

Н. В. Мотрук, соискатель

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
кафедра биохимии,

ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: (0482) 68-78-75, ntv1@ukr.net

ВЫДЕЛЕНИЕ МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ-2 ИЗ НЕТРАНСФОРМИРОВАННОЙ ТКАНИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЖЕНЩИН

Матриксная металлопротеиназа-2 (ММП-2) – цинксодержащая, кальций-зависимая внеклеточная протеиназа (КФ 3.4.24.24), которая участвует в реорганизации внеклеточного матрикса. Проведена разработка метода выделения ММП-2 из нетрансформированной ткани молочной железы женщин. Максимальная удельная активность ММП-2 установлена во фракции, 60 % насыщения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в присутствии ионов Zn^{2+} и Ca^{2+} . Наибольшая очистка ММП-2 (в 231,77 раза) и максимальный процент выхода ММП-2 (349,41 %) получены во фракции 60 % насыщения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в присутствии ионов Ca^{2+} .

Ключевые слова: матриксная металлопротеиназа-2; молочная железа; фракционирование; сульфат аммония.

Матриксная металлопротеиназа-2 (ММП-2) – цинксодержащая, кальций-зависимая внеклеточная протеиназа (КФ 3.4.24.24) [6, 17]. Этот фермент играет важную роль в нормальных физиологических процессах: эмбриональном развитии, морфогенезе, репродукции и ремоделировании ткани, и в патологических процессах: при артритах, злокачественном росте и сердечно-сосудистых заболеваниях [11]. Нормальное протекание процессов реорганизации внеклеточного матрикса обеспечивается равновесием между активностью ММП-2 межклеточного матрикса и ее тканевого ингибитора ТИМП-2 [16].

Очищенные ферментные препараты ММП-2 были получены с помощью гель-фильтрации из полиморфонуклеарных лейкоцитов человека [20], афинной хроматографии на коллаген-сефарозе из остеобластов кролика [19], на ДЕАЕ-целлюлозе из культуры ревматоидных фибробластов синовиальной жидкости человека [22]. ММП-2 из фибробластов десны человека была выделена с помощью комбинированного метода, который включал ионообменную хроматографию, гель-фильтрацию и аффинную хроматографию [15]. Однако нами не было обнаружено данных о выделении ММП-2 из ткани молочной железы женщин.

В связи с этим, цель данного исследования состояла в разработке метода выделения ММП -2 из нетрансформированной ткани молочной железы.

Материалы и методы

Материалом для выделения ММП-2 служила резецированная в ходе оперативного вмешательства ткань молочной железы женщины, которая прилегала к новообразованию, и в которой по данным гистоморфологических исследований было подтверждено отсутствие атипических клеток. Гистологический материал был верифицирован по требованиям ВООЗ [2] сертифицированной и лицензированной патоморфологической лабораторией Одесского областного онкологического диспансера с определением морфологического состояния и степени дифференцирования трансформированных клеток опухолевой ткани согласно договору о совместных исследованиях.

Взятие анатомического материала для исследований проводили с соблюдением этических и правовых норм Хельсинской декларации 1964 г., Конвенции о защите прав и достоинств человека в связи с использованием достижений биологии и медицины (Конвенция о правах человека и биомедицине 1996 г.), закона Украины «О трансплантации органов и других анатомических материалов человеку» 1999 г. За основу была взята методика Sawston and Tyler (1979), модифицированная для получения ММП-2 из ткани молочной железы [12]. Модификация заключалась в поэтапном осаждении с помощью 20 %, 40 %, 60 % и 80 % растворов $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и использовании 2,0 мМ (конечная концентрация) растворов хлоридов Zn^{2+} и Ca^{2+} для активации и стабилизации активности фермента.

