

УДК 547.962

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА, ЛАКТОФЕРРИНА И МИЕЛОПЕРОКСИДАЗЫ*

© 2007 г. А.В. Соколов^{1,**}, М.О. Пулина¹, К.В. Агеева¹,
М.И. Айрапетов¹, М.Н. Берлов¹, Г.Н. Волгин²,
А.Г. Марков², П.К. Яблонский², Н.И. Колодкин³,
Е.Т. Захарова¹, В.Б. Васильев¹

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

² Медицинский факультет, Санкт-Петербургский
государственный университет, 199106 Санкт-Петербург,
21-я линия В.О., 8А; факс: (812)774-9367

³ ГУ НИИ особо чистых биопрепаратов, 197110
Санкт-Петербург, ул. Пудожская, 7; факс: (812)235-5504

Поступила в редакцию 24.11.06

После доработки 21.12.06

При добавлении к церулоплазмину (ЦП) лактоферрина (ЛФ) и миелопероксидазы (МПО) формируется тройной комплекс ЦП–ЛФ–МПО. Комплекс образуется при физиологических условиях, а также в условиях диск-электрофореза без детергентов. Поликлональные антитела к ЛФ и к МПО вытесняют данные белки из комплекса ЦП–ЛФ–МПО. Фрагмент нейропептида RASAP 38 (29–38) и протамин замещают ЛФ и МПО в комплексе ЦП–ЛФ–МПО, связываясь с ЦП. Взаимодействию ЛФ и МПО с ЦП-сефарозой препятствуют ионная сила выше 0,3 М NaCl и pH ниже 4,1 (ЛФ) и 3,9 (МПО). Из частично гидролизованного ЦП с помощью аффинной хроматографии выделены два пептида (50–109 и 929–1012), вытесняющие ЦП из комплексов с ЛФ и МПО. Наблюдалось образование комплексов между ЦП семи видов млекопитающих и МПО человека или собаки. При инъекции в кровяное русло крыс МПО человека в кровотоке обнаруживался ее комплекс с ЦП крысы. Комплексы ЦП–ЛФ, ЦП–МПО и ЦП–ЛФ–МПО обнаружены при анализе 80 проб сыворотки крови и девяти экссудатов из гнойных очагов от больных с воспалением, а также 45 проб сыворотки крови и плевральной жидкости больных с плевритами различной этиологии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: церулоплазмин, лактоферрин, миелопероксидаза, белок-белковые взаимодействия.

Белки гранул нейтрофильных лейкоцитов обеспечивают первичную неспецифическую защиту организма от патогенных микробов. Среди этих белков, участвующих в реакциях врожденного иммунитета, особое место занимают металлопротеиды. Один из них, лактоферрин (ЛФ) – 78 кДа-белок семейства трансферринов, содержится в секреторных гранулах нейтрофильных лейкоцитов и проявляет разнообразные антимикробные свойства. ЛФ обладает свойствами иммуномодулирующего и противовоспалитель-

ного факторов. Он хелатирует ионы переходных металлов, взаимодействует с липополисахаридами, гидролизует белковые факторы колонизации бактерий. При пепсиновом гидролизе ЛФ образуются дефенсиноподобные производные, так называемые лактоферрицины, обладающие сильным бактерицидным действием [1, 2].

Маркерный 140 кДа-белок азурофильных гранул нейтрофильных лейкоцитов, миелопероксидаза (МПО, К.Ф. 1.11.1.7), катализирует окисление разных субстратов, используя активные формы кислорода O_2^- и H_2O_2 , генерируемые при респираторном взрыве фагоцитов. В итоге образуются эффективные антибактериальные и цитотоксические агенты, такие как гипохлорит-ионы. МПО – димерная хлоринсодержащая пероксидаза с антимикробными и прооксидантными свойствами, составляющая 1–5% сухого веса нейтрофильных лейкоцитов. Роль МПО в антимикробной защите организма и контроле над

Принятые сокращения: ЛФ – лактоферрин, МПО – миелопероксидаза, ЦП – церулоплазмин, RASAP 38 – гипоталамический активирующий аденилатциклазу пептид, PBS – фосфатный буфер.

* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, VM 06-306, 26.02.07.

** Адресат для корреспонденции и запросов оттисков.

опухолевым перерождением была подтверждена как в исследованиях *in vitro* с очищенной МПО или МПО-содержащими клетками, так и данными о повышенной чувствительности пациентов с наследственным дефицитом МПО к инфекции и развитию злокачественных опухолей. С другой стороны, МПО вносит вклад в окислительное поражение тканей организма при хроническом воспалении, в развитие лейкемии и нейродегенеративных заболеваний, повышает риск развития рака органов дыхания [3]. Хотя непосредственного взаимодействия ЛФ и МПО не наблюдалось, был продемонстрирован синергизм бактерицидного эффекта этих белков [1].

Известно, что и ЛФ, и МПО образуют комплексы с церулоплазмином (ЦП, ферро : O₂-оксидоредуктаза, КФ 1.16.3.1), 132 кДа-белком плазмы крови, относящимся к белкам острой фазы воспаления. Благодаря шести прочно связанным ионам меди, ЦП обладает широким спектром ферментативных активностей и действует как универсальный антиоксидант [4]. Было показано, что ЦП, взаимодействуя с МПО, ингибирует ее пероксидазную активность [5, 6]. Механизм ингибирования и основные свойства комплекса ЦП–МПО не были исследованы подробно.

Нашей группой впервые был охарактеризован комплекс ЦП–ЛФ [7, 8]. Нам удалось продемонстрировать усиление ферроксидазной активности ЦП под действием ЛФ [9]. Возможно, взаимодействие ферроксидазы (ЦП) и белка семейства трансферринов (ЛФ) указывает на роль комплекса ЦП–ЛФ в метаболизме железа. Кроме взаимодействия очищенных белков *in vitro*, мы наблюдали формирование комплекса ЦП–ЛФ в грудном молоке [9, 10] и слезной жидкости (неопубликованные данные). Мы предположили, что комплекс ЦП–ЛФ, формируясь в грудном молоке на ранних сроках лактации, может сохраняться и проявлять свои функции в желудке новорожденного (рН 5–6) [7, 10].

