

УДК 547.962

ИДЕНТИФИКАЦИЯ КАТИОННЫХ БЕЛКОВ ЛЕЙКОЦИТОВ, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИХ С ЦЕРУЛОПЛАЗМИНОМ*

© 2007 г. А.В. Соколов**, М.О. Пулина, К.В. Агеева,
О.Л. Рунова, Е.Т. Захарова, В.Б. Васильев

ГУ НИИ Экспериментальной Медицины РАМН,
197376 Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12;
факс: (812)234-9489, электронная почта: biochem@nnt.ru

Поступила в редакцию 16.04.07

Произведен поиск белков лейкоцитов, взаимодействующих с церулоплазмином (ЦП) – медьсодержащим гликопротеином плазмы крови человека. При Ds-Na-ПААГ-электрофорезе белков элюата с ЦП-сефарозы при аффинной хроматографии экстракта лейкоцитов были выявлены 78, 57, 40, 30, 16 и 12 кДа-зоны. Среди них с помощью Вестерн-блоттинга выявлены два белка: миелопероксидаза (57, 40 и 12 кДа) и лактоферрин (78 кДа). Кроме того, N-концевой аминокислотный анализ 30 кДа-зоны показал наличие последовательности $^{11}\text{I}-^{21}\text{I}/\text{V}-^{3}\text{G}-^{4}\text{G}-^{5}\text{R}/\text{H}$, которая не исключает наличие нейтрофильной эластазы, катепсина G, протеиназы 3 и азуроцидина (CAP 37) – семейства серпроцидинов. Масс-спектрометрия фрагментов трипсинолиза показала наличие: эозинофильного катионного белка (16 кДа), катепсина G, азуроцидина, нейтрофильной эластазы, протеиназы 3. Таким образом, нами впервые выявлено пять новых белков лейкоцитов, взаимодействующих с ЦП: эозинофильный катионный белок, катепсин G, нейтрофильная эластаза, протеиназа 3 и азуроцидин.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: церулоплазмин, эозинофильный катионный белок, катепсин G, эластаза, протеиназа 3, азуроцидин, белок-белковые взаимодействия.

Церулоплазмин (ЦП) – медьсодержащий гликопротеин с $M \sim 132$ кДа. Ген ЦП экспрессируется гепатоцитами, что приводит к секреции ЦП в кровь, однако в клетках нервной системы и клетках Сертоли в результате альтернативного сплайсинга ЦП синтезируется в виде глицеролфосфоинозидзаякоренной мембраносвязанной изоформы [1]. ЦП – универсальный антиоксидант, проявляющий несколько видов оксидантной активности: посредством четырехэлектронного переноса на кислород с образованием воды ЦП окисляет Fe^{2+} [2], Cu^+ [3], O_2^- [4], NO и GSH [5]. ЦП проявляет также глутатионзависимую пероксидазную активность [6], катализирует окисление биогенных (норадреналин, серотонин) и синтетических (*n*-фенилендиамин, *o*-данизидин) аминов [7]. С начала 90-х годов были

открыты взаимодействия ЦП с другими белками, что расширило представления о его возможных функциях: регуляция свертывания крови при взаимодействии с протеином С [8], участие в метаболизме железа при взаимодействии с ферритином [9], ферропортином 1 [10] и лактоферрином (ЛФ) [11], участие в регуляции нервных и воспалительных процессов при взаимодействии с нейропептидом RASAP 38 [12] и фактором, ингибирующим миграцию макрофагов [13], ингибирование прооксидантных свойств при взаимодействии с миелопероксидазой (МПО) [14]. Таким образом, на основании признаков различной локализации, множества ферментативных активностей и белок-белковых комплексов ЦП можно справедливо отнести к группе «moonlighting» белков [15].

В наших предыдущих исследованиях при хроматографии на ЦП-сефарозе белков экзокринных секретов: грудного молока и слезной жидкости мы наблюдали специфическую сорбцию катионного ЛФ на отрицательно заряженном ЦП. Однако, другие катионные белки, например лизоцим не сорбировались на ЦП [16].