Образцы тканей замораживали при $-18\text{ }^\circ\text{C}$ непосредственно после оперативного вмешательства. Ткань молочной железы гомогенизировали в дистиллированной воде (в соотношении 1 : 10) с последующим центрифугированием при 9000 g в мин при $+4\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 45 минут. Супернатанты диализировали на мембранах при $+4\text{ }^\circ\text{C}$ против 20-кратного объема дистиллированной воды без добавления солей, а также с добавлением 2,0 мМ растворов ZnCl_2 , CaCl_2 или смеси этих солей. Диализаты подвергали поэтапному фракционированию $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ при постоянном встряхивании с последующим центрифугированием при 9000 g в течение 45 минут [9]. Для удаления избытка $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ фракции подвергали повторному диализу в тех же условиях. Активность ММП-2 определяли по гидролизу 0,001 % раствора желатины по методу Вовчук [7] и содержание белка по методу Лоури [18]. Активность ММП-2 выражали в микромолях глицина на мг белка за 1 минуту инкубации при $37\text{ }^\circ\text{C}$. Статистическую обработку результатов проводили с помощью t – критерия Стьюдента [3].

Результаты исследований

Было установлено, что диализ белковых фракций в условиях отсутствия ионов Zn^{2+} или Ca^{2+} приводил к существенной очистке белкового раствора и увеличению активности ММП-2 в 5,0 раз (табл.), что совпадает с данными литературы [1, 5].

Таблиця
Активність ММП-2, процент вихода, коефіцієнт очищення на етапах виділення ($M \pm m, n = 3$)

Етап виділення	Удельная активность фермента				Процент вихода				Коефіцієнт очищення			
	без іонів	с іонами Zn^{2+}	с іонами Ca^{2+}	с іонами Zn^{2+} і Ca^{2+}	без іонів	с іонами Zn^{2+}	с іонами Ca^{2+}	с іонами Zn^{2+} і Ca^{2+}	без іонів	с іонами Zn^{2+}	с іонами Ca^{2+}	с іонами Zn^{2+} і Ca^{2+}
Исходный белковый раствор	0,0008 ± 0,0001	0,001 ± 0,0001	0,001 ± 0,0001	0,001 ± 0,0001	-	-	-	-	-	-	-	-
Раствор после диализа	0,004 ± 0,0003	0,031 ± 0,002	0,011 ± 0,001	0,012 ± 0,001	100,00	100,00	100,00	100,00	1,00	1,00	1,00	1,00
20 % насыщение $(NH_4)_2SO_4$	0,067 ± 0,005	0,080 ± 0,007	0,107 ± 0,090	0,026 ± 0,002	102,13	15,72	61,66	13,09	16,65	2,56	10,05	2,14
40 % насыщение $(NH_4)_2SO_4$	0,023 ± 0,003	0,110 ± 0,010	0,015 ± 0,002	0,005 ± 0,001	156,21	96,93	39,29	11,57	5,67	3,52	1,43	0,42
60 % насыщение $(NH_4)_2SO_4$	0,325 ± 0,022	0,650 ± 0,063	2,472 ± 0,219	2,277 ± 0,190	121,87	31,24	349,41	284,28	80,83	20,72	231,77	188,57
80 % насыщение $(NH_4)_2SO_4$	0,247 ± 0,021	0,988 ± 0,094	0,494 ± 0,036	0,741 ± 0,070	51,67	26,50	38,99	51,67	61,33	31,47	46,32	61,38

Примечание: удельная активность ММП-2 указана в микромолях глицина/мг белка за 1 мин инкубации при 37°C; процент вихода и коефіцієнт очищення указаны по отношению к фракции после диализа, принятой за 100 % и 1,0 соответственно

По отношению к раствору белка после диализа во фракции, полученной при 20 %-ом насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ удельная активность (УА) ММП-2 и коэффициент (К) очистки фермента увеличились в 16,75 раз, а процент выхода фермента практически не изменился (табл.). Во фракции, полученной при 40 %-ом насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, по сравнению с раствором после диализа, УА и К очистки ММП-2 увеличились в среднем в 5,7 раза, а процент выхода фермента увеличился в 1,56 раза (табл.). После диализа фракции, полученной при 60 %-ом насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, был получен фермент, очищенный в 80,8 раз. При этом насыщении сульфатом аммония УА ММП-2 увеличилась более чем в 20 раз по сравнению с белковым раствором после диализа и выход фермента составил 121,87 %. УА и К очистки фермента, фракционированного при 80 %-ом насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ увеличились более чем в 60 раз, однако процент выхода фермента снизился в 1,94 раза по сравнению с белковым раствором после диализа.

