффективному аффинному адсорбенту для выделения коллагена и его пептидов. В ходе выполнения данной работы в литературе появились сообщения об аналогичной иммобилизации гликопротеинов на гидразидосорбентах через углеводную часть биополимеров [11, 12].

Для синтеза адсорбента (II) домен Д45 подвергали окислению периодатом натрия при pH 6 в течение 1 ч. Белковую фракцию, содержащую окисленный домен, отделяли от низкомолекулярных компонентов на колонке с сефадексом G-25 и затем инкубировали 3 ч при 20° С с гидразидомалоилсефарозой CL-4В (III). Сорбент (III) был получен иммобилизацией дигидразида яблочной кислоты на бромцианактивированной сефарозе CL-4В. В отличие от широко используемой «гидразидосулцинил (или гидразидоадилоил)-сефарозы» этот промежуточный сорбент характеризуется повышенной гидрофильностью. В результате сочетания окисленного домена Д45 с сорбентом (III) был получен адсорбент (II) (схема).



Количество иммобилизованного домена Д45 определяли по разности содержания азота (по Кьельдалю) в исходном растворе белка, в фильтрате и промывных водах после иммобилизации. Согласно полученным данным, адсорбенты (I) и (II) содержали соответственно 1,4 и 0,9 мг Д45/мл упакованного геля.

На следующем этапе работы были проведены модельные эксперименты по раздельной хроматографии желатина и индивидуальных бромциановых пептидов $\alpha 1$ -цепи коллагена на адсорбентах (I) и (II). Хроматографию проводили в условиях, аналогичных используемым при выделении фибронектина на желатин-сефарозе [1]: уравнивающий буферный раствор (УБР) — 0,05 М трис- HCl , 0,15 М NaCl , 0,02% азид натрия, pH 7,4, последовательное элюирование растворами 1, 4 и 8 М мочевины в УБР. Фракции анализировали по поглощению при 230 нм. Хроматографию проводили при 37° С. Было показано, что желатин и $\alpha 1\text{CB7}$ -пептид (рис. 2а) в условиях насыщения сорбента связывались с адсорбентами и элюировались 4 М мочевиной, в то время как $\alpha 1\text{CB6}$ - и $\alpha 1\text{CB8}$ -пептиды не удерживались адсор-

бентами и вымывался в УБР (рис. 2а). Эти данные подтверждают биоспецифический характер связывания желатина и $\alpha 1\text{CB7}$ -пептида с иммобилизованным Д45. Отметим, что ни желатин, ни $\alpha 1\text{CB7}$ -пептид не сорбируются в описанных выше условиях на немодифицированной сефарозе CL-4В или на гидразидомалоил-сефарозе CL-4В (III). Емкость адсорбентов (I) и (II) по связыванию желатина, определенная в условиях насыщения колонки, составляла 0,34 и 0,61 мг/мг иммобилизованного Д45, а по связыванию $\alpha 1\text{CB7}$ -пептида — 0,21 и 0,44 мг/мг лиганда. Таким образом, адсорбент (II) на основе окисленного периодата Д45 был в 2 раза эффективнее сорбента (I), полученного прямым присоединением Д45 к бромцианактивированной сефарозе.

На основании результатов модельных экспериментов было осуществлено одностадийное выделение $\alpha 1\text{CB7}$ -пептида из смеси восьми бромциановых пептидов $\alpha 1$ -цепи коллагена аффинной хроматографией на адсорбентах (I) и (II) (рис. 2б). Указанную смесь пептидов пропускали через небольшие колонки с адсорбентами (I) и (II), уравновешенными УБР, со скоростью потока 60 мл/ч при 37° С. После выхода несвязавшихся пептидов колонки промывали 1 М мочевиной в УБР и электрофоретически чистый $\alpha 1\text{CB7}$ -пептид вымывали 4 М мочевиной в УБР. Затем сорбент промывали 8 М мочевиной в УБР.

Предлагаемый метод получения $\alpha 1\text{CB7}$ -пептида обеспечивает сокращение стадий по сравнению с известным способом [4] и позволяет за короткое время получать высокоочищенный $\alpha 1\text{CB7}$ -пептид в достаточных для биохимических исследований количествах.

Параллельно с настоящими исследованиями аналогичный биоспецифический подход успешно применен в нашем институте при изучении биосинтеза коллагеновых белков для выделения насцентных коллагеновых пептидов, содержащих участки связывания с фибронектином.

