

УДК 547.962

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА, ЛАКТОФЕРРИНА И МИЕЛОПЕРОКСИДАЗЫ МЕТОДОМ ФОТОННОЙ КОРРЕЛЯЦИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

© 2009 г. А.В. Соколов<sup>1\*</sup>, В.Н. Прозоровский<sup>2</sup>,  
В.Б. Васильев<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН,  
197376 Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12;  
факс: (812)234-9489, электронная почта: biochem@nm.ru

<sup>2</sup> ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН,  
119121 Москва, ул. Погодинская, 10; факс: (495)245-0857

Поступила в редакцию 15.10.08

После доработки 04.12.08

Определены диаметры белковых комплексов, образующихся при взаимодействии церулоплазмина (ЦП) с лактоферрином (ЛФ) и/или миелопероксидазой (МПО). Получена калибровочная зависимость диаметра белковых частиц (миоглобин, альбумин, ЛФ, ЦП, МПО, альдолаза, ферритин) от логарифма их молекулярной массы. Диаметр комплекса, образующегося при смешивании ЦП и ЛФ, составил 8,4 нм, что согласуется с радиусом вращения, полученным ранее при исследовании комплекса 1ЦП–1ЛФ методом рассеяния рентгеновских лучей под малыми углами. Диаметр комплекса, образующегося при взаимодействии ЦП и МПО, равен 9,8 нм, что соответствует стехиометрии 2ЦП–1МПО. Диаметр комплекса, образующегося при добавлении ЛФ к комплексу 2ЦП–1МПО, составляет 10,7 нм. Такой диаметр предполагает образование пентамера 2ЛФ–2ЦП–1МПО с молекулярной массой ~ 585 кДа.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** церулоплазмин, лактоферрин, миелопероксидаза, белок–белковые взаимодействия, фотонная корреляционная спектроскопия.

Метод фотонной корреляционной спектроскопии (ФКС) широко используется при оценке диаметра частиц в растворе, в частности при изучении комплексообразования белков [1]. Спектральные методы исследования стехиометрии белок–белковых взаимодействий имеют существенное преимущество по сравнению с хроматографией, поскольку исключают взаимодействие компонентов белковых комплексов с поверхностью хроматографического сорбента. Эффект взаимодействия комплекса с сорбентом может усиливаться при исследовании катионных или анионных белков, так как часть заряда этих белков экранируется при комплексообразовании и их комплекс в целом менее заряжен, чем составляющие его олигомеры. Этот эффект может проявиться в заниженных значениях молекулярной массы, получаемых методом гель-фильтрации

[2]. Объекты настоящего исследования – металлопротеиды церулоплазмин (ЦП), лактоферрин (ЛФ) и миелопероксидаза (МПО) – образуют стабильные комплексы при физиологических значениях рН и ионной силы раствора [3]. Белки лейкоцитов ЛФ и МПО имеют ярко выраженные катионные свойства (рI 8–9 и 9–10 соответственно). Их комплексообразование с анионной молекулой ЦП (рI 4,7) обусловлено электростатическими силами, поскольку комплексы ЦП с ЛФ и МПО диссоциируют при повышении ионной силы раствора или при понижении рН [3]. Взаимодействие с ЛФ приводит к увеличению ферроксидазной активности ЦП, что интересно в свете способности ЛФ высокоэффективно хелатировать продукт этой реакции – Fe<sup>3+</sup> [4]. Взаимодействие ЦП с МПО приводит к ингибированию пероксидазной и хлорирующей активностей МПО за счет непосредственного взаимодействия ЦП с активным центром МПО [5]. Исследование стехиометрии комплексов ЦП с ЛФ и МПО привело к неоднозначным результатам. Так, диск-электрофорез показал возможность

Принятые сокращения: ЛФ – лактоферрин, МПО – миелопероксидаза, ЦП – церулоплазмин, ФКС – фотонная корреляционная спектроскопия.

\* Адресат для корреспонденции.

образования комплексов ЦП–2ЛФ, ЦП–4ЛФ и комплексов с еще большим содержанием ЛФ [6].