Известно, что матриксная металлопротеиназа-2 относится к Zn^{2+} -содержащим протеиназам [19], активность и пространственное строение которых стабилизируется в присутствии ионов Ca^{2+} [13,14]. Было установлено, что проведение диализа в присутствии 2,0 мМ раствора ZnCl_2 как первичного белкового раствора, так и фракций, полученных при осаждении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в присутствии 2,0 мМ раствора ZnCl_2 , приводило к увеличению УА и процента выхода ММП-2.

УА ММП-2 исходного белкового раствора, полученного в присутствии ионов Zn^{2+} , по отношению к показателям этого же раствора белка без ионов Zn^{2+} , была выше в 1,25 раза. Диализ исходного белкового раствора, который проводили в присутствии ионов Zn^{2+} (по сравнению с результатами диализа, проведенного без ионов Zn^{2+}), приводил к увеличению УА ММП-2 в 7,75 раз. Диализ в присутствии ионов Zn^{2+} приводил к увеличению более чем в 31 раз УА фермента по сравнению с первичным белковым раствором.

После диализа в присутствии ионов Zn^{2+} (по отношению к раствору белка после диализа), во фракции полученной при 20 %-ом насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ активность ММП-2 увеличилась в 2,58 раза, процент выхода фермента составил 15,72 %, а К очистки увеличился в 2,56 раза. По сравнению с белковым раствором после диализа, который был проведен в присутствии ионов Zn^{2+} , УА фракции, полученной при 40 %-ом насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ увеличилась в 3,55 раза. В этой фракции был установлен наибольший выход фермента – 96,93 %. При диализе в присутствии ионов Zn^{2+} во фракции, полученной при 60 %-ом насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ был получен очищенный в 20,72 раза фермент, процент выхода которого составил 31,24 % (относительно показателей белкового раствора после диализа). Во фракции 80 %-го насыщения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, полученной после диализа в присутствии ионов Zn^{2+} по отношению к показателям белкового раствора после диализа УА ММП-2 возросла более чем в 30 раз, К очистки увеличился в 31,47 раза, а процент выхода фермента составил 26,50 %.

Диализ, в присутствии ионов Ca^{2+} (табл.), приводил к увеличению УА ММП-2 в 2,75 раза, по сравнению с результатами диализа без добавления этого иона.

Во фракции, полученной при 20 %-ом насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, после диализа в присутствии ионов Ca^{2+} (по отношению к раствору белка после диализа) УА ММП-2 увеличилась в 9,72 раза, а выход фермента составил 61,66 %.

Во фракции 40 %-го насыщения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, полученной после диализа в присутствии ионов Ca^{2+} , по сравнению с раствором белка после диализа, К очистки ММП-2 увеличился в 1,43 раза, а выход фермента составил 39,29 %. При 60 %-ом насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ при диализе в присутствии ионов Ca^{2+} был получен фермент, очищенный в 231,77 раза с выходом 349,41 % (относительно показателей белкового раствора после диализа). При диализе фракции, полученной при 80 %-ом насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ УА ММП-2 увеличилась в 44,9 раз, выход фермента составил 38,99 %, а К очистки увеличился в 46,32 раза.

При исследовании совместного влияния ионов Zn^{2+} и Ca^{2+} было установлено, что ферментативная активность исходного раствора белка после диализа в присутствии смеси ионов Zn^{2+} и Ca^{2+} не отличалась от показателей активности исходного раствора белка, полученной без добавления этих ионов по отдельности. Диализ, проводимый в присутствии и ионов Zn^{2+} и ионов Ca^{2+} , по сравнению с исходным белковым раствором, приводил к увеличению УА ММП-2 в 12,0 раз.