Учитывая, что и ЛФ, и МПО взаимодействуют с ЦП, мы изучили возможность формирования тройного комплекса ЦП–ЛФ–МПО. Мы также сравнили некоторые характеристики комплексов ЦП–ЛФ и ЦП–МПО. Кроме того, анализ образцов крови и экссудатов больных с гнойными заболеваниями подтвердил возможность формирования комплексов ЦП с ЛФ и МПО *in vivo*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали следующие реактивы: BioGel P-6, окрашенные маркеры молекулярной массы («BioRad», США); бромциан («Fluka»,

Швейцария); триэтиламин ((C₂H₅)₃N), ЭДТА («Merck», Германия); сефароза 4В, сефароза 6В, DEAE-сефадекс А-50, QAE-сефадекс А-50, CM-сефароза, фенол-сефароза, сефадекс G-100, G-150 («Pharmacia», Швеция); полный и неполный адьюванты Фрейнда, NaN₃, глицерин, Кумасси R-250, маркеры молекулярной массы для гель-фильтрации (450, 210, 160 кДа), меркаптоэтанол, персульфат аммония, Tris, 2-хлорэтиламин, эпихлоргидрин («Serva», Германия); глицин, *o*-дианизидин, Ds-Na, протамин кеты, фенолметилсульфонилфторид, 4-хлор-1-нафтол («Sigma», США); Toyopearl HW-55 («Toyo Soda», Япония); акриламид, аргинин, N,N'-метиленабисакриламид, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин («Лаборатория МЕДИГЕН», Россия); гепарин («СПОФА», Польша). PBS – 0,15 М NaCl, рН 7,4, 1,9 мМ Na₂HPO₄/8,1 мМ NaH₂PO₄; 0,1 М натрий-ацетатный буфер, рН 5,5–0,089 М AcONa/0,011 М AcOH; 0,1 М натрий-ацетатный буфер, рН 4,7 – 0,054 М AcONa/0,046 М AcOH.

Пептид KRYKQRVKNK, соответствующий фрагменту (29–38) нейропептида PACAP 38, синтезирован твердофазным методом (НИИ особо чистых биопрепаратов, Санкт-Петербург), чистота 99,5% по данным ВЭЖХ и аминокислотного анализа.

Препарат мономерного стабильного ЦП был выделен из плазмы крови с помощью аффинной хроматографии на протамин-сефарозе [11].

АЕ-Агарозу для выделения интактного ЦП и его комплексов получали обработкой сефарозы-6В эпихлоргидрином и 2-хлорэтиламином [12]. На колонку с АЕ-агарозой (40 мл) уравновешенной PBS, наносили 200 мл сыворотки крови и промывали PBS до A₂₈₀ < 0,02 в элюате. Связавшийся ЦП десорбировался при элюции 0,3 М NaCl. Полученную фракцию диализовали против PBS и удаляли минорные примеси хроматографией на колонке с гепарин-сефарозой (2 мл). Под действием PBS практически весь ЦП элюировался с колонки. Минорные белковые примеси элюировали с колонки 1 М NaCl и подвергали ПААГ-электрофорезу без Ds-Na. Белковые зоны с оксидазной активностью, вырезали из ПААГ для масс-спектрометрического анализа, который проводили на масс-спектрографе Bruker (НИИ физико-химической медицины МЗ РФ, Москва). Полученные пептидные фингерпринты белков анализировали при помощи программы MASCOT (<http://www.matrixscience.com>).

ЛФ выделяли из грудного молока с помощью ионообменной хроматографии на CM-сефарозе и гель-фильтрации на сефадексе G-100 Superfine [7].

МПО человека выделяли из лейкоцитов, любезно предоставленных профессором В.Н. Кокряковым (Отдел общей патологии и патофизио-

логии НИИЭМ РАМН, Санкт-Петербург), без экстракции катионными детергентами. Осадок лейкоцитов (40 г) суспендировали в 100 мл 0,05 М натрий-ацетатного буфера, pH 4,7, с добавлением 2,5 мМ фенолметилсульфонилфторида и подвергали замораживанию и оттаиванию с последующей трехкратной обработкой ультразвуком (44 кГц) по 30 с с перерывами на 1 мин при охлаждении во льду. Полученный экстракт лейкоцитов центрифугировали в течение 30 мин при 15 000 g (4°). Супернатант наносили на колонку с гепарин-сефарозой (2,5 × 7 см), промывали 0,05 М натрий-ацетатным буфером, pH 4,7, до $A_{280} < 0,01$ в элюате. МПО и ЛФ элюировали линейным градиентом по 60 мл 0 → 3 М NaCl (0,05 М натрий-ацетатный буфер, pH 4,7). В данных условиях ЛФ элюировался в тех же фракциях, что и МПО. К этим фракциям добавляли сульфат аммония до конечной концентрации 2 М и наносили на колонку с фенол-сефарозой, уравновешенной 2 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Колонку промывали уравновешивающим раствором, а затем ЛФ элюировали раствором, содержащим 0,5 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 50 мМ Tris-HCl, pH 7,4. После этого элюировали практически чистую МПО с помощью 25%-ного глицерина, в 0,05 М натрий-ацетатном буфере, pH 4,7, содержащем 5 мМ CaCl_2 . МПО дополнительно очищали гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-150 Superfine (5 × 100 см) в 0,15 М NaCl, 5 мМ CaCl_2 , 0,05 М натрий-ацетатном буфере, pH 4,7. Полученная МПО характеризовалась соотношением A_{430}/A_{280} (R_z) = 0,85, что служило доказательством гомогенности препарата [13]. Препарат МПО собаки выделен из лейкоцитов по сходной схеме [14].