В опытах по сорбции белков сыворотки крови на иммобилизованной МПО происходила избирательная сорбция

Принятые сокращения: ЛФ – лактоферрин; МПО – миелопероксидаза; ЦП – церулоплазмин; CAP 37 – азуроцидин; RASAP 38 – гипоталамический активирующий аденилатциклазу пептид.

* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, VM 07-107, 03.06.2007.

** Адресат для корреспонденции и запросов оттисков.

рательная сорбция анионного ЦП на катионном белке, однако другие белки сыворотки, например альбумин и преальбумин со сходным значением pI не препятствовали этому взаимодействию [14].

Учитывая то, что в составе некоторых открытых ранее белков взаимодействующих с ЦП: ЛФ, МПО, протамин [17] и нейропептид RASAP 38, преобладают основные аминокислоты, мы произвели поиск партнеров ЦП среди белков лейкоцитов, для которых выполнение защитных функций непосредственно связано с катионными свойствами. В данной работе выполнен поиск новых белков лейкоцитов, взаимодействующих с ЦП.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали следующие реактивы: окрашенные маркеры молекулярной массы («BioRad», США); бромциан («Fluka», Швейцария); триэтиламин ((C_2H_5)₃N), ЭДТА («Merck», Германия); сефароза 4В, DEAE-сефадекс А-50, QAE-сефадекс А-50 («Pharmacia», Швеция); полный и неполный адьюванты Фрейнда, азид натрия, альбумин сыворотки человека, глицерин, Кумасси R-250, меркаптоэтанол, персульфат аммония, сывороточный альбумин человека, Tris («Serva», Германия); антитела к IgG кролика меченные пероксидазой хрена, глицин, Ds-Na, протамин кеты, реактив Фолина, фенолметилсульфонилфторид (PMSF), 4-хлор-1-нафтол («Sigma», США); акриламид, аргинин, N,N'-метиленисакриламид, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин («Лаборатория МЕДИГЕН», Россия); гепарин («СПОФА», Польша).

Препарат мономерного и стабильного ЦП был выделен из плазмы крови с помощью аффинной хроматографии на протамин-сефарозе [17].

ЛФ выделяли из грудного молока с помощью ионообменной хроматографии на CM-сефарозе и гель-фильтрации на сефадекс G-100 Superfine [18].

Экстракцию белков из лейкоцитов, любезно предоставленных профессором В.Н. Кокряковым (Отдел общей патологии и патофизиологии НИИЭМ РАМН, Санкт-Петербург), проводили без применения катионных детергентов. Осадок лейкоцитов (40 г) суспендировали в 100 мл 0,05 М натрий-ацетатного буфера, pH 4,7 и подвергали замораживанию и оттаиванию с последующей трехкратной обработкой ультразвуком (44 кГц) по 30 с с перерывами 1 мин при охлаждении во льду. Полученный экстракт лейкоцитов центрифугировали в течение 30 мин при 15 000 g (4°). Супернатант использовали для выделения МПО человека и белков взаимодействующих с ЦП.

МПО человека выделяли из экстракта лейкоцитов по описанной нами ранее схеме с помощью хроматографии на гепарин-сефарозе, фенол-сефарозе и гель-фильтрации на сефадексе G-150 [19].

ЦП, гепарин и протамин (10, 20 и 4 мг на 1 мл влажного геля соответственно) иммобилизовали на BrCN-активированной сефарозе 4В [17]. Антитела к ЛФ и МПО получали трехкратной иммунизацией кроликов соответствующими белками [20]. Содержание белка определяли по методу Фолина–Лоури [21] с тремя параллельными пробами с использованием альбумина сыворотки человека в качестве стандарта.

