

УДК 547.962

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ КОМПЛЕКСОВ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА С МАТРИКСНЫМИ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗАМИ 2 И 12

© 2009 г. А.В. Соколов\*, М.О. Пулина, К.В. Агеева,  
О.С. Черкалина, Е.Т. Захарова, В.Б. Васильев

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

Поступила в редакцию 24.11.09  
После доработки 18.01.09

Выраженная чувствительность к действию протеиназ сказывается на антиоксидантных свойствах медьсодержащей оксидазы плазмы крови церулоплазмينا (ЦП). При гель-фильтрации из препаратов практически чистого ЦП (99,7%) выделены его комплексы. Масс-спектрометрия фрагментов трипсинолиза данных комплексов выявила, помимо ЦП, матриксные металлопротеиназы ММП-2 и ММП-12. Наличие протеиназ было подтверждено обнаружением желатиназной активности в электрофоретических зонах, соответствующих ММП-2 (72 и 67 кДа) и ММП-12 (22 кДа). Идентифицированные протеиназы содержат гепаринсвязывающие структурные мотивы, характерные для белков, образующих комплексы с ЦП (лактоферрина, миелопероксидазы и группы серпроцидинов), поэтому их примеси могут быть эффективно удалены при очистке ЦП с помощью предложенной нами ранее хроматографии на гепарин-сефарозе.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** церулоплазмин, матриксные металлопротеиназы, протеолиз.

Церулоплазмин (ЦП, КФ 1.16.3.1) – медьсодержащий гликопротеин молекулярной массой ~132 кДа. ЦП человека чрезвычайно легко деградирует под действием протеиназ. Эта особенность и тот факт, что белковая цепь ЦП включает в себя три гомологичные части, явились причиной того, что более 30 лет с момента открытия ЦП в 1944 г. в литературе обсуждался вопрос, состоит ли молекула ЦП из одной полипептидной цепи или из гомологичных субъединиц [1]. Выделение недеградированного и стабильного ЦП до сих пор остается весьма трудной задачей [2]. Многие авторы сообщают о присутствии в препаратах ЦП примеси протромбина [3] и неидентифицированной металлопротеиназы [4], а также рекомендуют использование ингибиторов протеиназ на всех стадиях выделения ЦП [5].

ЦП – универсальный антиоксидант, проявляющий несколько видов оксидазной активности. Осуществляя четырехэлектронный перенос на молекулу кислорода с образованием двух молекул воды, ЦП окисляет  $Fe^{2+}$  [6] и  $Cu^+$  [7] и тем препятствует образованию свободных радикалов по механизму Фентона и Хабера–Вайса.

Принятые сокращения: ЦП – церулоплазмин, ММП – матриксные металлопротеиназы.

\* Адресат для корреспонденции.

Также обнаружено наличие у ЦП активности супероксиддисмутазы [8]. Недеградированный ЦП проявляет глутатионзависимую пероксидазную активность [9]. Показано, что ЦП является NO-оксидазой плазмы крови, окисляющей NO до  $NO^+$ , который под действием воды превращается в нитрит. NO-оксидазная активность плазмы значительно уменьшается после иммунопреципитации ЦП, а концентрация нитрита у пациентов с наследственным дефектом гена ЦП снижена в 2 раза [10].

С начала 90-х годов были открыты взаимодействия ЦП с другими белками, что пополнило список его антиоксидантных функций. Недеградированный ЦП способствует окислению прооксидантного закисного железа и загрузке  $Fe^{3+}$  в ферритин [11]. Изоформа ЦП, фиксированная на мембранах астроцитов, взаимодействует с ферропортином 1 и способствует оттоку  $Fe^{2+}$  из клеток [12]. Взаимодействие ЦП с лактоферрином приводит к увеличению ферроксидазной активности ЦП [13]. ЦП образует комплекс с миелопероксидазой и при этом ингибирует ее хлорирующую активность, препятствуя прооксидантному действию этого фермента лейкоцитов [14]. Согласно нашим исследованиям, только недеградированный препарат ЦП обладает выраженным ингибирующим эффектом [15, 16].

Из приведенных данных ясно, что для осуществления многих антиоксидантных функций необходима целостность полипептидной цепи ЦП. Однако, несмотря на многолетние исследования, вопрос о природе протеиназ, деградирующих препараты ЦП, до сих пор не был разрешен.