При диализе в присутствии ионов Zn^{2+} и Ca^{2+} во фракции, полученной при 20 %-ом насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (по отношению к раствору белка после диализа) УА ММП-2 увеличилась в 2,17 раза, а выход фермента составил 13,09 %. По сравнению с раствором белка после диализа УА ММП-2 фракции, полученной при 40 %-ом насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, диализ которой проводили в присутствии смеси солей, снизилась в 2,40 раза, а выход фермента составил 11,57 %. При 60 %-ом насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ во фракции, полученной после диализа в присутствии ионов Zn^{2+} и Ca^{2+} , был получен фермент, очищенный в 188,57 раз, выход которого составил 284,28 % относительно показателей белкового раствора после диализа. Во фракции, полученной при 80 %-ом насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, диализ которой проводили в присутствии ионов Zn^{2+} и Ca^{2+} , выход ММП-2 составил 51,67 %, а УА увеличилась в 61,75 раза (по отношению к показателям белкового раствора после диализа).

Анализ результатов

Таким образом, при фракционировании $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и последующем диализе без добавления ионов Zn^{2+} и Ca^{2+} были установлены наибольшие: процент выхода фермента при 40 %-ом насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 156,21 %, а К очистки (в 80,83 раза) – при 60 %-ом насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ по сравнению с исходным белковым раствором.

Проведение диализа фракционированного фермента в присутствии 2,0 мМ растворов $ZnCl_2$, $CaCl_2$ или смеси этих солей приводило к существенному увеличению УА, процента выхода и очистки ММП-2. Наибольшее увеличение УА ММП-2 (в 31,0 раза) был установлен при диализе против 2,0 мМ раствора Zn^{2+} . Это свидетельствует, вероятнее всего, о потере ионов Zn^{2+} в процессе выделения фермента при диализе без ионов цинка (за 12 часов при +4 °С). Добавление ионов Ca^{2+} во время диализа также способствовало повышению активности ММП-2, но эффект по сравнению с ионами Zn^{2+} был в 2,82 раза меньшим.

При 20 %-ом насыщении $(NH_4)_2SO_4$ в условиях диализа против ионов наибольший эффект установлен в случае использования ионов Ca^{2+} – повышение УА в 9,73 раз, по отношению к показателям активности фермента после диализа. Во фракции 40 %-го насыщения $(NH_4)_2SO_4$ в условиях диализа в присутствии ионов наибольший эффект установлен в случае использования ионов Zn^{2+} – повышение активности в 3,55 раза. При 60 %-ном насыщении сульфатом аммония в условиях диализа против ионов металлов наибольший эффект был установлен в случае использования ионов Ca^{2+} и смеси ионов (повышение активности фермента в 224,72 и 189,75 раз, соответственно). Это свидетельствует, во-первых, о том, что при длительном выделении (более 10 часов) ионы Ca^{2+} являются необходимыми для стабилизации структуры фермента. Во-вторых, значительное увеличение УА ММП-2, установленное при 60 %-ом насыщении $(NH_4)_2SO_4$ свидетельствует о том, что фермент является гидрофильным и максимально осаждается при этом насыщении. Во фракции 80 %-го насыщения $(NH_4)_2SO_4$ при диализе против ионов металлов значительный эффект установлен в случае использования ионов Zn^{2+} – однако этот эффект был существенно ниже, чем при фракционировании фермента при 60 %-ом насыщении $(NH_4)_2SO_4$.

При диализе в присутствии только ионов Zn^{2+} наибольший процент выхода фермента (96,93 %) был установлен при 40 %-ом насыщении $(NH_4)_2SO_4$, а наибольший К очистки (в 31,47 раз) – при 80 %-ом насыщении $(NH_4)_2SO_4$. В присутствии только ионов Ca^{2+} наибольший выход фермента – 349,41 % и К очистки – в 231,77 раза были установлены во фракции, полученной при 60 %-ом насыщении $(NH_4)_2SO_4$. При добавлении смеси ионов Zn^{2+} и Ca^{2+} наибольший выход фермента – 284,28 % и К очистки – (в 188,57 раза) установлены также во фракции, полученной при 60 %-ом насыщении $(NH_4)_2SO_4$.