Аффинная хроматография белков из экстракта лейкоцитов на ЦП-сефарозе. 10 мл экстракта наносили на ЦП-сефарозу (4 мл) и отмывали несвязавшиеся белки 0,15 М NaCl, pH 7,4, 1,9 мМ Na₂HPO₄/8,1 мМ NaH₂PO₄ до A₂₈₀ < 0,002 в элюате. Затем проводили элюцию 0,5 М NaCl с 10 мМ Tris-HCl, pH 7,4 и анализировали полученную фракцию. Определение молекулярной массы белков производили методом Ds-Na-ПААГ-электрофореза [22]. После Ds-Na-ПААГ-электрофореза для выявления полос, соответствующих ЛФ и МПО, проводили Вестерн-блоттинг [23]. Идентификацию белков осуществляли методом масс-спектрометрии фрагментов трипсинолиза. Для приготовления образцов белки разделяли Ds-Na-ПААГ-электрофорезом и вырезали из геля участки, содержавшие белковые зоны. Анализ проводили на масс-спектрографе Bruker. Полученные пептидные фингерпринты белков анализировали при помощи программы MASCOT <http://www.matrixscience.com>. N-концевой аминокислотный анализ по Эдману произведен в Институте биорганической химии им. академиков М.В. Шемякина и Ю.А. Овчинникова (г. Москва). Белок после Ds-Na-ПААГ-электрофореза был перенесен на мембрану Immobilon P [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При аффинной хроматографии экстракта лейкоцитов (1500 ± 50 мг общего белка) на колонке с ЦП-сефарозой (около 40 мг иммобилизованного ЦП) после элюции 0,15 М NaCl, pH 7,4, 1,9 мМ Na₂HPO₄/8,1 мМ NaH₂PO₄ балластных белков в элюате 0,5 М NaCl (10 мМ Tris-HCl, pH 7,4) содержалось 0,20 ± 5 мг белка. Повторная хроматография балластных белков на ЦП-сефарозе не привела к сорбции каких-либо белков. При анализе с помощью Ds-Na-ПААГ-электрофореза белков элюата 0,5 М NaCl с ЦП-сефарозы при аффинной хроматографии экстракта

Таблица 1. Пептидный фингерпринт белков, взаимодействующих с ЦП. Результаты поиска с помощью программы MAS-COT <http://www.matrixscience.com> (нумерация а.о. приводится в соответствии с первичной структурой полноразмерных белков)

Начало–конец	Ожидаемое значение <i>M</i> , Да	Вычисленное значение <i>M</i> , Да	$ \Delta $, Да	Пептид
1	2	3	4	5
Легкая цепь миелопероксидазы (12 кДа, найдено 60% последовательности)				
1–8	918,39	918,41	0,02	VTCPEQDK
34–54	2411,13	2411,15	0,02	WLPAEYEDGFSLPYGWTPGVK
73–84	1445,66	1445,68	0,02	FPTDQLTPDQER
85–108	2817,35	2817,33	0,02	SLMFMQWGQLLDHDLDFTRPEAAR
Эозинофильный катионный белок (16 кДа, найдено 44% последовательности)				
2–8	900,49	900,49	0	PPQFTR
9–23	1776,99	1776,94	0,05	AQWFAIQHISLNPPR
30–35	749,34	749,38	0,04	AINNYR
40–46	891,44	891,46	0,02	NQNTFLR
99–106	989,54	989,52	0,02	YADRPGR
119–134	1807,99	1807,95	0,04	DSRPYPVVPVHLDTTI
123–134	1352,79	1352,73	0,06	YPVVPVHLDTTI
Катепсин G (27 кДа, найдено 42% последовательности)				
6–28	2658,26	2658,31	0,05	ESRPHSRPYMAYLQIQSPAGQSR
63–72	1196,64	1196,59	0,05	ENTQQHITAR
74–83	1281,71	1281,67	0,04	AIRHPQYNQR
77–83	941,47	941,45	0,02	HPQYNQR
84–96	1543,88	1543,84	0,04	TIQNDIMLLQLSR
101–111	1248,75	1248,71	0,04	NRNVNPVALPR
103–111	978,58	978,56	0,02	NVNPVALPR
155–162	953,49	953,46	0,03	IFGSYDPR
155–163	1109,60	1109,56	0,04	IFGSYDPRR
200–210	1174,64	1174,60	0,04	SSGVPPEVFTR
211–219	1103,65	1103,61	0,04	VSSFLPWIR
Азуридин (27 кДа, найдено 49% последовательности)				
1–16	1653,04	1653,03	0,01	RLTVLALLAGLLASSR
17–30	1368,75	1368,77	0,02	AGSSPLLDIVGGRK
35–47	1504,83	1504,78	0,05	QFPFLASIQNQGR
48–85	4022,71	4022,97	0,26	HFCGGALIHARFVMTAASCFSQNPVSTVVLGAYDLR
147–156	1090,58	1090,50	0,08	CQVAGWGSQR
161–166	774,44	774,45	0,01	LSRFPR
223–229	838,45	838,40	0,05	GPDDFFTR
230–249	2107,08	2107,09	0,01	VALFRDWIDGVLNNPGPGA
Нейтрофильная эластаза (29 кДа, найдено 33% последовательности)				
36–50	1807,96	1807,97	0,01	ARPHAWPFMVSLQLR
82–92	1220,69	1220,71	0,02	VVLGAHNLSRR
97–103	846,46	846,47	0,01	QVFAVQR
145–163	2014,03	2014,04	0,01	LGNGVQCLAMGWLLGRNR
184–191	890,46	890,46	0	SNVCTLVR
184–193	1103,65	1103,59	0,06	SNVCTLVRGR
194–220	2703,29	2703,33	0,04	QAGVCFGDSGSPLVCNGLIHGIAFVR