Данная работа посвящена идентификации компонентов комплексов ЦП, выделенных нами из практически чистого препарата ЦП (99,7%) методом гель-фильтрации. В работе впервые показано существование комплексов ЦП с матричными металлопротеиназами ММП-2 и ММП-12.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали следующие реактивы: бромциан («Fluka», Швейцария); триэтиламин, ЭДТА («Merck», Германия); сефароза 4В, ДЕАЕ-сефадекс А-50, сефадекс G-200 *Superfine* («Pharmacia», Швеция); трипсин («Promega», США); азид натрия, альбумин сыворотки крови человека, глицерин, желатин, кумасси R-250, меркаптоэтанол, персульфат аммония, Triton X-100, Tris («Serva», Германия); 2,5-дигидроксibenзойная кислота, глицин, Ds-Na, маркеры молекулярной массы, протамин кеты, реактив Фолина, фенилметилсульфонилфторид (PMSF), 4-хлор-1-нафтол («Sigma», США); акриламид, аргинин, N,N'-метиленисакриламид, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин («Лаборатория МЕДИГЕН», Россия), PBS (phosphate buffer saline) — 0,15 М NaCl, pH 7,4, 1,9 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/8,1 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

Аргинин и протамин (10 и 4 мг на 1 мл влажного геля соответственно) иммобилизовали на ВtCN-активированной сефарозе 4В [17]. Содержание белка определяли по методу Фолина–Лоури [18] с тремя параллельными пробами с использованием альбумина сыворотки человека в качестве стандарта. Спектрофотометрические измерения проводили на приборе СФ 2000-02 («ОКБ Спектр», Россия).

**Препарат ЦП** был выделен из плазмы крови с помощью описанной ранее аффинной хроматографии на протамин-сефарозе [17]. В метод были внесены незначительные модификации: ЦП из 1 л цитратной плазмы крови подвергали предварительной очистке с помощью ионообменной хроматографии на ДЕАЕ-сефадексе А-50. Плазму разбавляли в 2 раза 50 мМ натрий-ацетатным буфером, содержащим 1 мкМ PMSF (pH 5,5), наносили на колонку, уравновешенную 50 мМ натрий-ацетатным буфером, и элюировали белок линейным градиентом 0 → 400 мМ NaCl на 50 мМ натрий-ацетатном буфере (pH 5,5).

Окрашенные в голубой цвет фракции после добавления двух объемов охлажденной до –70° смеси этанол–хлороформ (9 : 1, об/об) подвергали осаждению центрифугированием при 6000 g (4°). Голубой осадок растворяли в PBS и ЦП отделяли от денатурированных примесей центрифугированием при 15 000 g (4°). Надосадочную жидкость элюировали PBS через колонку с аргинин-сефарозой, уравновешенную PBS, а затем наносили на протамин-сефарозу. Колонку промывали PBS и элюировали ЦП 1М NaCl, 10 мМ натрий-фосфатного буфера, pH 7,4. Выделенный практически чистый ЦП ( $A_{610}/A_{280} = 0,050$ , чистота 99,7%) подвергали гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-200 *Superfine* (90 × 2,5 см), уравновешенной PBS. Фракции (по 1 мл), соответствовавшие отдельным пикам, объединяли и концентрировали центрифугированием при 2000 g (4°) в ячейке Vivaspin 20 с фильтром, удерживающим белки с молекулярной массой выше 10 кДа.

Молекулярную массу белков и протеолитических фрагментов ЦП определяли методом Ds-Na-ПААГ-электрофореза [19]. ЦП обнаруживали в геле после электрофореза в ПААГ в неденатурирующих условиях [20] специфическим хромогенным субстратом — *o*-дианизидином [21].