Экспериментальная часть

В работе использовали сефарозу CL-4В, сефадекс G-25 (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция); α -химотрипсин и ингибитор трипсина из соевых бобов (Reanal, ВНР), желатин типа I (Sigma, США); цианоборгидрид натрия и фенилметансульфонилфторид (Fluca, Швейцария), бромциан (Serva, ФРГ). Выделение фибронектина из плазмы крови человека, разделение коллагена на α -цепи и β -компоненты, электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия и контроль фракций при хроматографии проводили так, как описано в предыдущей статье [1]. Бромциановые пептиды коллагена ($\alpha 1\text{CB7}$, $\alpha 1\text{CB8}$ и $\alpha 1\text{CB6}$) выделяли по методике [4].

Получение домена Д45. 300 мг лиофилизованного фибронектина из плазмы крови человека суспендировали в 60 мл 0,025 М трис-НСl-буфера, содержащего 1 мМ EDTA и 50 мМ NaCl (pH 7,0), добавляли 1 мг α -химотрипсина и инкубировали при перемешивании в течение 1 ч при 37° С. Затем к смеси добавляли 3 мг ингибитора трипсина из соевых бобов и 1 мМ фенилметансульфонилфторид, через 10 мин осадок отделяли на центрифуге K-24 (Janetzki, ГДР) 20 мин при 10 000 об/мин и супернатант наносили на колонку (V 60 мл) с желатин-сефарозой [1], уравновешенной 0,025 М трис-НСl в 0,5 М EDTA и 50 мМ NaCl, pH 7,4. Колонку промывали указанным буфером до отсутствия поглощения при 280 нм в элюатах и затем тем же буфером, содержащим 4 М мочевиной, элюировали домен Д45. Соответствующие фракции диализовали против 0,1 М уксусной кислоты и полученный раствор (~60 мл) лиофилизовали. Выход домена Д45 составил 14,2 мг.

Адсорбент Д45-сефароза (I) получали стандартным методом [5] (2,5 г BrCN на 10 мл упакованного геля). Иммобилизацию домена Д45 проводили при использовании 20 мг белка на 10 мл активированного геля.

Дигидразид DL-яблочной кислоты. К раствору 100 мл (0,758 моль) диметилового эфира DL-яблочной кислоты в 100 мл метанола постепенно при перемешивании и охлаждении (4° С) добавляли 500 мл (10,3 моль)

гидразингидрата. Реакционную смесь перемешивали 16 ч при 20° С, выпавший осадок отделяли, промывали холодным метанолом и сушили над P₂O₅ в вакууме. Выход дигидразида DL-яблочной кислоты 110,6 г (90%). Т. пл. 176–177° С.

Адсорбент «Д45-гидразидомалоил-сефароза» (II). К раствору 10 мг белка Д45 в 15 мл 0,2 М Na-фосфатного буфера (рН 6,0) добавляли 1,5 мг NaIO₄ и перемешивали 1 ч при 20° С в темноте. Затем раствор наносили на колонку (1,8×50 см) с сефадексом G-25, уравновешенным тем же буфером. Скорость потока 10 мл/ч. Фракцию, выходящую со свободным объемом (22 мл) и содержащую окисленный домен Д45, перемешивали 3 ч при 20° С с 10 мл гидразидомалоил-сефарозы (III), полученной иммобилизацией дигидразида DL-яблочной кислоты на бромцианактивированной сефарозе CL-4В и предварительно промытой 100 мл указанного выше буфера. Затем к суспензии добавляли 10 мг цианоборгидрида натрия и перемешивали 16 ч при 4° С. Гель отделяли, промывали Na-фосфатным буфером (рН 6,0) и инкубировали 2 ч при 20° С с 10 мл 1 М этаноламина в присутствии 10 мг цианоборгидрида натрия при рН 6,0. Гель промывали 200 мл 0,2 М Na-фосфатного буфера, содержащего 0,5 М NaCl (рН 6,0), и затем поочередно по 3 раза 50 мл 0,1 М Na-ацетатного буфера с 1 М NaCl (рН 4,0) и 50 мл 0,1 М Na-боратного буфера с 1 М NaCl (рН 9,0). Затем адсорбент (II) промывали водой и хранили в водной суспензии в присутствии 0,02% NaN₃.