Значительное увеличение процента выхода фермента свидетельствует о том, что во время поэтапного фракционирования сульфатом аммония происходит либо отделение свободной формы ММП-2 из комплекса с ее эндогенным тканевым ингибитором ТИМП-2, либо происходит активация проформы фермента. С другой стороны, значительное увеличение К очистки, (то есть УА фермента) во время фракционирования в присутствии ионов Zn^{2+} и Ca^{2+} , свидетельствует о необходимости добавления этих ионов для активации и стабилизации структуры фермента.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что поэтапное осаждение сульфатом аммония приводит к фракционированию ММП-2 нетрансформированной ткани молочной железы преимущественно при 60 %–80 %-ом насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (85,0 % всей активности). Наличие протеиназной активности во фракциях, полученных при других насыщениях $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, что составляет всего 15,0 % суммарной активности фермента, свидетельствует, вероятнее всего, о наличии множественных форм ММП-2 [4, 8].

Выводы

1. Максимальная удельная активность ММП-2 установлена во фракции, полученной при 60 %-ом насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в присутствии ионов Ca^{2+} .

2. Наибольший коэффициент очистки ММП-2 установлен в белковой фракции, полученной при диализе в присутствии ионов Zn^{2+} и Ca^{2+} при 60 %-ом насыщении сульфатом аммония.

3. Максимальный процент выхода ММП-2 установлен во фракции 60 %-го насыщения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в присутствии ионов Ca^{2+} .

Список использованной литературы

1. Виноградова Р. П. Молекулярные механизмы действия ферментов / Р. П. Виноградова. – Киев: Вища школа, 1978. – 280 с.
2. *Всемирная Организация Здравоохранения* / Материалы ежегодных отчетов. – Санкт-Петербург, 1981. – 286 с.
3. *Гланц С.* Медико-биологическая статистика: Пер. с англ. / С. Гланц. – М.: Практика, 1998. – 495 с.
4. *Диксон М.* Ферменты / М. Диксон, Э. Уэбб. – М.: Мир, 1966. – 816 с.
5. *Кочетов Г. А.* Практическое руководство по энзимологии / Г. А. Кочетов – М.: Высшая школа, 1971. – 352 с.
6. *Луценко С. В.* Молекулярные механизмы опухолевого ангиогенеза / С. В. Луценко, С. М. Кисилев, С. Е. Северин. – Биохимия. – 2003. – Т. 68. – № 3. – С. 349 – 365.
7. *Патент на корисну модель № 46633 Україна, МПК (2009), C12N 9/50, C12N 9/64.* Спосіб визначення активності матричної металопротеїнази-2 / І. Л. Вовчук; заявник та патентодержатель Вовчук І. Л. – № у 2009 08087; заявл. 31.07.2009; опубл. 25.12.2009, Бюл. № 24.
8. *Плакунов В. К.* Основы энзимологии / В. К. Плакунов. – М.: Логос, 2001. – 128 с.
9. *Практическая химия белка:* Пер с англ. [Под ред. А. Дабре]. – М.: Мир, 1989. – 623 с.
10. *Скоупс Р.* Методы очистки белков: Пер с англ. / Р. Скоупс. – М.: Мир, 1985. – 358 с.
11. *Хасигов З. П.* Металопротеиназы матрикса нормальных тканей человека / З. П. Хасигов, О. В. Подобед, С. А. Кцоева [и др.] // Биохимия. – 2001. – Т. 66. – № 2. – С. 167–179.
12. *Cawston T. E.* Purification of pig synovial collagenase to high specific activity / T. E. Cawston, J. A. Tyler // *Biochem J.* – 1979. – V. 183, № 3. – P. 647–656.
13. *Das S.* Identification, purification and partial characterization of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 in bovine pulmonary artery smooth muscle / S. Das, M. Mandal, A. Mandal [et al] // *Mol. Cell. Biochem.* – 2003. – V. 254, № 1–2. – P. 275–287.
14. *Díaz N.* Molecular dynamics simulations of matrix metalloproteinase 2: role of the structural metal ions / N. Díaz, D. Suarez // *Biochemistry.* – 2007. – V. 46, № 31. – P. 8943–8952.
15. *Hipps D. S.* Purification and characterization of human 72-kDa gelatinase (type IV collagenase). Use of immunolocalisation to demonstrate the non-coordinate regulation of the 72-kDa and 95-kDa gelatinases by human fibroblasts / D. S. Hipps, R. M. Hembry, A. J. Docherty [et al] // *Chem. Hoppe. Seyler.* – 1991. – V. 372, № 4. – P. 287–296.