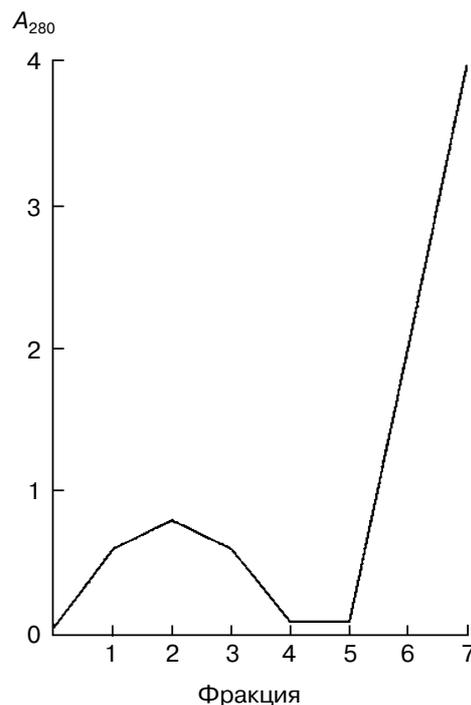
**Масс-спектрометрический анализ** проводили на масс-спектрометре («Bruker», Германия). Для приготовления образцов белки разделяли электрофорезом в ПААГ и вырезали из геля участки, содержащие белковые зоны. Триптический гидролиз белка в ПААГ проводили следующим образом: кусочек геля размером 1 мм<sup>3</sup> дважды промывали для удаления красителя инкубацией в 100 мкл 40%-ного раствора ацетонитрила в 0,1 М NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> в течение 30 мин при 37°. После удаления раствора для дегидратации геля добавляли по 100 мкл ацетонитрила. Затем ацетонитрил сливали, кусочек геля высушивали на воздухе и приливали 4 мкл раствора модифицированного трипсина концентрацией 15 мкг/мл в 0,05 М NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. Гидролиз проводили в течение 18 ч при 37°, затем к раствору добавляли 8 мкл 0,5%-ной трифторуксусной кислоты в 10%-ном растворе ацетонитрила в воде и тщательно перемешивали. Раствор над гелем использовали для получения MALDI-масс-спектров. Подготовка образцов для масс-спектрометрии проводилась следующим образом: на мишени смешивали по 1 мкл раствора образца и 0,3 мкл раствора 2,5-дигидроксibenзойной кислоты (10 мг/мл в 20%-ном ацетонитриле в воде с 0,5%-ной трифторуксусной кислотой), и полученную смесь высушивали на воздухе. Масс-спектры снимали на тандемном MALDI-времяпролетно-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex II («Bruker»), осна-

щенном УФ-лазером (Nd). Масс-спектры получены в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона; точность измеренных масс после докалибровки по пикам автолиза трипсина составляла 0,005%. Полученные пептидные фингерпринты белков анализировали online при помощи программы MASCOT (<http://www.matrixscience.com>). Поиск по «пептидному фингерпринту» проводился в базе данных NCBI среди белков человека с указанной точностью с учетом возможного окисления метионинов кислородом воздуха и возможной модификации цистеинов акриламидом.

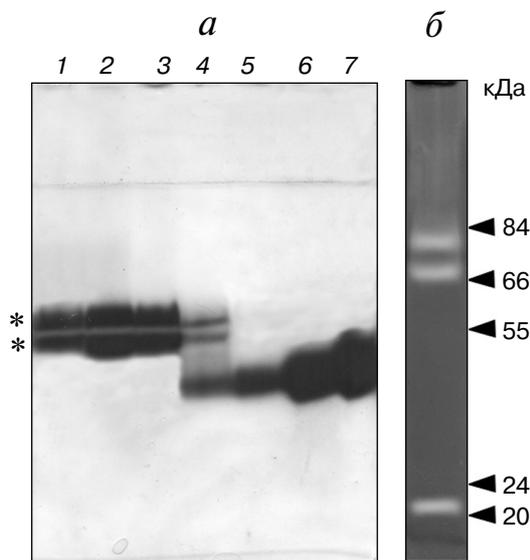
**Желатиназная активность *in situ*** была выявлена после электрофореза проб в Ds-Na-ПААГ, содержащем 0,1%-ный желатин [22]. Перед электрофорезом пробы смешивали с буфером, содержащим Ds-Na, но не подвергали нагреванию и не обрабатывали агентами, восстанавливающими дисульфидные связи. После электрофореза ПААГ отмывали 3 раза по 15 мин в 2,5%-ном Triton X-100 и инкубировали 18 ч при 37° в растворе 200 мМ NaCl, 10 мМ CaCl<sub>2</sub>, 50 мМ Tris-HCl, pH 7,4. Затем гели фиксировали и окрашивали кумасси R-250. О наличии желатиназной активности судили по отсутствию окраски фона.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При гель-фильтрации 300 мг практически чистого ЦП (99,7%) на колонке с сефадексом G-200 перед основным пиком ЦП (рис. 1, начало пика – с фракции 5) элюировался пик (фракции 1–3), содержащий около 2 мг белка, т.е. менее 1% от нанесенного количества ЦП. При ПААГ-электрофорезе в отсутствие Ds-Na в опережающем пике были выявлены зоны, которые окрашивались хромогенным субстратом ЦП – *o*-дианизидином, однако отличались по электрофоретической подвижности от основного пика ЦП (рис. 2, *a*). Ранее в литературе были описаны так называемые димерные изоформы ЦП с молекулярной массой ~200 кДа [23]. Если предположить, что в минорном пике содержатся димеры ЦП, то их спектральные характеристики не должны значительно отличаться от мономерного ЦП. Однако являющееся критерием чистоты ЦП соотношение поглощения ионов меди I типа и остатков ароматических аминокислот ( $A_{610}/A_{280}$ ) в данной ЦП-содержащей фракции оказалось равным  $0,027 \pm 0,001$ , что почти в два раза меньше, чем соотношение, характерное для гомогенного ЦП в основном пике –  $0,051 \pm 0,001$ . Более того, димерное строение никак не объясняло наличия двух близких по электрофоретической подвижности ЦП-содержащих зон (рис. 2, *a*).