В то же время методом гель-фильтрации показано наличие исключительно комплекса с эквимолярным соотношением – 1ЦП–1ЛФ [7]. Изучение взаимодействия ЦП и ЛФ методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей показало наличие комплекса 1ЦП–1ЛФ. Вместе с тем исследование влияния условий на комплексообразование выявило возможность образования многокомпонентных комплексов при использовании фосфатного буфера [8]. Разными методами нами было обнаружено, что ЦП и МПО взаимодействуют в эквимолярном соотношении (гель-фильтрация, диск-электрофорез) [3]. Однако изменения кинетических параметров ферментативных реакций при взаимодействии ЦП и МПО, а также спектральных свойств комплексов с различным соотношением ЦП и МПО свидетельствуют о том, что белки взаимодействуют в соотношении 2ЦП : 1МПО [5]. Так, для изменения максимума поглощения, обусловленного гемом МПО, необходимо и достаточно добавить 2 моля ЦП на 1 моль МПО. Такое соотношение компонентов логично, если учесть димерное строение МПО. Для активации окисления *p*-фенилендиамина, катализируемого ЦП, достаточно 1 моля МПО на 2 моля ЦП [5]. Исследование трехкомпонентного комплекса ЦП, ЛФ и МПО с помощью метода гель-фильтрации показало, что комплекс элюируется с колонки в объеме, соответствующем соотношению компонентов 1 : 1 : 1 [3]. Отсюда следовало предположение, что присоединение ЛФ к ЦП, взаимодействующему с МПО, препятствует присоединению ЦП к свободному протомеру МПО. Однако в опытах по аффинной хроматографии мы не обнаружили конкуренции между ЛФ и МПО за взаимодействие с ЦП [3]. Более того, ЛФ никогда не препятствовал проявлению ингибирующей активности ЦП в отношении МПО, что также исключает вытеснение одной из двух молекул ЦП из комплекса 2ЦП–МПО при присоединении ЛФ [9].

Цель работы – изучение стехиометрии комплексов ЦП, ЛФ и МПО с помощью ФКС.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали реактивы фирм «Bio-Rad» (США), «Merck» (Германия), «Pharmacia» (Швеция), «Serva» (Германия), «Sigma» (США), «Лаборатория МЕДИГЕН» (Россия).

Препарат мономерного стабильного при хранении ЦП с соотношением в препарате  $A_{610}/A_{280} > 0,045$  и присутствием  $>95\%$  нефраг-

ментированного белка получен методом аффинной хроматографии плазмы крови на протамин-сефарозе [10]. Препарат гомогенного ЛФ выделяли из грудного молока методами ионообменной хроматографии на СМ-сефарозе и гель-фильтрации на сефадексе G-100 Superfine [6]. Препарат МПО из лейкоцитов человека с соотношением в препарате  $A_{430}/A_{280} (R_z) = 0,85$ , что соответствует гомогенному белку, получен методами аффинной хроматографии на гепарин-сефарозе, гидрофобной хроматографии на фенил-сефарозе и гель-фильтрации [3].

Определение диаметра частиц в образце с использованием субмикронного анализатора диаметров частиц N5 Beckman Coulter основано на регистрации скорости диффузии частиц в жидкости и определяется уравнением Стокса–Эйнштейна:  $D = k_B T / 3\pi\eta d$ , где  $k_B = 1,38 \cdot 10^{-16}$  эрг/К – константа Больцмана;  $T$ , К – температура;  $\eta$ , П – вязкость растворителя;  $d$ , см – диаметр частицы, для которой определяется коэффициент диффузии  $D$ . Таким образом, определив  $D$ , можно получить информацию о диаметре частиц. В анализаторе N5 Beckman Coulter определение диаметра частиц основано на технологии ФКС с использованием программы Contin. В качестве источника света используется лазер с длиной волны 632,8 нм (область измерений 3–3000 нм). В качестве референтных белков, для которых были определены диаметры частиц, использовались белки с известными значениями молекулярной массы: миоглобин (19 кДа), альбумин (67 кДа), ЛФ (78 кДа), ЦП (132 кДа), МПО (145 кДа), альдолаза (158 кДа), ферритин (450 кДа). В экспериментах использовали воду и буфер TBS (150 мМ NaCl, 10 мМ Tris-HCl, pH 7,4), профильтрованные через фильтр с порами 0,22 мкм. Концентрацию белков в растворах варьировали эмпирически от 1 до 10 мг/мл, поскольку пределы интенсивности рассеянного света, контролируемой до проведения измерений, должны соответствовать инструкции прибора. Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Microsoft Excel 2007.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Были определены значения диаметра частиц для глобулярных белков (миоглобин, альбумин, ЛФ, ЦП, МПО, альдолаза, ферритин) с известными значениями молекулярной массы. Соответствие полученных значений данным кристаллографических исследований и малоуглового рассеяния рентгеновских лучей показано в табл. 1. Коэффициент корреляции Пирсона между экспериментальными и литературными