16. *Kandalam V.* TIMP-2 deficiency accelerates adverse post-myocardial infarction remodeling because of enhanced MT1 -MMP activity despite lack of MMP2 activation / V. Kandalam, R. Basu, T. Abraham [et al] // *Circ. Res.* – 2010. – Vol. 106, № 4. – P. 796–808.
17. *Kanomata N.* Expression and localization of mRNAs for matrix metalloproteinases and their inhibitors in mixed bronchioloalveolar carcinomas with invasive components / N. Kanomata // *Modern Pathology.* – 2005. – № 18. – P. 828–837.
18. *Lowry O.H.* Protein measurement with the Folin-Phenol reagent / O. H. Lowry, N. I. Rosenbrough, A. Z. Fan, R. J. Randol // *J. Biol. Chem.* – 1951. – V. 194, № 1. – P. 265–271.
19. *Murphy G.* Purification and characterization of a bone metalloproteinase that degrades gelatin and types IV and V collagen / G. Murphy, C. G. McAlpine, C. T. Poll, J. J. Reynolds // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1985. – V. 831, № 1. – P. 49–58.
20. *Murphy G.* Partial purification of collagenase and gelatinase from human polymorphonuclear leucocytes. Analysis of their actions on soluble and insoluble collagens / G. Murphy, J. J. Reynolds, U. Bretz, M. Baggiolini // *Biochem J.* – 1982. – V. 203, № 1. – P. 209–221.
21. *Nagase H.* Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs / H. Nagase, R. Visse, G. Murphy // *Cardiovasc. Res.* – 2006. – V. 69, № 3. – P. 562–573.
22. *Okada Y.* Matrix metalloproteinase 2 from human rheumatoid synovial fibroblasts. Purification and activation of the precursor and enzymic properties / Y. Okada, T. Morodomi, J. J. Enghild [et al] // *Eur. J. Biochem.* – 1990. – V. 194, № 3. – P. 721–730.

Статья поступила в редакцию 26.01.2016

Н. В. Мотрук

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, кафедра біохімії,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: (0482) 68-78-75, ntv1@ukr.net

ВИДІЛЕННЯ МАТРИКСНОЇ МЕТАЛОПРОТЕЇНАЗИ-2 З НЕТРАНСФОРМОВАНОЇ ТКАНИНИ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ ЖІНОК

Резюме

Матриксна металопротеїназа-2 (ММП-2) – кальцій-залежна та цинквісна позаклітинна протеїназа (КФ 3.4.24.24), яка бере активну участь у реорганізації позаклітинного матриксу при багатьох фізіологічних і патологічних процесах. Мета дослідження – розробка методу виділення ММП-2 з нетрансформованої тканини молочної залози жінок.

Для отримання ММП-2 з тканини молочної залози була використана модифікована методика Sawston and Tyler (1979). Модифікація полягала в поетапному осадженні $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ і використанні іонів Zn^{2+} і Ca^{2+} для активації та стабілізації активності ферменту.

Відбір анатомічного матеріалу для досліджень проводили з дотриманням етичних і правових норм. Гомогенати досліджуваних тканин діалізували проти дистильованої води без солей, а також з 2,0 мМ розчинами ZnCl_2 , CaCl_2 або їх суміші. Діалізати піддавали поетапному фракціонуванню (осадження при 20, 40, 60 та 80 %-му насиченні) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ з подальшим центрифугуванням при 9000g впродовж 45 хв. Для видалення надлишку $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ фракції піддавали повторному діалізу у тих же умовах. Активність ММП-2 визначали за гідролізом 0,001 % розчину желатини, вміст білку – методом Лоурі.