**Рис. 1.** Участок профиля элюции белков, полученный при гель-фильтрации препарата ЦП на сефадексе G-200. Фракция 5 – начало основного пика, содержащего 99,3% белка нанесенного на колонку. Объем фракции – 1 мл



**Рис. 2.** Электрофоретический анализ в ПААГ фракций белков, полученных гель-фильтрацией препарата ЦП на сефадексе G-200. *a* – В отсутствие Ds-Na (окрашивание *o*-дианизидином). Дорожки: 1–7 – фракции 1–7 (20 мкл). Звездочкой отмечены зоны, подвергнутые масс-спектрометрическому анализу. *б* – Анализ желатиназной активности *in situ* фракции 2 (2 мкл) в присутствии Ds-Na (окрашивание кумасси R-250)

Таким образом, мы предположили, что в данных фракциях содержатся два близких по электрофоретической подвижности комплекса ЦП.

Проведенный масс-спектрометрический анализ белков в ЦП-содержащих зонах с уменьшенной электрофоретической подвижностью (рис. 2, *a*\*) показал, что в этих зонах кроме фрагментов трипсинолиза ЦП содержатся фрагменты двух металлопротеиназ ММП-2 и ММП-12 (таблица).

Выявление желатиназной активности *in situ* после электрофореза в Ds-Na-ПААГ подтвердило наличие ММП в выделенном препарате комплексов ЦП (рис. 2, *b*). Оказалось, что зоны 72, 67 и 22 кДа проявляют желатиназную активность, что выразилось в полном отсутствии окрашенного красителем желатина в указанных участках геля. Согласно литературным данным, зоны 72 и 67 кДа соответствуют проферменту и активной форме ММП-2, а зона 22 кДа соответствует активной форме ММП-12 [24].

В препаратах выделенных комплексов ЦП обнаруживалась зона 19 кДа, соответствующая

первому фрагменту, образуемому при спонтанном протеолизе ЦП (фрагмент F5) [25]. Соответствие этой зоны предполагаемому фрагменту было доказано с помощью масс-спектрометрии фрагментов трипсинолиза (таблица). Для двух обнаруженных пептидов с массами 1565,77 и 2668,23 Да были проанализированы масс-спектры, подтвердившие их принадлежность к F5-фрагменту ЦП. Однако следует отметить, что в препарате не выявлялись высокомолекулярные фрагменты спонтанного гидролиза ЦП.

Примечательно, что ни одна из протеиназ, претендовавших на роль фермента, деградирующего ЦП (плазмин, эластаза), не гидролизовала белок до набора фрагментов, образующихся при спонтанном протеолизе препаратов ЦП. Как правило, расщепление цепи было слишком частым, и образующиеся фрагменты не соответствовали по массе фрагментам спонтанного протеолиза.

Таким образом, одной из причин протеолиза препаратов ЦП является комплексообразование

Пептидный фингерпринт компонентов комплексов ЦП и фрагмента ЦП с *M* 19 кДа (по результатам поиска с помощью программы MASCOT <http://www.matrixscience.com>)