Окончание табл. 1

1	2	3	4	5
Протеиназа 3 (27 кДа, найдено 40% последовательности)				
1–21	2364,15	2364,16	0,01	IVGGHEAQPHSRPMASLQMR
48–64	1899,06	1899,08	0,02	DIPQRLVNVVLGAHNVR
53–64	1289,76	1289,76	0	LVNVVLGAHNVR
133–166	3803,93	3803,94	0,01	VGAHDPPAQVLQELNVTVVTFPCRPHNICTFVPR
201–208	1041,50	1041,53	0,03	LFPDFFTTR
209–217	1133,62	1133,62	0	VALYVDWIR
Фрагмент тяжелой цепи миелопероксидазы (40 кДа, найдено 21% последовательности)				
164–169	778,37	778,40	0,03	LYQEAR
197–202	811,41	811,42	0,01	YLPTYR
212–221	1151,62	1151,61	0,01	IANVFTNAFR
252–258	911,47	911,47	0	VFFASWR
259–270	1279,76	1279,75	0,01	VVLEGGIDPILR
282–291	1184,62	1184,61	0,01	QNQIAVDEIR
301–312	1339,73	1339,73	0	IGLDLPALNMQR
315–325	1284,62	1284,60	0,02	DHGLPGYNAWR
400–423	2920,36	2920,44	0,08	FWWENEGVFSMQQRQALAQISLPR
414–423	1095,64	1095,64	0	QALAQISLPR
Тяжелая цепь миелопероксидазы (57 кДа, найдено 22% последовательности)				
18–24	807,40	807,42	0,02	IPPNDPR
164–169	778,38	778,40	0,02	LYQEAR
196–202	939,54	939,52	0,02	KYLPTYR
197–202	811,42	811,42	0	YLPTYR
212–221	1151,66	1151,61	0,05	IANVFTNAFR
238–246	1130,57	1130,52	0,05	YQPMENPR
252–258	911,49	911,47	0,02	VFFASWR
259–270	1279,79	1279,75	0,04	VVLEGGIDPILR
282–291	1184,67	1184,61	0,06	QNQIAVDEIR
301–312	1339,77	1339,73	0,04	IGLDLPALNMQR
313–325	1527,80	1527,73	0,07	SRDHGLPGYNAWR
315–325	1284,66	1284,60	0,06	DHGLPGYNAWR
414–423	1095,68	1095,64	0,04	QALAQISLPR

лейкоцитов были выявлены зоны, соответствующие молекулярным массам 78, 57, 40, 30, 16 и 12 кДа (рисунок, а). Вестерн-блоттинг с антителами к ЛФ и к МПО показал принадлежность 78 кДа-зоны к ЛФ и 57, 40 и 12 кДа-зоны к МПО (рисунок, б, в). Наличие в препаратах МПО наряду с 57 и 12 кДа-цепями протомеров, фрагмента деградации с молекулярной массой около 40 кДа было описано ранее [24]. Следует также отметить, что среди балластных белков экстракта, элюированных с ЦП-сефарозы PBS, не было обнаружено иммунореактивности ЛФ и МПО.