Максимальна питома активність ММП-2 встановлена у фракції, отриманої при 60 %-му насиченні $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ у присутності суміші іонів Zn^{2+} і Ca^{2+} . Найбільша очистка ММП-2 (у 231,77 рази) і максимальний відсоток виходу ферменту (349,41 %) отримані у фракції 60 %-го насичення $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ у присутності

іонів Ca^{2+} . Значне збільшення коефіцієнта очистки під час фракціонування $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ у присутності іонів Zn^{2+} і Ca^{2+} свідчить про необхідність додавання цих іонів для активації і стабілізації структури ферменту.

Результати проведених досліджень свідчать про те, що поетапне осадження сульфатом амонію призводить до фракціонування ММП-2 нетрансформованої тканини молочної залози жінок переважно при 60 % – 80 %-му насиченні $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (85,0 % усієї активності). Наявність протеїназної активності у фракціях, отриманих при інших насиченнях $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, що складає 15,0 % сумарної активності ферменту, свідчить, найімовірніше, про наявність множинних форм ММП-2.

Ключові слова: матриксна металопротеїназа-2; молочна залоза; фракціонування; сульфат амонія.

N. V. Motruk

Odesa National Mechnykov University, Department of Biochemistry
2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine, e-mail: ntv1@ukr.net

ISOLATION OF MATRIX METALLOPROTEINASE-2 FROM NONMALIGNANT BREAST TISSUES IN WOMEN

Abstract

Matrix metalloproteinase – 2 (MMP-2) is zinc- and calcium-dependent extracellular proteinase which takes part in reorganizations of extracellular matrix in many physiological and pathological processes. The research aim is to develop the method of MMP-2 isolation from the nonmalignant tissue mammary gland in women.

To obtain MMP-2 from breast tissues a modified method of Cawston and Tyler (1979) was used. Modification consisted in gradual precipitation of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and application of Zn^{2+} and Ca^{2+} ions for activation and stabilization of enzyme activity. Sampling of anatomical materials for research was conducted with compliance of ethical and legal standards. The homogenates of the resected tissues were dialyzed against the distilled water without salts and also with 2.0 mM solutions of ZnCl_2 , CaCl_2 or mixtures of these salts. Dialysates were subjected to step-by-step fractionating (besieging at 20, 40, 60 and 80 % saturation) of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ with subsequent centrifugation at 9000g for 45 minutes. Resulting fractions were subjected to the repeated dialysis under the same conditions to remove the excess of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Activity of MMP-2 was detected by hydrolysis of 0.001 % gelatin solution, the protein content – by the Loury method.

The maximal specific activity of MMP-2 was determined in the fraction obtained at 60 % saturation by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in presence of mixture of Zn^{2+} and Ca^{2+} ions. The highest purification of MMP-2 (231.77 times) and maximal percentage of enzyme yield (349.41 %) were obtained in fraction with 60 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation in presence of Ca^{2+} ions. The substantial increase of purification coefficient during fractionating by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in presence Zn^{2+} and Ca^{2+} ions testifies to the necessity of adding these ions for activation and stabilization of the enzyme structure.

The results of the research indicate that the step-by-step sedimentation by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ leads to the fractionation of MMP-2 of untransformed female breast tissues at 60-80 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation (85.0 % of the entire activity). Presence of proteinase activity in the fractions obtained at other $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturations, that is only 15.0 %

of the total activity of enzyme, testifies, probably, to presence of multiple forms of MMP-2.

Key words: matrix metalloproteinase-2; breast; fractionation; ammonium sulfate.