Концентрацию гомогенных белковых препаратов определяли спектрофотометрически, используя для ЦП коэффициенты $A_{280} = 1,61$ мл/мг на 1 см и $A_{610} = 0,0741$ мл/мг на 1 см [15]; для ЛФ — $A_{280} = 1,46$ мл/мг на 1 см [16], для МПО человека — $A_{430} = 0,6$ мл/мл на 1 см [13].

Молекулярную массу белков и протеолитических фрагментов ЦП определяли методом Ds-Na-ПААГ-электрофореза [17]. ЦП выявляли после электрофореза в ПААГ без Ds-Na [18] путем специфической окраски *o*-дианизидином [19]. Для выявления оксидазной активности МПО после электрофореза ПААГ отмывали в течение 30 мин в 0,4 М натрий-ацетатном буфере pH 5,5 и окрашивали раствором, содержащим 20 мг 4-хлор-1-нафтола в 10 мл этанола, 5 мкл 8 М H_2O_2 и 90 мл 0,1 М натрий-ацетатного буфера pH 5,5. Через 20 мин на прозрачном фоне выявлялись темно-фиолетовые зоны. Окрашенные гели хранили в темноте.

Антитела к ЦП, ЛФ и МПО получали трехкратной иммунизацией кроликов соответствующими белками [20]. Ракетный иммуноэлектро-

форез проводили для количественного определения ЛФ и МПО [21]. Для выявления активности МПО в иммунных преципитатах агарозные гели после электрофореза отмывали три раза по 20 мин в 0,4 М натрий-ацетатном буфере, pH 5,5, и окрашивали преципитаты раствором, содержащим 0,08% *o*-дианизидина и 80 мкМ H_2O_2 в 0,1 М натрий-ацетатном буфере, pH 5,5. Затем инкубировали гели при 37° в течение 30 мин (до развития коричневой окраски). Фон отмывали в 5%-ной АсОН. ЦП, ЛФ, МПО, гепарин и протамин (10 мг, 10 мг, 5 мг, 20 мг и 4 мг на 1 мл влажного геля соответственно) иммобилизовали на ВгCN-активированной сефарозе 4В [11].

Пробы сыворотки крови и экссудатов больных с гнойным воспалением получены от пациентов отделения гнойной хирургии городской больницы № 5 (г. Санкт-Петербург) при любезном сотрудничестве профессора Ю.А. Спесивцева. Образцы сыворотки крови, плевральной жидкости и экссудатов отбирали без добавления антикоагулянтов и последующего замораживания, центрифугировали при 3000 g (4°) и анализировали надосадочную жидкость.

Гель-фильтрацию белков проводили на колонке (1 × 50 см) с Toyopearl HW-55 Fine. Элюировали белки 0,15 М NaCl, 10 мМ Tris-HCl, pH 7,4 со скоростью 0,5 мл/мин. Пробы объемом 100 мкл содержали: а) смесь ЦП (1 мг) и ЛФ (0,6 мг), б) ЦП (1 мг) и МПО (1,1 мг), в) ЦП (1 мг), ЛФ (0,6 мг) и МПО (1,1 мг). В качестве маркеров молекулярной массы использовали ферритин, каталазу, МПО, ЦП, альдолазу и ЛФ (по 1 мг в 100 мкл раствора). По результатам трех опытов строили калибровочный график, по которому вычисляли значения молекулярной массы комплексов.

Для проведения аффинной хроматографии ЛФ и МПО две колонки с ЦП-сефарозой (0,5 мл) уравновешивали 0,1 М NaCl, 20 мМ Tris-HCl, pH 7,4). Раствор, содержащий 0,5 мг ЛФ и 1 мг МПО в этом же буфере, наносили на колонки. На первой колонке элюцию проводили ступенчатым градиентом 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35 и 0,40 М NaCl, приготовленным на 20 мМ Tris-HCl буфере pH 7,4, а на второй — растворами 100 мМ натрий-ацетатного буфера с pH 4,7, 4,5, 4,3, 4,1, 3,9 и 3,7. Концентрацию ЛФ и МПО в элюатах определяли методом ракетного иммуноэлектрофореза. Опыт повторяли троекратно.

Аффинная хроматография на ЛФ- и МПО-сефарозе позволила выделить из препарата ЦП, подвергнувшегося спонтанному протеолизу в результате длительного хранения, пептиды, которые обладали высоким сродством к ЛФ и МПО. 2 мл раствора ЦП (100 мг/мл в 25%-ном растворе сахарозы в PBS) центрифугировали 30 мин при 15 000 g (4°), разбавляли в 10 раз PBS и нано-

сили на колонку с ЛФ-сефарозой (1 × 3 см). Сорбент отмывали PBS до $A_{280} < 0,002$, а затем элюировали 0,3 М NaCl в 10 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7,4. Элюат разбавляли в 10 раз PBS и наносили на колонку с МПО-сефарозой (1 × 3 см). По изменению A_{220} в элюате до и после нанесения судили о том, все ли пептиды, которые сорбировались на ЛФ-сефарозе, взаимодействуют также с МПО. Как и в случае с ЛФ-сефарозой, сорбент отмывали и элюировали пептиды. Полученную фракцию обессоливали путем лиофилизации с последующим растворением в минимальном количестве воды и гель-фильтрации на колонке с BioGel P-6 (1 × 30 см), уравновешенной PBS. Для элюированных в свободном объеме пептидов методом Ds-Na-ПААГ-электрофореза определяли молекулярные массы, погрешность измерения по трем опытам составила 0,5 кДа.

Идентификацию пептидов осуществляли методом масс-спектрометрии фрагментов трипсинолиза. Для приготовления образцов пептиды разделяли Ds-Na-ПААГ-электрофорезом и вырезали из геля участки, содержащие белковые зоны. Анализ проводили на масс-спектрографе Bruker (НИИ физико-химической медицины МЗ РФ, Москва). Полученные пептидные фингерпринты белков анализировали при помощи программы MASCOT (<http://www.matrixscience.com>). Изображение трехмерной структуры ЦП получали в программе RasMol Version 2.7.1. по координатам, определенным при рентгеноструктурном анализе ЦП [22].

