

УДК 577.122.7

©Коллектив авторов

## ЛИГАНДЫ $\alpha_2$ -МАКРОГЛОБУЛИНА И МЕХАНИЗМЫ ИХ БИОТРАНСПОРТА

*В.Н. Зорина\*, Н.А. Зорин, О.Ф. Лыкова, Т.В. Коньшева, Р.М. Зорина*

ГОУ ДПО Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей  
Росздрава, 654005, г.Новокузнецк, Кемеровская обл., пр. Строителей, д. 5,  
НГИУВ, ЦНИЛ; тел.: (3843)45-84-18, (3843)36-97-54; факс: (3843)45-42-19;  
эл. почта: zorin@giduv.nkz.ru

Альфа-2-макроглобулин (МГ) – высокомолекулярный гликопротеин, обладающий широким спектром регуляторных функций. Ранее показано, что ковалентное связывание МГ с протеиназами приводит к конформационной трансформации МГ и позволяет ему дополнительно транспортировать некоторые виды цитокинов, присоединяемых при помощи нековалентных взаимодействий. Результаты нашей работы продемонстрировали, что спектр белков, способных дополнительно связываться с трансформированным МГ, достаточно широк и включает в себя 3 класса иммуноглобулинов, альбумин, оба типа липопротеинов, плазмин, некоторые цитокины и даже ассоциированный с беременностью альфа-2-гликопротеин (структурный гомолог МГ). Основными лигандами являются альбумин, IgG, плазмин и, в меньшей степени, липопротеины. Взаимодействие нативного МГ как с кислыми, так и со слабощелочными протеиназами приводит к нейтрализации суммарного заряда образуемого комплекса при рН, характерной для внутренних сред организма, и при добавлении LRP-белка (рецепторный белок липопротеинов низкой плотности, low density lipoprotein related protein) количество электронейтральных комплексов при рН 7,4 возрастает. Мы считаем, что подобный механизм позволяет трансформированному МГ (возможно, в комплексе с другими эффекторными белками) сначала быстро адсорбироваться на поверхности клеток, а затем, после связывания с LRP и повторной нейтрализации суммарного заряда при физиологической рН, “проваливаться” внутрь клеточной мембраны и реализовывать свои регуляторные функции.

**Ключевые слова:**  $\alpha_2$ -макроглобулин, ЛРП, биотранспорт.

**ВВЕДЕНИЕ.** Белки семейства макроглобулинов -  $\alpha_2$ -макроглобулин (МГ), ассоциированный с беременностью  $\alpha_2$ -гликопротеин (АБГ) и ассоциированный с беременностью протеин-А (РАРР-А) являются универсальными регуляторами межклеточных взаимодействий и управляют многими реакциями на молекулярном уровне [1-3, 7]. Они связывают и транспортируют в клетки-мишени многие биологически активные соединения, такие как цитокины, гормоны пептидной природы, ферменты и ряд белков плазмы крови, которые, реализуя свой потенциал, активируют либо угнетают функционирование указанных клеток [4-7]. Комплексы макроглобулинов с лигандами приобретают способность реагировать с рецепторами на поверхности клеток лишь после конформационного уплотнения (трансформации) при реакции с протеиназами или первичными аминами. Основным рецептором трансформированных макроглобулинов является рецепторный белок липопротеинов низкой плотности (LRP), имеющийся не только