Деградация N-концевых аминокислотных остатков по Эдману белков 30 кДа-зоны выяви-

ла последовательность: ¹I-²I/V-³G-⁴G-⁵R/H, что не исключает наличие катепсина G (¹I-I-G-G-R⁵), нейтрофильной эластазы (¹I-V-G-G-R⁵), протеиназы 3 (¹I-V-G-G-H⁵) и азуроцидина (¹I-V-G-G-R⁵), которые на основе гомологии первичной структуры и проявляемой ими антимикробной активности объединены в единую структурно-функциональную группу белков, получивших название серпроцидины (*serine protease cidins*) [25].

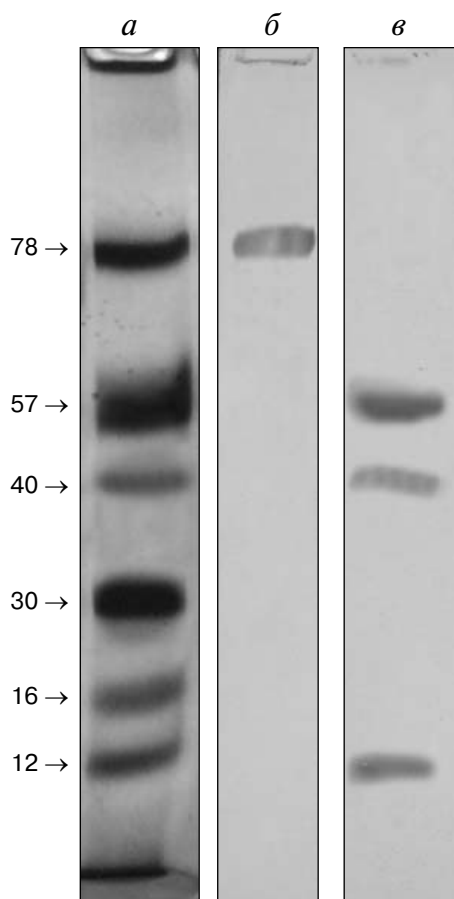
Для более точного выявления белков взаимодействующих с ЦП был проведен анализ методом масс-спектрометрии фрагментов трипсинолиза (табл. 1). Анализ показал наличие эози-

нофильного катионного белка (16 кДа, 7 пептидов), катепсина G (25 кДа, 11 пептидов), азуроцидина (27 кДа, 8 пептидов), нейтрофильной эластазы (29 кДа, 7 пептидов), протеиназы 3 (27 кДа, 6 пептидов), миелопероксидазы (57, 40 и 12 кДа, 13, 10 и 4 пептида). Тот факт, что взаимодействие ЦП (pI 4,7) с выявленными белками лейкоцитов разобшлось 0,5 М NaCl и, вероятно, носит ионный характер, подтверждается щелочными значениями их pI (табл. 2).

Среди обнаруженных нами катионных белков лейкоцитов не оказалось таких специфических катионных белков лейкоцитов, как лизоцим, дефенсины и бактерицидный увеличивающий проницаемость белок, а также других кати-

Таблица 2. Свойства белков лейкоцитов, взаимодействующих с ЦП (<http://www.matrixscience.com>)

Белок	<i>M</i> , кДа	pI
Миелопероксидаза (МПО, К.Ф. 1.11.1.7)	150	9,2
Лактоферрин (ЛФ)	78	8,4–9,0
Катепсин G (К.Ф. 3.4.21.20)	27	11,3
Нейтрофильная эластаза (К.Ф. 3.4.21.37)	29	9,7
Азуроцидин (САР 37)	27	9,8
Протеиназа 3 (Миелобластин, К.Ф. 3.4.21.76)	27	7,8
Эозинофильный катионный белок (Рибонуклеаза 3, К.Ф. 3.1.27.)	16	10,7



Анализ белков элюата 0,5 М NaCl (по 20 мкг белка на пробу) с ЦП-сефарозы при аффинной хроматографии экстракта лейкоцитов. Панель *a* – электрофореграмма после Ds-Na-ПААГ-электрофореза (окраска кумасси R-250), панели *b* и *v* – Вестерн-блоттинг с антителами против ЛФ (1 : 10 000, панель *b*) и МПО (1 : 10 000, панель *v*), разведение вторичных антител меченых пероксидазой хрена – 1 : 10 000 (окраска 4-хлор-1-нафтолом и H₂O₂). Стрелками указаны значения *M*, кДа

онных белков, потенциально способных взаимодействовать с ЦП, что указывает на селективность паттернов в катионных белках для взаимодействия с ЦП.