**Таблица 1.** Диаметры белковых частиц, определенные методом ФКС и в других работах

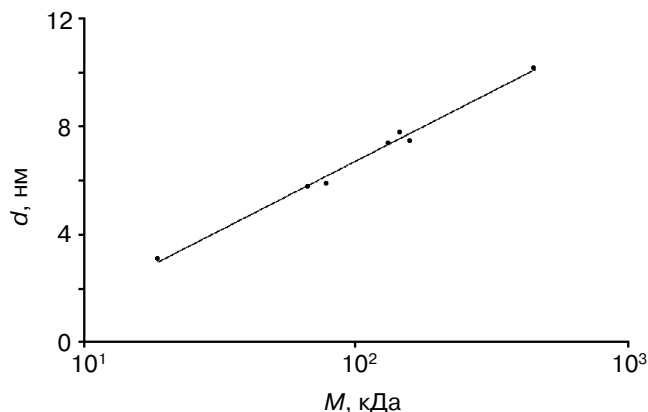
Белок	$d$ , нм (N5 Beckman Coulter)	$d$ , нм
Миоглобин	$3,1 \pm 0,2$	3,5 [11]
Альбумин	$5,8 \pm 1,8$	6,0 [11]
Лактоферрин	$5,9 \pm 1,0$	6,4 [8]
Церулоплазмин	$7,4 \pm 0,8$	7,2 [8]
Альдолаза	$7,5 \pm 2,3$	8,0 [11]
Миелопероксидаза	$7,8 \pm 1,2$	7,6 [12]
Ферритин	$10,2 \pm 3,3$	12,2 [11]

значениями диаметра белковых частиц ( $d$ ) составил 0,97. Калибровочная прямая зависимости диаметра частиц от логарифма молекулярной массы (рисунок) характеризовалась уравнением  $d = 5,191 \lg M - 3,66$  и коэффициентом детерминированности  $R^2 = 0,99$ .

Значения диаметра частиц и соответствующие значения  $M$  комплексов ЦП с ЛФ и МПО приведены в табл. 2. При определении диаметра частиц, образующихся при смешивании ЦП и ЛФ, значения с низким индексом полидисперсности были получены только для комплекса белков 1ЦП–1ЛФ. При добавлении к ЦП количеств ЛФ, превышающих эквимольное соотношение, значения диаметра частиц уменьшались, а стандартное квадратичное отклонение увеличивалось. Это свидетельствовало о накоплении в смеси частиц свободного ЛФ наряду с комплексом 1ЦП–1ЛФ, поскольку метод ФКС позволяет различить в смеси частицы, диаметр которых различается более чем в 2 раза. В противном случае происходит усреднение значений диаметра и увеличение его стандартного отклонения. Полученное значение диаметра комплекса ЦП–ЛФ (8,4 нм) близко к значению, полученному нами ранее методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей (8,6 нм) [6].

**Таблица 2.** Диаметры комплексов согласно N5 Beckman Coulter и измеренные и рассчитанные значения молекулярной массы при смешивании ЦП с ЛФ и МПО

Комплекс (число определений)	$d$ , нм	$M_n$ , кДа	$M_p$ , кДа
1ЦП–1ЛФ (15)	$8,4 \pm 1,2$	$209 \pm 30$	210
1МПО–2ЦП (12)	$9,8 \pm 1,4$	$386 \pm 55$	409
1МПО–2ЦП–2ЛФ (16)	$10,7 \pm 0,8$	$585 \pm 44$	565



Калибровочная зависимость молекулярной массы от диаметра белковых частиц

При добавлении ЦП к МПО значения диаметра частиц с низким индексом полидисперсности были получены для смеси с молярным соотношением 1МПО : 2ЦП. Значение молекулярной массы этого комплекса ( $386 \pm 55$  кДа) подтверждает правильность заключения о таком молярном соотношении. Добавление к комплексу 1МПО–2ЦП двухмолярного количества ЛФ привело к увеличению размера комплекса. Это подвергает сомнению возможность образования комплекса со стехиометрией 1МПО–1ЦП–1ЛФ, диаметр которого должен быть меньше, чем у комплекса 1МПО–2ЦП. Судя по значению молекулярной массы полученного комплекса ( $585 \pm 44$  кДа), скорее всего, произошло образование комплекса 1МПО–2ЦП–2ЛФ. Дальнейшее увеличение количества добавленного ЛФ выразилось в уменьшении диаметра частиц и увеличении стандартного квадратичного отклонения.