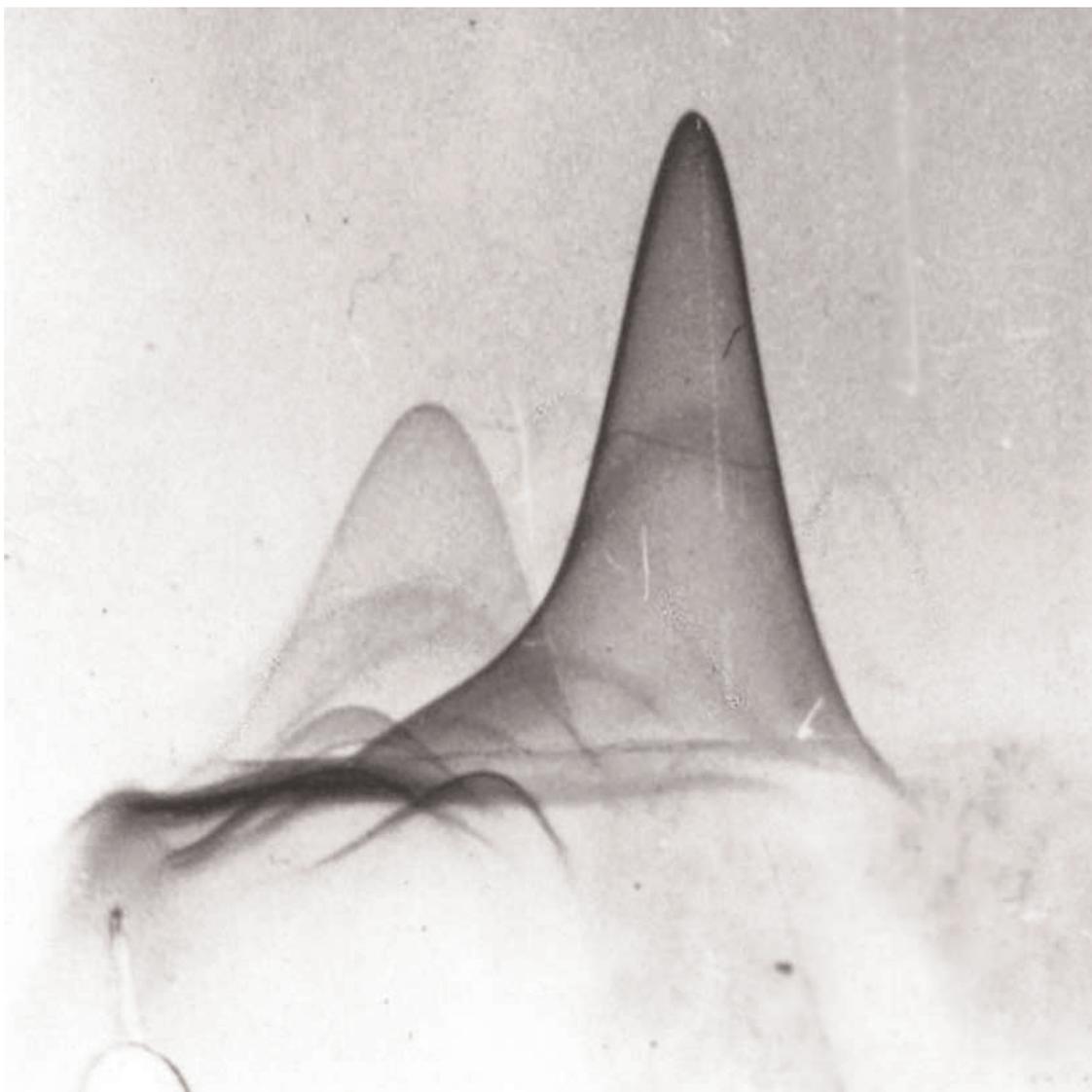
\*Адресат для переписки

на цитоплазматических мембранах большей части клеток, но и на мембранах их внутриклеточных органелл [4, 6-8]. Это позволяет комплексам макроглобулинов с регуляторными лигандами перемещаться внутри клеток и влиять на их функции [6-8]. Между тем, механизмы биотранспорта данных комплексов пока остаются неизвестными, что и послужило предпосылкой настоящей работы.