Начало— конец цепи	$M_{\text{ожид.}}$ Да	$M_{\text{вычисл.}}$ Да	$\Delta$ , Да	Пептид
Цепь А ММП-2 (желатиназа А, 71 кДа, найдено 19% последовательности)				
8–18	1173,57	1173,60	–0,03	K.FPGDVAPKTDK.E
16–33	2088,96	2089,02	–0,06	K.TDKELAVQYLNTFYGCPK.E
73–86	1612,78	1612,71	0,07	R.CGNPDVANYNFFPR.K
133–146	1586,75	1586,75	0	R.IHDGEADIMINFGFR.W
242–263	2356,04	2356,01	0,03	K.YGFCPHEALFTMGGNAEGQPCK.F
300–330	3298,53	3298,48	0,05	K.YGFCPETAMSTVGGNSEGAPCVFPFTFLGNK.Y пропионамид (С)
331–343	1430,66	1430,61	0,05	K.YESCTSAGRSDGK.M пропионамид (С)
Каталитический домен ММП-12 (22 кДа, найдено 23% последовательности)				
1–6	744,38	744,37	0,01	-.MGPVWR.K
7–13	979,51	979,52	–0,01	R.KHYITYR.I
8–13	851,41	851,43	–0,02	K.HYITYR.I
14–23	1252,53	1252,55	–0,02	R.INNYTPDMNR.E окисление (М)
48–61	1518,76	1518,82	–0,06	K.INTGMADILVVFAR.G
F5-фрагмент ЦП (19 кДа, найдено 27% последовательности)				
31–38	975,46	975,43	0,03	K.TYSDHPEK.V
39–51	1565,76	1565,72	0,04	K.VNKDDEEFIESNK.M
103–125	2668,23	2668,25	–0,02	R.GVYSSDVFDFIPGTYQTLEMFPF.R
103–125	2684,23	2684,25	–0,02	R.GVYSSDVFDFIPGTYQTLEMFPF.R окисление (М)

белка с ММП-2 и ММП-12. Это не первый пример взаимодействия ЦП с протеиназами, поскольку, как было показано нами ранее, среди белков нейтрофильных лейкоцитов с ЦП взаимодействуют три гомологичных протеиназы: эластаза, катепсин G и протеиназа 3 [26]. Как и большинство белков, взаимодействующих с ЦП (лактоферрин, миелопероксидаза, протамин, эластаза, катепсин G, протеиназа 3, азурицин), ММП-2 и ММП-12 обладают аффинностью к гепарину. Этим оправдан стабилизирующий эффект от применения метода хроматографии препаратов ЦП на гепарин-сефарозе, предложенного нами ранее [17].

Петля между пятым и шестым доменами ЦП (<sup>885</sup>TLKVFQPRRK<sup>894</sup>) подвергается протеолитической деградации в первую очередь. Это вызвано, с одной стороны, наличием в ней нескольких сайтов гидролиза протеиназами. После остатков K и R белковую цепь расщепляют трипсиноподобные протеиназы (плазмин); после L и V — эластазоподобные протеиназы (эластаза, протеиназа 3), после F — химотрипсиноподобные протеиназы (катепсин G). С другой стороны, данная петля отличается высокой подвиж-

ностью и неупорядоченностью структуры, которая «не разрешается» даже при использовании для рентгеноструктурного анализа высокоочищенных препаратов недеградированного ЦП [27]. Разрыва этой петли достаточно для того, чтобы ЦП потерял активность глутатионзависимой пероксидазы [9], способность эффективно загружать ионы Fe<sup>3+</sup> в ферритин [11], а также эффективно ингибировать прооксидантные свойства миелопероксидазы [15, 16].

Можно предположить, что протеолитическая деградация ЦП является одним из биохимических механизмов, приводящих к снижению антиоксидантного статуса организма. В пользу этого говорит то, что повышенная протеолитическая активность плазмы у больных гемофилией приводит к снижению антиоксидантных показателей и к выраженному окислительному стрессу; при этом ЦП в плазме таких больных подвергается значительной протеолитической деградации [28].