Суммируя полученные данные, можно прийти к выводу о наличии двух сайтов связывания для ЦП на димерной молекуле МПО, что весьма вероятно, если учесть необходимость взаимодействия ЦП как ингибитора с каждым из двух активных центров МПО. Этот вывод подтверждается исследованиями влияния МПО на активность ЦП в отношении *p*-фенилендиамина, в которых 1 моля МПО было достаточно для активации 2 молей ЦП [5]. При добавлении ЛФ к комплексу 1МПО–2ЦП каждая из молекул ЦП, взаимодействующих с мономерами МПО, оказывается способной присоединить ЛФ. В результате этого образуется пентамер следующего состава: ЛФ–ЦП–МПО–ЦП–ЛФ.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (грант 06-04-48602).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Berland, K.M., So, P.T., Chen, Y., Mantulin, W.W., and Gratton, E. (1996) *Biophys J.*, **71**, 410–420.
- Potschka, M. (1987) *Anal. Biochem.*, **162**, 47–64.
- 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.
- Соколов А.В., Пулина М.О., Захарова Е.Т., Шавловский М.М., Васильев В.Б. (2005) *Биохимия*, **70**, 1231–1236.
- Sokolov, A.V., Ageeva, K.V., Pulina, M.O., Cherkalina, O.S., Samygina, V.R., Vlasova, I.I., Panasenko, O.M., Zakharova, E.T., and Vasilyev, V.B. (2008) *Free Rad. Res.*, **42**, 989–998.
- 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., Захарова Е.Т., Сусорова А.С., Рунова О.Л., Колодкин Н.И., Васильев, В.Б. (2006) *Биохимия*, **71**, 208–215.
- Sabatucci, A., Vachette, P., Vasilyev, V.B., Beltramini, M., Sokolov, A., Pulina, M., Salvato, B., Angelucci, C.B., Maccarrone, M., Cozzani, I., and Dainese, E. (2007) *J. Mol. Biol.*, **371**, 1038–1046.
- Панасенко О.М., Чеканов А.В., Власова И.И., Соколов А.В., Агеева К.В., Пулина М.О., Черкалина О.С., Васильев В.Б. (2008) *Биофизика*, **53**, 573–581.
- Соколов А.В., Захарова Е.Т., Шавловский М.М., Васильев В.Б. (2005) *Биоорганическая химия*, **31**, 269–279.
- Остерман Л.А. (1985) *Хроматография белков и нуклеиновых кислот*, Наука, Москва.
- Blair-Johnson, M., Fiedler, T., and Fenna, R. (2001) *Biochemistry*, **4**, 13990–13997.

**STUDY OF INTERACTION OF CERULOPLASMIN,  
LACTOFERRIN, AND MYELOPEROXIDASE  
BY PHOTON CORRELATION SPECTROSCOPY**

**A. V. Sokolov<sup>1\*</sup>, V. N. Prozorovskii<sup>2</sup>, V. B. Vasilyev<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Institute for Experimental Medicine of the Russian Academy of Medical Sciences, ul. Pavlova 12, Saint-Petersburg 197376, Russia; fax: (812)234-9489, E-mail: biochem@nm.ru*

<sup>2</sup> *V. N. Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry of the Russian Academy of Medical Sciences, ul. Pogodinskaya 10, Moscow 119121, Russia; fax: (495)245-0857*

Received October 15, 2008

Revision received December 4, 2008

In this work diameters of protein complexes formed upon interaction of ceruloplasmin (CP) with lactoferrin (LF) and myeloperoxidase (MPO) were determined. Gage dependence of the diameter of protein particles (myoglobin, albumin, LF, CP, MPO, aldolase, ferritin) on their molecular mass logarithm was calculated. The diameter of a complex formed upon mixing Cp and LF was 8.4 nm, which is in line with the gyration radius obtained previously when 1 : 1 CP-LF complex was studied by small-angle X-ray scattering. The diameter of a complex formed upon interaction of Cp with MPO is 9.8 nm, corresponding to the stoichiometry 2CP:1MPO. The diameter of a complex formed when LF is added to the 2CP-1MPO complex is 10.7 nm. The latter is consistent with the notion of a pentameric structure 2LF-2CP-1MPO with molecular *M* about 585 kDa.

*Key words:* ceruloplasmin, lactoferrin, myeloperoxidase, protein-protein interaction, photon correlation spectroscopy