References:

1. Vinogradova RP (1978) Molecular mechanisms action of enzymes [Molekulyarnye mekhanizmy deystviya fermentov], Kiev: Vyshcha shkola, 280 p.
2. The World Health Organization. Proceedings of the annual reports [Vsemirnaya Organizaciya Zdravokhraneniya. Materialy ezhegodnykh otchetov], Sankt-Peterburg, 1981, 286 p.
3. Glantz S (1998) Biomedical Statistics [Mediko – biologicheskaya statistika], Moskva: Praktika, 495 p.
4. Dixon M, Webb E (1966) Enzymes [Fermenty], Moskva: Mir, 816 p.
5. Kochetov GA (1971) Practical handbook of enzymology [Prakticheskoye rukovodstvo po enzimologii], Moskva: Vysshaya shkola, 352 p.
6. Lutsenko SV, Kiselev SM, Severin SE (2003) “Molecular mechanisms of tumor angiogenesis” [“Molekulyarnye mekhanizmy angiogeneza opukholi”], Biochemistry J, № 68, 3, pp 349 – 365.
7. Vovchuk I L Sposib vyznachennya aktyvnosti matryksnoi metaloproteinazy-2 [The method of determination of activity matrix metalloproteinase-2]. Patent № u 2009 08087, Ukraine, 2009.
8. Plakunov VK (2001) Foundation of enzymology [Osnovy enzimologii], Moskva: Logos, 128 p.
9. Practical chemistry of albumen: Per. s angl. In editor Darbre A [Prakticheskaya khimiya belka] Moskva: Mir, 1989, 623 p.
10. Scoups R (1985) Protein purification methods [Metody ochistki belkov], Moskva: Mir, 358 p.
11. Khasigov Z P, Podobed OV, Ktsoeva SA (2001) “Matrix metalloproteinase of normal human tissues” [“Metalloproteinazy matriksa normalnykh tkaney cheloveka”], Biochemistry J, № 66, 2, pp 167–179.
12. Cawston TE, Tyler JA (1979) “Purification of pig synovial collagenase to high specific activity”, Biochem J, № 183, 3, pp 647 – 656.
13. Das S, Mandal M, Mandal A (2003) “Identification, purification and partial characterization of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 in bovine pulmonary artery smooth muscle”, Mol Cell Biochem, № 254, 1-2, pp 275 – 287.
14. Diaz N, Suarez D (2007) “Molecular dynamics simulations of matrix metalloproteinase 2: role of the structural metal ions”, Biochemistry J, № 46, 31, pp 8943 – 8952.
15. Hipps DS, Hembry RM, Docherty AJ (1991) “Purification and characterization of human 72-kDa gelatinase (type IV collagenase). Use of immunolocalisation to demonstrate the non-coordinate regulation of the 72-kDa and 95-kDa gelatinases by human fibroblasts”, Chem Hoppe Seyler, № 372, 4, pp 287 – 296.
16. Kandalam V, Basu R, Abraham T (2010) “TIMP-2 deficiency accelerates adverse post-myocardial infarction remodeling because of enhanced MT1 -MMP activity despite lack of MMP2 activation”, Circ. Res, № 106, 4, pp 796 – 808.
17. Kanomata N (2005) “Expression and localization of mRNAs for matrix metalloproteinases and their inhibitors in mixed bronchioloalveolar carcinomas with invasive components”, Modern. Pathology, № 18, pp 828–837.
18. Lowry O H, Rosenbrough N I, Fan A Z, Randol R J (1951) “Protein measurement with the Folin-Phenol reagent”, J Biol Chem, № 194, 1, pp 265 – 271.
19. Murphy G, McAlpine CG, Poll CT, Reynolds JJ (1985) “Purification and characterization of a bone metalloproteinase that degrades gelatin and types IV and V collagen”, Biochim Biophys Acta, № 831, 1, pp 49 – 58.
20. Murphy G, Reynolds JJ, Bretz U, Baggiolini M (1982) “Partial purification of collagenase and gelatinase from human polymorphonuclear leucocytes. Analysis of their actions on soluble and insoluble collagens”, Biochem J, № 203, 1, pp 209 – 221.
21. Nagase H, Visse R, Murphy G (2006) “Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs”, Cardiovasc. Res, № 69, 3, pp 562 – 573.
22. Okada Y, Morodomi T, Enghild JJ (1990) “Matrix metalloproteinase 2 from human rheumatoid synovial fibroblasts. Purification and activation of the precursor and enzymic properties”, Eur J Biochem, № 194, 3, pp 721–730.