Для моделирования образования комплекса ЦП–МПО *in vivo* использовали трех самцов беспородных белых крыс массой около 150 г. В хвостовую вену крыс вводили по 2 мг очищенной МПО человека в 100 мкл PBS. Образцы крови отбирали через 1, 5, 15, 30 и 45 мин после инъекции. Сыворотку крови анализировали методами ракетного иммуноэлектрофореза (10 мкл/проба) и ПААГ-электрофореза без Ds-Na (10 мкл/проба).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Формирование комплексов ЦП с ЛФ и МПО.

Возможность формирования тройного комплекса ЦП–ЛФ–МПО мы изучили при помощи диск-электрофореза в ПААГ без детергентов. Добавление к ЦП очищенных препаратов ЛФ, МПО и смеси ЛФ с МПО приводило к снижению электрофоретической подвижности ЦП, что указывает на формирование его комплексов с этими белками (рис. 1, а). Ранее, при исследовании взаимодействия ЦП с ЛФ, мы показали, что при формировании комплекса у обоих бел-

ков изменялась электрофоретическая подвижность [7].

Очищенная МПО в контрольных опытах не входила в ПААГ при диск-электрофорезе, что совпадает с поведением очищенного ЛФ, описанным ранее [7]. Однако МПО мигрировала в гель при добавлении к ней различных количеств

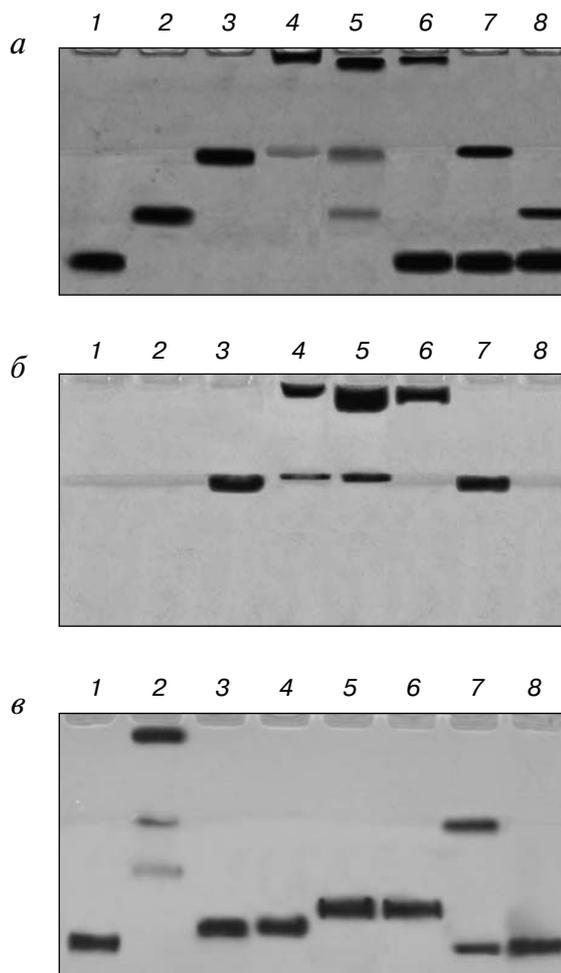


Рис. 1. Электрофореграмма комплексов церулоплазмينا с лактоферрином и/или миелопероксидазой после диск-электрофореза в ПААГ без детергентов. а – Окраска *o*-дианизидином; б – окраска 4-хлор-1-нафтолом и H_2O_2 . Дорожки: 1 – ЦП, 0,5 мкг; 2 – ЦП, 0,5 мкг + ЛФ, 0,6 мкг; 3 – ЦП, 0,5 мкг + МПО, 0,5 мкг; 4 – ЦП, 0,5 мкг + МПО, 1 мкг; 5 – ЦП, 0,5 мкг + ЛФ, 0,3 мкг + МПО, 0,5 мкг; 6 – сыворотка крови, 5 мкл + ЛФ, 0,1 мкг + МПО, 0,2 мкг; 7 – 6 + 1 мкг антител против ЛФ; 8 – 6 + 1 мкг антител против МПО. в – Окраска *o*-дианизидином. Дорожки: 1 – ЦП, 0,5 мкг; 2 – ЦП, 0,5 мкг + ЛФ, 0,3 мкг + МПО, 0,5 мкг; 3 – 2 + фрагмент (29–38) нейропептида РАСАР38, 0,1 мкг; 4 – 1 + фрагмент (29–38) нейропептида РАСАР38, 0,1 мкг; 5 – 2 + протамина кеты, 0,2 мкг; 6 – 1 + протамина кеты, 0,2 мкг; 7 – 2 + гепарин, 1 мкг, 8 – 2 + 7 кДа- и 5 кДа-пептиды ЦП, 0,1 мкг

ЦП, при этом происходило формирование комплексов ЦП–МПО и ЦП–2МПО, выявляемых при окраске на пероксидазную активность (рис. 1, б). На электрофореграмме видно образование зоны, соответствующей комплексу ЦП–МПО (на границе концентрирующего и разделяющего гелей), а также зоны, соответствующей комплексу ЦП–2МПО (на входе в концентрирующий гель). Доказательством того, что в данных зонах содержится и ЦП, и МПО служит окраска специфическими для этих ферментов хромогенными субстратами (рис. 1, а, б; дорожки 3, 4). Образование комплексов с разной стехиометрией наблюдалось нами и ранее при исследовании комплексов ЦП с ЛФ, например 1ЦП : 2ЛФ и 1ЦП : 4ЛФ [7]. Тройной комплекс ЦП–ЛФ–МПО (рис. 1, а, б; дорожка 5) образовывался при смешивании эквимольных количеств белков (вне зависимости от порядка их смешивания). При смешивании ЦП, ЛФ и МПО преимущественно формировался тройной комплекс и в меньшем количестве – двойные комплексы ЦП–ЛФ и ЦП–МПО, судя по результатам диск-электрофореза (рис. 1, а, б; дорожка 5).