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 06-04-48602 и 09-04-01059).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Takahashi, N., Ortel, T.L., and Putnam, F.M. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 390–394.
2. Noyer, M., Dwulet, F.E., Hao, Y.L., and Putnam, F.W. (1980) *Anal. Biochem.*, **102**, 450–458.
3. Bianchini, A., Musci, G., and Calabrese, L. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 20265–20270.
4. Ehrenwald, E., and Fox, P.L. (1994) *Arch. Biochem. Biophys.*, **309**, 392–395.
5. Moshkov, K.A., Lakatos, S., Hajdu, J., Zavodsky, P., and Neifakh, S.A. (1979) *Eur. J. Biochem.*, **94**, 127–134.
6. Osaki, S. (1966) *J. Biol. Chem.*, **241**, 5053–5059.
7. Stoj, C., and Kosman, D.J. (2003) *FEBS Lett.*, **554**, 422–426.
8. Васильев В.Б., Качурин А.М., Сорока Н.В. (1988) *Биохимия*, **53**, 2051–2058.
9. Kim, I.G., and Park, S.Y. (1998) *FEBS Lett.*, **437**, 293–296.
10. Shiva, S., Wang, X., Ringwood, L.A., Xu, X., Yuditskaya, S., Annavajhala, V., Miyajima, H., Hogg, N., Harris, Z.L., and Gladwin, M.T. (2006) *Nat. Chem. Biol.*, **2**, 486–493.
11. Van Eden, M.E., and Aust, S.D. (2000) *Arch. Biochem. Biophys.*, **381**, 119–126.
12. Jeong, S.Y., and David, S. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 27144–27148.
13. Соколов А.В., Пулина М.О., Захарова Е.Т., Шавловский М.М., Васильев В.Б. (2005) *Биохимия*, **70**, 1231–1236.
14. Segelmark, M., Persson, B., Hellmark, T., and Wieslander, J. (1997) *Clin. Exp. Immunol.*, **108**, 167–174.
15. Панесенко О.М., Черканов 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.
16. Sokolov, A.V., Ageeva, K.V., Pulina, M.O., Tcherkalina, O.S., Samygina, V.R., Vlasova, I.I., Panasencko, O.M., Zakharova, E.T., and Vasilyev, V.B. (2008) *Free Rad. Res.*, **42**, 989–998.
17. Соколов А.В., Захарова Е.Т., Шавловский М.М., Васильев В.Б. (2005) *Биоорг. химия*, **31**, 269–279.
18. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265–275.
19. Laemmli, U.K. (1970) *Nature (London)*, **227**, 680–686.
20. Davis, B.J. (1964) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**, 404–427.
21. Owen, C.A., and Smith, H. (1961) *Clin. Chim. Acta*, **6**, 441–444.
22. Cainelli, G., Galetti, P., Garbisa, S., Giacomini, D., Sartor, L., and Quintavalla, A. (2003) *Bioorg. Med. Chem.*, **11**, 5391–5399.
23. Sato, M., Schilsky, M.L., Stockert, R.J., Morell, A.G., and Sternlieb, I. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 2533–2537.
24. Xie, S., Issa, R., Sukkar, M.B., Oltmanns, U., Bhavsar, P.K., Papi, A., Caramori, G., Adcock, I., and Chung, K.F. (2005) *Respir. Res.*, **6**, 148.
25. Kingston, I.B., Kingston, B.L., and Putnam, F.W. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 1668–1672.
26. Соколов А.В., Пулина М.О., Агеева К.В., Рунова О.Л., Захарова Е.Т., Васильев В.Б. (2007) *Биохимия*, **72**, 1072–1077.
27. Самыгина В.Р., Соколов А.В., Пулина М.О., Бартуник Г., Васильев В.Б. (2008) *Кристаллография*, **53**, 676–684.
28. Алексанян Л.Р. (2008) *Некоторые особенности свободнорадикального окисления и антиоксидантной защиты у больных гемофилией в зависимости от степени тяжести заболевания*. Дис. ... канд. биол. наук, РНИИ гематологии и трансфузиологии, Санкт-Петербург.

## IDENTIFICATION OF COMPLEXES OF CERULOPLASMIN WITH MATRIX METALLOPROTEINASES 2 AND 12

**A. V. Sokolov\***, **M. O. Pulina**, **K. V. Ageeva**,  
**O. S. Tcherkalina**, **E. T. Zakharova**, **V. B. Vasilyev**

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

Received November 24, 2009  
Revision received January 18, 2009

Marked sensitivity to proteolytic degradation results in loss of numerous antioxidant properties of ceruloplasmin (CP), the multicopper oxidase of mammalian plasma. In this study gel filtration of virtually pure CP (purity 99.7%) yielded complexes of this protein. Subjecting the complexes to SDS-free PAGE revealed other proteins along with CP. Those were identified as matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-12 by means of tryptic fragment mass spectrometry. Electrophoretic bands corresponding to MMP-2 (72 and 67 kDa) and MMP-12 (22 kDa) displayed gelatinase activity. The identified proteinases contained heparin-binding motifs inherent in the complex-forming partners of CP, such as lactoferrin, myeloperoxidase, and serprocidines. Therefore, admixtures of MMPs can be efficiently eliminated from CP preparations by chromatography on heparin-Sepharose as proposed previously.

*Key words:* ceruloplasmin, matrix metalloproteinases, proteolysis