Взаимодействия ЦП с белками лейкоцитов, МПО и ЛФ, были открыты ранее, соответственно, в 1997 г. группой Сегелмарка [14] и в 2000 г. в нашей лаборатории [18]. Однако в 1999 г. в опытах по выявлению способности ЦП взаимодействовать с МПО, протеиназой 3 и ЛФ, связанными с поверхностью лунок планшета для иммуноферментного анализа, иммунореактивность ЦП выявлена только при сорбции в лунках МПО [26]. Эти противоречия с результатами, полученными нами, можно объяснить разобщением взаимодействия ЦП с протеиназой 3 и ЛФ антителами против ЦП при последующем определении связавшегося ЦП. Нельзя исключить также экранирование участка для взаимодействия с ЦП при связывании ЛФ и протеиназы 3 с поверхностью планшета для ИФА, что, вероятно, не критично для димерной молекулы МПО.

Можно предположить, что взаимодействие катионных антимикробных белков с анионным ЦП будет препятствовать их антимикробным свойствам, а также цитотоксическому эффекту в случае их локализации в кровотоке. Тот факт, что с ЦП взаимодействуют четыре члена семейства серпроцидинов, свидетельствует в пользу консервативности данных белок-белковых комплексов. Выявленные нами белки являются аутоантигенами, провоцирующими развитие системных васкулитов [28], возможно их взаимо-

действие с ЦП является частью механизма участвующего в патогенезе этих заболеваний.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (гранты 06-04-48602, 05-04-

48765). Выражаем благодарность В.Н. Кокрякову и М.М. Шавловскому (ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН, г. Санкт-Петербург) за предоставленные материалы, ценные советы и полезное обсуждение результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Vassiliev, V., Harris, Z.L., and Zatta, P. (2005) *Brain. Res. Rev.*, **49**, 633–640.
- Osaki, S. (1966) *J. Biol. Chem.*, **241**, 5053–5059.
- Stoj, C., and Kosman, D.J. (2003) *FEBS Letters*, **554**, 422–426.
- Bannister, J.V., Bannister, W.H., Hill, A.O., Mahood, J.F., Willson, R.L., and Wolfenden, B.S. (1980) *FEBS Letters*, **188**, 127–129.
- Inoue, K., Akaike, T., Miyamoto, Y., Okamoto, T., Sawa, T., Otagiri, M., Suzuki, S., Yoshimura, T., and Maeda, H. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 27069–27075.
- Kim, I.G., and Park, S.Y. (1998) *FEBS Letters*, **437**, 293–296.
- Young, S.N., and Curzon, G. (1972) *Biochem. J.*, **129**, 273–283.
- Walker, F.J., and Fay, P.J. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 1834–1836.
- Van Eden, M.E., and Aust, S.D. (2000) *Arch. Biochem. Biophys.*, **381**, 119–126.
- Jeong, S.Y., and David, S. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 27144–27148.
- Соколов А.В., Пулина М.О., Захарова Е.Т., Шавловский М.М., Васильев В.Б. (2005) *Биохимия.*, **70**, 1231–1236.
- Tams, J.W., Johnsen, A.H., and Fahrenkrug, J. (1999) *Biochem. J.*, **341**, 271–276.
- Meyer-Siegler, K.L., Iczkowski, K.A., and Vera, P.L. (2006) *J. Urol.*, **175**, 1523–1528.
- Segelmark, M., Persson, B., Hellmark, T., and Wieslander, J. (1997) *Clin. Exp. Immunol.*, **108**, 167–174.
- Bielli, P., and Calabrese, L. (2002) *Cell Mol. Life Sci.*, **59**, 1413–1427.
- Pulina, M.O., Zakharova, E.T., Sokolov, A.V., Shavlovski, M.M., Bass, M.G., Solovyov, K.V., Kokryakov, V.N., and Vasilyev, V.B. (2002) *Biochem. Cell. Biol.*, **80**, 35–39.
- Соколов А.В., Захарова Е.Т., Шавловский М.М., Васильев В.Б. (2005) *Биоорг. химия.*, **31**, 269–279.
- Zakharova, E.T., Shavlovski, M.M., Bass, M.G., Gridasova, A.A., Pulina, M.O., de Filippis, V., Beltramini, M., di Muro, P., Salvato, B., Fontana, A., Vasilyev, V.B., and Gaitskhoki, V.S. (2002) *Arch. Biochem. Biophys.*, **374**, 222–228.
- Соколов А.В., Пулина М.О., Агеева К.В., Айрапетов М.И., Волгин Г.Н., Берлов М.Н., Марков А.Г., Яблонский П.К., Колодкин Н.И., Захарова Е.Т., Васильев В.Б. (2007) *Биохимия.*, **72**, 506–514.
- Захарова Е.Т., Васильев В.Б., Горбунова В.Б., Шавловский М.М. (1983) *Биохимия.*, **48**, 1709–1720.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265–275.
- Laemmli, U.K. (1970) *Nature (London)*, **227**, 680–686.
- Anderson, N.L., Nance, S.L., Pearson, T.W., and Anderson, N.G. (1982) *Electrophoresis*, **3**, 135–142.
- Olsen, R.L., and Little, C. (1983) *Biochem. J.*, **209**, 781–787.
- Gabay, J.E., and Almeida, R.P. (1993) *Curr. Opin. Immunol.*, **5**, 97–102.
- Griffin, S.V., Chapman, P.T., Lianos, E.A., and Lockwood, C.M. (1999) *Kidney International.*, **55**, 917–925.
- Соколов А.В., Пулина М.О., Захарова Е.Т., Сусорова А.С., Рунова О.Л., Колодкин Н.И., Васильев В.Б. (2006) *Биохимия.*, **71**, 208–215.
- Malenica, B., Rudolf, M., and Kozmar, A. (2004) *Acta Dermatovenerol. Croat.*, **12**, 294–313.