Появление дополнительной оксидазной зоны, характерной для тройного комплекса, наблюдалось также при добавлении ЛФ и МПО к сыворотке крови (рис. 1, а, б; дорожка 6). Это свидетельствует, что белки сыворотки крови не препятствуют взаимодействию ЦП с ЛФ и МПО. Поликлональные антитела против ЛФ или МПО, добавленные к подобной пробе, вызвали диссоциацию комплекса ЦП–ЛФ–МПО с образованием комплексов ЦП–МПО (рис. 1, а, б; дорожка 7) или ЦП–ЛФ (рис. 1, а, б; дорожка 8) соответственно. При этом можно утверждать, что взаимодействию препятствуют не любые иммуноглобулины G кролика, поскольку комплекс ЦП с ЛФ существовал в присутствии антител против МПО, и наоборот. Вероятно, в результате специфического взаимодействия с соответствующими антителами оказываются частично перекрытыми участки на поверхности ЛФ или МПО, необходимые для контакта с ЦП. Ранее мы описывали разобщение комплекса ЦП–ЛФ в присутствии поликлональных антител к любому из этих двух белков [8]. Коиммунопреципитация ЦП и ЛФ из грудного молока под действием поликлональных антител к ЛФ происходила только в определенном диапазоне концентрации антител [10]. Добавленные в большем количестве антитела вытесняли ЦП из комплекса с ЛФ. Похожие данные получили Гриффин и коллеги при проведении лигандного Вестерн-блоттинга [23]. Они сообщают о взаимодействии ЦП с МПО и «кажущемся отсут-

ствии взаимодействия с ЛФ», вызванном, вероятно, частичным совпадением антигенных детерминант ЛФ с участками контакта с ЦП. Для корректного проведения таких экспериментов необходимо использовать моноклональные антитела к участку, не вовлеченному в комплексообразование.

Образование комплекса ЦП–ЛФ *in vivo* мы наблюдали при анализе грудного молока [9, 10] и слезной жидкости (неопубликованные данные). Обнаружить комплексы ЦП с белками нейтрофильных лейкоцитов в образцах сыворотки крови не представляется возможным, поскольку концентрация этих белков в норме сравнительно мала – 265 нг/мл для ЛФ [24] и 220 нг/мл для МПО [25]. Однако мы предположили, что выявить комплексы ЦП–ЛФ, ЦП–МПО и ЦП–ЛФ–МПО можно при повышении концентрации ЛФ и МПО из-за дегрануляции нейтрофилов в ходе воспалительной реакции. При скрининге девяти образцов гнойных экссудатов и 80 проб сыворотки крови от пациентов с различными воспалительными заболеваниями, а также образцов сыворотки крови и плевральной жидкости от 45 больных плевритами различной этиологии (из них: карциноматозный – 24, парапневмонический – 7, кардиогенный – 3, туберкулезный – 5, постоперационный – 3) мы использовали диск-электрофорез и во всех случаях выявили комплексы ЦП с ЛФ и МПО. Доказательством того, что наблюдаемые нами дополнительные оксидазо-положительные зоны являются комплексами с ЛФ и МПО, служило их исчезновение при добавлении к этим пробам антител к ЛФ и МПО.

Свойства комплексов ЦП–МПО и ЦП–ЛФ–МПО. Для выяснения особенностей формирования комплексов в условиях, близких к физиологическим (ионная сила и рН), мы проводили гель-фильтрацию на Toyopearl HW-55 Fine. При смешивании равных молярных количеств ЦП с ЛФ, с МПО, а также с ЛФ и МПО белки элюировались каждый раз в виде единственного симметричного пика, что подтверждает формирование комплексов. Значения молекулярной массы для комплексов ЦП–ЛФ, ЦП–МПО и ЦП–ЛФ–МПО оценены как 215 ± 5 , 280 ± 6 и 350 ± 5 кДа соответственно. Принимая во внимание известные значения молекулярной массы для ЦП (132 кДа), МПО (140 кДа) и ЛФ (78 кДа), можно убедиться, что белки входят в эти комплексы в эквимольных соотношениях.

В то время как в щелочных условиях диск-электрофореза формируются комплексы ЦП–ЛФ [7, 10] и ЦП–МПО с различной стехиометрией, при гель-фильтрации в нейтральной среде смеси ЦП и МПО, так же, как в случае ЦП и

ЛФ, формировался исключительно комплекс с соотношением 1 ЦП : 1 МПО. При аффинной хроматографии МПО и ЛФ на ЦП-сефарозе оба белка сорбировались на смоле. В предварительных опытах мы показали, что при элюции раствором ЛФ (или МПО) ЦП-сефарозы, насыщенной МПО (ЛФ), не происходило десорбции МПО (ЛФ), что, вероятно, обусловлено формированием тройного комплекса ЦП–ЛФ–МПО. При элюции растворами с возрастающим содержанием NaCl одновременная десорбция белков происходила при концентрации соли выше 0,3 М. Понижение pH элюирующего раствора препятствовало взаимодействию ЛФ с ЦП-сефарозой при pH ниже 4,1, а МПО при pH ниже 3,9. Такие результаты указывают на электростатическую природу взаимодействий ЦП (pI 4,7) с ЛФ (pI 8–9) и МПО (pI 9–10). Комплексы ЦП с ЛФ и МПО диссоциировали при добавлении избыточных количеств фрагмента нейропептида RASAP 38 (29–38) или протамина кеты, судя по результатам диск-электрофореза (рис. 1, в; дорожки 1–6). Это объясняется вытеснением ЛФ и МПО из комплекса с ЦП под действием конкурентов (фрагмент нейропептида RASAP 38 (29–38) и протамин кеты). С молекулой ЦП может связаться 6–7 молекул нейропептида RASAP 38 [26] или 6 молекул протамина кеты [11]. Поэтому нельзя исключить, что, помимо сайтов для связывания ЛФ и МПО, на поверхности молекулы ЦП есть участки для связывания других катионных белков.