Аффинная хроматография α1СВ7-пептида коллагена на адсорбентах (I) и (II) с иммобилизованным доменом Д45 (определение емкости адсорбентов). Раствор 5 мг α1СВ7-пептида в 5 мл УБР многократно пропускали через колонку (0,8×4 см) с 1 мл адсорбента (I) или (II), уравновешенную УБР, в течение 1 ч со скоростью 20 мл/ч. После этого колонку промывали УБР (15 мл) до отсутствия поглощения при 230 нм в элюате. α1СВ7-пептид вымывали 6 мл УБР, содержащего 4 М мочевины. Объем фракций 0,5 мл. Фракции, содержащие α1СВ7-пептид, диализовали против 0,1 М уксусной кислоты и лиофилизировали. Выход α1СВ7-пептида 0,29 мг для адсорбента (I) и 0,4 мг для адсорбента (II).

Аналогично проводили аффинную хроматографию α1СВ6- и α1СВ8-пептидов α1-цепи коллагена на адсорбентах (I) и (II) (см. рис. 2).

Аффинная хроматография смеси бромциановых пептидов α1-цепи коллагена на адсорбенте (I). Лиофилизованную смесь бромциановых пептидов α1-цепи коллагена (30 мг), полученную как описано [1], растворяли в 10 мл УБР и раствор многократно пропускали через колонку с 10 мл адсорбента (I) со скоростью 30 мл/ч в течение 1 ч. Циркуляцию раствора и последующую хроматографию проводили при 37° С. Колонку промывали 100 мл УБР, 50 мл УБР с 1 М мочевиной, а α1СВ7-пептид элюировали 25 мл УБР, содержащего 4 М мочевины. Выход α1СВ7-пептида 2,94 мг. Он был идентичен по электрофоретической подвижности α1СВ7-пептиду, полученному ионообменной хроматографией из смеси бромциановых пептидов α1-цепи [4].

Аналогично проводили аффинную хроматографию смеси бромциановых пептидов α1-цепи коллагена на адсорбенте (II).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Митина В. Х., Французова Н. А., Кляццкий Б. А., Краснополяский Ю. М., Сенников Г. А., Швец В. И., Орехович В. Н. // Биоорг. химия. 1989. Т. 15. № 11. С. 1468–1473.
2. McCroskery P. A., Richards J. F., Harris E. D., Jr. // Biochem. J. 1975. V. 152. № 1. P. 131–142.
3. Mosher D. F. // Progress in Hemostasis and Thrombosis. V. 5/Ed. Spaet T. H. N. Y.: Grune & Stratton, 1980. P. 111–151.
4. Click E. M., Bornstein P. // Biochemistry. 1970. V. 9. № 24. P. 4699–4706.
5. Engvall E., Bell M. L., Ruoslahti E. // Collagen Rel. Res. 1981. V. 1. № 6. P. 505–516.
6. Pande H., Shively J. E. // Arch. Biochem. and Biophys. 1982. V. 213. № 1. P. 258–265.
7. Forasteri H., Ingham K. // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. № 19. P. 10546–10550.

8. Venyaminov S. Y., Metsis M. L., Chernousov M. A., Koteliansky V. E. // *Eur. J. Biochem.* 1983. V. 135. № 3. P. 485-489.
9. Кляшницкий Б. А., Межова И. В., Швец В. И. // *Усп. биол. химии.* 1986. Т. 27. С. 187-220.
10. Olden K., Hahn L.-H. E., Yamada K. M. // *Cell Adhesion and Mobility*/Eds Curtis A. S. G., Pitts J. D. Cambridge Univ. Press, 1980. P. 357-387.
11. Chua M.-M., Fan S.-T., Karush F. // *Biochim. et biophys. acta.* 1984. V. 800. № 3. P. 291-300.
12. Shannessy D. J., Hoffman W. L. // *Biotechnol. and Appl. Biochem.* 1987. V. 9. № 6. P. 488-496.

Поступила в редакцию
19.IV.1989

**ISOLATION AND PURIFICATION OF BIOPOLYMERS
BY THE BIOSPECIFIC AFFINITY CHROMATOGRAPHY.
X. A BIOSPECIFIC APPROACH TO COLLAGEN PEPTIDES
CONTAINING THE FIBRONECTIN BINDING SITE**

MITINA V. Kh., FRANTSUZOVA N. A., KLYASHCHITSKY B. A.

*Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical
Sciences of the USSR, Moscow*

A biospecific method for one-stage isolation of collagen peptides containing the fibronectin binding site is proposed. $\alpha 1CB7$ -peptide of the type I collagen cyanogen bromide cleavage was isolated by means of affinity chromatography on adsorbents containing an immobilized gelatin-binding domain (45 kDa) of fibronectin. The method allows one to obtain, in a short time, highly purified preparation of $\alpha 1CB7$ -peptide necessary for biochemical studies.