IDENTIFICATION OF LEUKOCYTE CATIONIC PROTEINS THAT INTERACT WITH CERULOPLASMIN

A. V. Sokolov, M. O. Pulina, K. V. Ageeva, O. L. Runova, E. T. Zakharova, V. B. Vasilyev

Institute for Experimental Medicine of the Russian Academy of Medical Sciences, ul. Acad. Pavlova, 12, Saint-Petersburg 197376, Russia; fax: (812)234-9489, E-mail: biochem@nm.ru

Received April 16, 2007

Proteins from leukocytes having ability to interact with the copper-containing glycoprotein of human plasma ceruloplasmin (Cp) were searched for. Extract from leukocytes was subjected to affinity chromatography on Cp-Sepharose, after which proteins were eluted from the resin with 0.5 M NaCl in Tris-HCl, pH 7.4. SDS-PAGE of the eluate revealed protein bands with Mr 78, 57, 40, 30, 16 and 12 kD. Among these, Western blotting detected myeloperoxidase (57, 40, and 12 kD) and lactoferrin (78 kD). Besides, the 30-kD component had a sequence ¹I-²I/V-³G-⁴G-⁵R/H at the N-terminus that is likely to indicate the presence of neutrophilic elastase, cathepsin G, proteinase 3 and azurocidin (CAP 37) – all from the family of serprocidines. Mass spectrometry of tryptic fragments indicated the presence of the 16-kD eosinophilic cationic protein (seven peptides), 25-kD cathepsin G (eleven peptides), 27-kD azurocidin (eight peptides), 29-kD neutrophilic elastase (seven peptides) and 27-kD proteinase 3 (six peptides). Myeloperoxidase was represented by 57-, 40-, and 12-kD fragments (thirteen, ten, and four peptides, respectively). Thus, interaction with Cp of five cationic proteins, i.e., of eosinophilic cationic protein, cathepsin G, neutrophilic elastase, proteinase 3, and azurocidin, is reported for the first time.

Key words: ceruloplasmin, eosinophilic cationic protein, cathepsin G, neutrophilic elastase, proteinase 3, azurocidin, serprocidin, protein-protein interactions