Доказательством высокой специфичности взаимодействия ЦП и МПО служит то, что в выделенном на АЕ-агарозе препарате ЦП сыворотки крови была обнаружена минорная примесь МПО. Электрофоретический анализ элюата с гепарин-сефарозы выявил оксидазную зону, расположенную на границе концентрирующей и разделяющей гелей. Такую же подвижность ЦП приобретал, образуя комплекс с МПО (см. рис. 1, а; дорожка 3). Масс-спектрометрия фрагментов трипсинолиза данной белковой зоны показала наличие ЦП и МПО (выявлено, соответственно, 15 и 19 пептидов с разностью вычисленного и ожидаемого значения молекулярной массы, не превышающей 0,08). Вероятно, постоянно секретируемая нейтрофилами МПО, концентрация которой в плазме очень мала и составляет в норме 220 нг/мл [25], образует прочный комплекс с ЦП, который сорбируется на АЕ-агарозе и гепарин-сефарозе. Этим комплекс ЦП–МПО отличается от изученного нами комплекса ЦП–ЛФ [7, 10], который разобщался при хроматографии на гепарин-сефарозе. Аналогично, в условиях диск-электрофореза гепарин не разобщал комплекс ЦП–МПО, в то вре-

мя как комплекс ЦП–ЛФ при добавлении гепарина диссоциировал (рис. 1, в; дорожка 7), последнее в условиях аффинной хроматографии и диск-электрофореза было показано нами ранее [8, 10].

Возможность формирования комплексов между ЦП и МПО разных видов мы продемонстрировали при добавлении к МПО человека образцов сыворотки крови семи видов млекопитающих (крысы, мыши, кролика, собаки, лошади, дельфина и человека). На электрофореграмме (рис. 2, а) видны дополнительные оксидазоположительные зоны на границе разделяющего и концентрирующего ПААГ, что говорит об образовании комплексов с МПО человека, приводящем к снижению электрофоретической подвижности ЦП. Аналогичные результаты получены для МПО собаки (данные не приводятся). Очевидно, участки взаимодействия между ЦП и МПО эволюционно консервативны. Отсутствие видовой специфичности характерно также для комплексов ЦП с ЛФ [27] и с протамином [11].

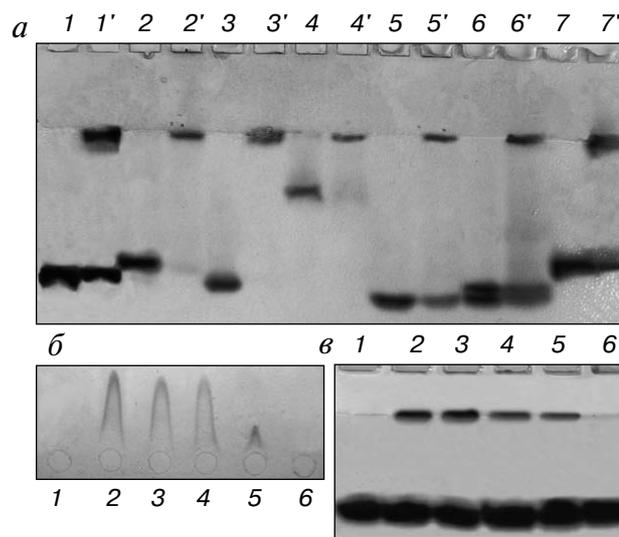


Рис. 2. Формирование межвидовых комплексов церулоплазмينا и миелопероксидазы *in vitro* и *in vivo*. а – Электрофореграмма образцов сыворотки крови различных млекопитающих с добавлением МПО человека (N' – 1 мкг, окраска о-дианизидином) после диск-электрофореза в ПААГ без детергентов: 1 – крысы, 1 мкл, 2 – мыши, 5 мкл, 3 – кролика, 10 мкл, 4 – собаки, 20 мкл, 5 – лошади, 20 мкл, 6 – дельфина, 5 мкл, 7 – человека, 3 мкл; б – ракетный иммуноэлектрофорез, 10 мкг антител к МПО человека на 1 мл 1%-ной агарозы, окраска о-дианизидином и H₂O₂; в – электрофореграмма после диск-электрофореза в ПААГ без детергентов, окраска о-дианизидином; дорожки: 1 – сыворотка крови крысы до инъекции; 2 – через 1; 3 – 5; 4 – 15; 5 – 30; 6 – 45 мин с момента инъекции МПО человека (по 10 мкл сыворотки)

Ранее мы показали, что введенный в кровоток крысы ЛФ человека циркулировал в комплексе с ЦП около двух часов [7]. В настоящей работе внутривенно введенная крысам МПО человека выявлялась в образцах крови, взятых через 30 мин, но не обнаруживалась спустя 45 мин с момента инъекции (рис. 2, б). Комплекс ЦП крысы–МПО человека выявляли в пробах сыворотки также в течение 30 мин (рис. 2, в). Его подвижность при диск-электрофорезе совпадает с таковой у комплекса, полученного при смешивании сыворотки крови крысы с МПО человека (рис. 2, а; дорожка 1'). Таким образом, выведение МПО из кровотока сопровождалось исчезновением комплекса ЦП–МПО.

Для определения участков молекулы ЦП, которые могли бы быть вовлечены во взаимодействие с ЛФ и МПО, из препарата частично гидролизованного ЦП выделили пептиды, имеющие высокое сродство к ЛФ и МПО. Следует отметить, что пептиды ЦП, сорбиравшиеся на ЛФ-сефарозе, без потерь сорбировались и на МПО-сефарозе. Аналогичные результаты были получены при сорбции пептидов ЦП на МПО-сефарозе, а затем на ЛФ-сефарозе. Были выделены два пептида с молекулярными массами около 7 и 5 кДа. Методом диск-электрофореза было показано, что пептиды вызывали диссоциацию комплексов не гидролизованного ЦП с ЛФ и МПО (рис. 1, в; дорожка 8), но по отдельности каждый из них не вызывал диссоциации комплексов. С помощью масс-спектрометрии фрагментов трипсинолиза удалось локализовать эти пептиды в молекуле ЦП (таблица). Для 7 кДа-пептида идентифицированы четыре фрагмента, которые располагаются в ЦП в области 50–109

аминокислотного остатка, для 5 кДа-пептида – три фрагмента, в области 929–1012 остатка. Вычисленные значения молекулярной массы пептидов 50–109 и 929–1012 равны 7,1 и 5,1 кДа соответственно. Возможно, истинный размер выделенных пептидов несколько больше, поскольку метод масс-спектрометрии фрагментов трипсинолиза не позволяет определить фланкированы ли идентифицированные участки какими-либо последовательностями.

Соотнося положение идентифицированных пептидов с третичной структурой ЦП [22], можно отметить, что они сближены в пространстве и относятся к первому и шестому доменам молекулы (рис. 3). Эти два домена формируют каталитический центр ЦП, включающий четыре иона меди, подразделяемые на три типа на основании их спектральных характеристик. В состав идентифицированных пептидов входят остатки, связывающие все четыре иона меди активного центра: Н975 (Cu I типа), Н101, Н978 (Cu II типа), Н980 (Cu III типа), Н 103 (Cu III типа). Таким образом, выявленные нами участки ЦП, имеющие высокое сродство к ЛФ и МПО, расположены вблизи каталитического центра ЦП. Ранее мы обнаружили, что ЛФ и протамин, взаимодействуя с ЦП, усиливают его ферроксидазную активность [9, 11]. Нами было высказано предположение об аллостерическом влиянии этих белков на активность ЦП в результате их связывания вблизи активного центра, которое сейчас нашло подтверждение. Отсутствие влияния МПО на ферроксидазную и диаминооксидазную активности ЦП [6] можно объяснить большей удаленностью участка ЦП, необходимого для связывания с МПО, от активного центра.

Пептидный фингерпринт двух пептидов ЦП, взаимодействующих с ЛФ и МПО. Результаты поиска с помощью программы MASCOT (нумерация аминокислотных остатков приводится в соответствии с первичной структурой полноразмерных белков)

Начало–конец	Ожидаемое значение <i>M</i> , Да	Вычисленное значение <i>M</i> , Да	Δ , Да	Пептид
Идентифицированные фрагменты трипсинолиза 7 кДа-пептида ЦП				
50–62	1646,8269	1646,8304	–0,0035	KALYLQYTDETFR
63–79	1911,1383	1911,1233	0,0150	TTIEKPVWLGFLGPIIK
80–91	1358,7430	1358,7194	0,0236	AETGDKVYVHLK
92–109	2154,0571	2154,0646	–0,0076	NLASRPYTFHSHGITYYK
Идентифицированные фрагменты трипсинолиза 5 кДа-пептида ЦП				
929–938	1565,7346	1565,7209	0,0137	VNKDDEEFIESNK
939–945	797,3593	797,3966	–0,0373	MHAINGR
990–1012	2668,2472	2668,2519	–0,0046	GVYSSDVFDIFPGTYQTLEMFR

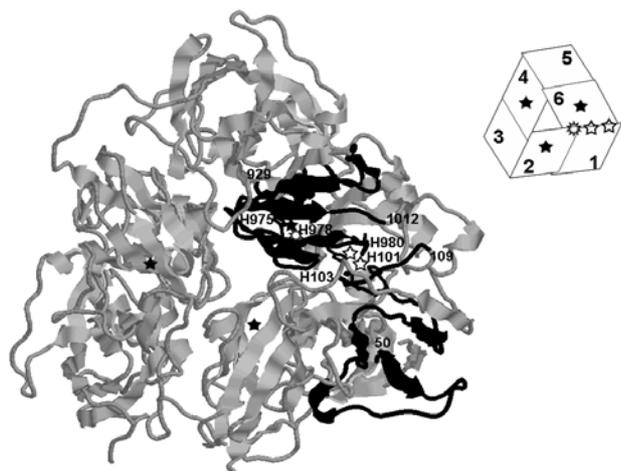


Рис. 3. Локализация участков 50–109 и 929–1012 (выделены черным цветом) в молекуле ЦП. Черные звездочки – ионы меди I типа, 10-конечная звездочка – ион меди II типа, белые звездочки – ионы меди III типа, в верхнем правом углу схема разделения ЦП на 6 доменов с расположением 6 ионов меди [22]

Взаимодействие ЛФ и МПО с ЦП, вероятно, является частью регуляторного механизма, направленного или на нейтрализацию потенциально токсичных для организма белков нейтрофильных гранул в случае их попадания в кровоток, или на модуляцию их биологической актив-

ности. Не исключено также, что в очаге воспаления образование данных комплексов и последствия этого взаимодействия приведут к нейтрализации последствий окислительного взрыва нейтрофилов либо к образованию производных ЦП, обладающих прооксидантной активностью. То, что данные взаимодействия не являются видоспецифичными, говорит в пользу их консервативности и необходимости сохранения их функций на протяжении эволюции.

Можно сделать следующие предположения относительно функций открытых ранее комплексов. Так, логично предположить участие комплекса ЦП–ЛФ в метаболизме железа. Образование же тройного комплекса ЦП–ЛФ–МПО, вероятно, может быть объяснено синергизмом антимикробных функций ЛФ и МПО. То, что ЦП способствует встраиванию окисленного железа в ЛФ, также позволяет делать предположения об участии тройного комплекса в защитных реакциях организма.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 06-04-48602, 05-04-48765). Выражаем благодарность профессору В.Н. Кокрякову (ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН, г. Санкт-Петербург) за предоставленные материалы, ценные советы и полезное обсуждение результатов, профессору Ю.А. Спесивцеву за помощь в получении клинических материалов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кокряков В.Н. (1999) *Биология антибиотиков животного происхождения*, изд-во Наука, Санкт-Петербург.
2. Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Kawase, K., and Tomita, M. (1992) *Biochim. Biophys. Acta.*, **1121**, 130–136.
3. Lanza, F. (1998) *J. Mol. Med.*, **76**, 676–681.
4. Vassiliev, V., Harris, Z.L., and Zatta, P. (2005) *Brain. Res. Rev.*, **49**, 633–640.
5. Segelmark, M., Persson, B., Hellmark, T., and Wieslander, J. (1997) *Clin. Exp. Immunol.*, **108**, 167–174.
6. Park, Y.S., Suzuki, K., Mumby, S., Taniguchi, N., and Gutteridge, J.M.C. (2000) *Free Rad. Res.*, **33**, 261–265.
7. 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. (2000) *Arch. Biochem. Biophys.*, **374**, 222–228.
8. 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.
9. Соколов А.В., Пулина М.О., Захарова Е.Т., Шавловский М.М., Васильев В.Б. (2005) *Биохимия*, **70**, 1231–1236.
10. 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.
11. Соколов А.В., Захарова Е.Т., Шавловский М.М., Васильев В.Б. (2005) *Биоорг. химия*, **31**, 269–279.
12. Musci, G., Bonaccorsi, di Patti, M.C., Fagiolo, U., and Calabrese, L. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 13388–13395.
13. Reszka, K.J., McCormick, M.L., and Britigan, B.E. (2001) *Biochemistry*, **40**, 15349–15361.
14. Harrison, J.E., Pabalan, S., and Schultz, J. (1977) *Biochim. Biophys. Acta*, **493**, 247–259.
15. Noyer, M., Dwulet, F.E., Hao, Y.L., and Putnam, F.W. (1980) *Anal. Biochem*, **102**, 450–458.
16. Masson, P.L. (1970) in *La Lactoferrine. Proteine des Secretions Externes et des Leucocytes Neutrophiles*, (Arscia, S.A., ed.), Brussels.
17. Laemmli, U.K. (1970) *Nature*, **227**, 680–686.
18. Davis, V.J. (1964) *Ann. NY Acad. Sci.*, **121**, 404–427.
19. Owen, C.A., and Smith, H. (1961) *Clin. Chim. Acta*, **6**, 441–444.
20. Захарова Е.Т., Васильев В.Б., Горбунова В.Б., Шавловский М.М. (1983) *Биохимия*, **48**, 1709–1720.
21. Laurell, C.B. (1967) in *Protides of the Biological Fluids*, (Peeters, H., ed.) Elsevier, Amsterdam, 499–502.

22. Zaitseva, I., Zaitsev, V., Card, G., Moshkov, K., Bax, B., Ralph, A., and Lindley, P. (1996) *J. Biol. Inorg. Chem.*, **1**, 15–23.
23. Griffin, S.V., Chapman, P.T., Lianos, E.A., and Lockwood, C.M. (1999) *Kidney Internation.*, **55**, 917–925.
24. Васильев М.Ю., Андреев Г.И. (1985) *Эксп. онкол.*, **7**, 56–60.
25. Nakamuta, M., Ohashi, M., Tanabe, Y., Hiroshige, K., and Nawata, H. (1993) *Hepatology*, **18**, 1377–1383.
26. Tams, J.W., Johnsen, A.H., and Fahrenkrug, J. (1999) *Biochem. J.*, **341**, 271–276.
27. Пулина М.О. (2004) *Образование комплекса при взаимодействии церулоплазмينا и лактоферрина*. Дисс. канд. биол. наук, НИИЭМ РАМН, Санкт-Петербург.

INTERACTION OF CERULOPLASMIN, LACTOFERRIN AND MYELOPEROXIDASE

A. V. Sokolov¹, M. O. Pulina¹, K. V. Ageeva¹, M. I. Ayrapetov¹,
M. N. Berlov¹, G. N. Volgin², A. G. Markov², P. K. Yablonsky²,
N. I. Kolodkin³, E. T. Zakharova¹, V. B. Vasilyev¹

¹ *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*

² *Medical Faculty, Saint-Petersburg State University, 21st linya V.O., 8A, Saint-Petersburg 199106, Russia; fax: (812) 774-9367*

³ *State Research Institute for Highly Pure Biopreparations, ul. Pudozhskaya 7, Saint-Petersburg 197110, Russia; fax: (812) 235-5504*

Received November 24, 2006

Revision received December 12, 2006

When lactoferrin (LF) and myeloperoxidase (MPO) are added to ceruloplasmin (CP), a triple complex CP–LF–MPO is formed. The complex is formed under physiological conditions, but also in the course of gel electrophoresis. Polyclonal antibodies both to LF and MPO displace the respective proteins from the CP–LF–MPO complex. Similar replacement is performed by a PACAP38 fragment (amino acids 29–38) and protamine that bind to CP. Interaction of LF and MPO with CP-Sepharose is blocked at ionic strength above 0.3 M NaCl and at pH below 4.1 (LF) and 3.9 (MPO). Two peptides (amino acids 50–109 and 929–1012) were isolated by affinity chromatography from a preparation of CP after its spontaneous proteolytic cleavage. These peptides can displace CP from its complexes with LF and MPO. Both human and canine MPO can form a complex when mixed with CP from seven mammalian species. Upon intravenous injection of human MPO into rats, the “rat CP–human MPO” complex could be detected in plasma. Patients with inflammation were examined and CP–LF, CP–MPO, and CP–LF–MPO complexes were revealed in 80 samples of blood serum and in 9 exudates from purulent foci. These complexes were also found in 45 samples of serum and pleural fluid obtained from patients with pleuritis of various etiologies.

Key words: ceruloplasmin, lactoferrin, myeloperoxidase, protein–protein interactions