**МЕТОДИКА.** Источником лигандов МГ была избрана объединённая донорская цитратная плазма крови от мужчин, небеременных и беременных женщин. Смесь лигандов извлекали посредством рециклической (трёхкратной) аффинной хроматографии на колонке цианбромированной агарозы (“Sigma”, США) с иммобилизованным МГ, предварительно трансформированным метиламином. МГ выделяли из плазмы крови мужчин при помощи сочетанной анионообменной и металлхелатной аффинной хроматографии [9], освобождали от минорных примесей иных макроглобулинов негативной аффинной хроматографией на сорбентах с иммобилизованными моноспецифическими антителами против АБГ и PAPP-A, а затем модифицировали метиламином и иммобилизовывали на сорбенте [9]. Неадсорбированные белки плазмы элюировали 0,05 М фосфатным буфером с pH 7,4, а затем градиентом 0-0,5 М хлорида натрия в том же буфере. Целевой продукт элюировали 0,05 М ЭДТА-буфером с pH 7,4 или 0,05 М глицин-HCl буфером с pH 2,8. Элюаты нейтрализовали на картриджах P-6 (“Bio-Rad”, США) и концентрировали на анионообменных картриджах MicroPrep High Q той же фирмы по инструкциям производителя. Спектр лигандов МГ изучали зональным электрофорезом в полиакриламидном геле в неденатурирующих и денатурирующих условиях с помощью аппарата MiniProtean II (“Bio-Rad”), наборов и инструкций указанной фирмы. Идентификацию белков осуществляли при помощи высокочувствительных вариантов перекрестного и ракетного иммуноэлектрофореза [10]. В этих методах использовали моноспецифические антисыворотки против альбумина,  $\alpha_1$ -антитрипсина, антитромбина III,  $\alpha$ -липопротеина,  $\beta$ -липопротеина, гаптоглобина, IgA, IgG, IgM и трансферрина из наборов фирмы “Spinreact” (Испания). Пламиноген получали аффинной хроматографией на лизин-агарозе (“Sigma”),  $\alpha_1$ -антиплазмин – аффинной хроматографией на плазмин-агарозе [11]. Для очистки PAPP-A и АБГ использовали сочетание хроматографии на гепарин-агарозе, анионообменной хроматографии, металлхелатной хроматографии [12]. Для выделения LRP плаценту отмывали от следов крови и гомогенизировали в 0,05 М фосфатном буфере с pH 7,4, содержащем 0,15 М NaCl, 0,1% твина 40 (“Sigma”) и 0,005 М фенолметилсульфонилфлуорида (“Sigma”). Экстракт осветляли центрифугированием и гель-хроматографией на картриджах P-6. Частичную очистку LRP проводили путем хроматографии на сорбенте с иммобилизованным МГ, модифицированным метиламином. Примеси удаляли посредством рециклической гель-хроматографии материала первого пика белка на колонке TSK-Gel HW-60S (“Toyo Soda”, Япония). Свободные от примесей белки использовали для иммунизации кроликов с целью получения моноспецифических антисывороток [12]. Для обнаружения интерлейкина-1 $\beta$ , интерлейкина-6 и фактора некроза опухолей- $\alpha$  использовали твёрдофазный иммуноферментный метод и наборы фирмы “ПроКонтур” (Россия), а для интерферона- $\gamma$  – наборы фирмы “Вектор-Бест” (Россия). Изоэлектрические точки изучаемых белков определяли на основе оборудования, наборов и инструкций фирмы “Bio-Rad”.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Трансформированный МГ связывает достаточно широкий круг белков, входящих в состав плазмы крови (рис. 1). Среди них нам удалось идентифицировать альбумин, оба вида липопротеинов ( $\alpha$ - и  $\beta$ -), иммуноглобулины трех классов, плазмин и все 4 представителя цитокинов. Из состава плазмы крови беременных женщин сродством к трансформированному МГ обладал АБГ, но не PAPP-A. В составе элюатов не были обнаружены серпины ( $\alpha_1$ -антитрипсин,  $\alpha_1$ -антиплазмин и антитромбин III) и ферропротеины

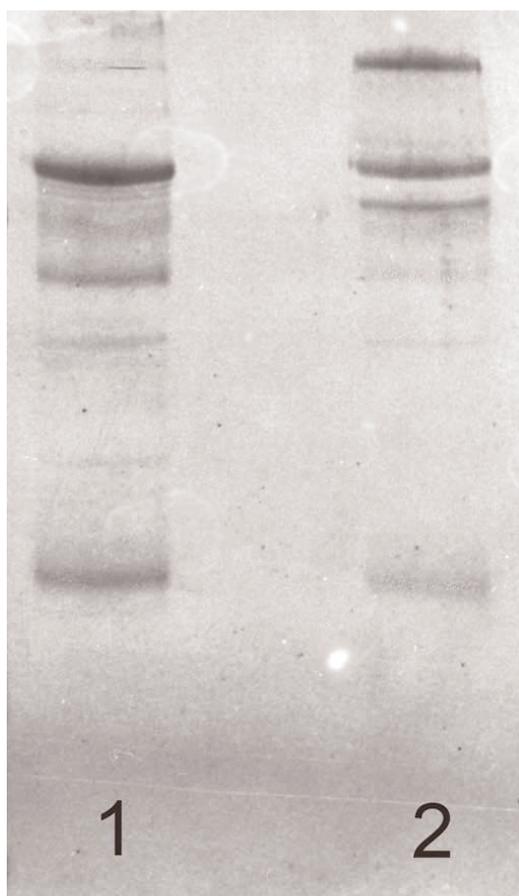
(гаптоглобин и трансферрин). Сам МГ в составе элюатов также не был найден. В составе элюатов преобладали альбумин, липопротеины, IgG и плазмин, а остальные лиганды были представлены в минорных концентрациях. ЭДТА элюировал большую часть альбумина, но в отношении иных лигандов не демонстрировал принципиальных отличий по сравнению с кислым элюентом (рис. 2), поскольку последовательное применение этих буферов солюбилизировало сходное количество каждого из белков.



**Рисунок 1.**

Перекрестный иммуноэлектрофорез лигандов трансформированного  $\alpha_2$ -макроглобулина.

Примечание: анализировались лиганды из плазмы крови беременных женщин, элюированные ЭДТА-буфером. Во втором направлении иммуноэлектрофореза в гель включалась антисыворотка против белков сыворотки крови человека.



**Рисунок 2.**

Электрофорез лигандов трансформированного  $\alpha_2$ -макроглобулина в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия в восстанавливающих условиях.

Примечание: 1 – элюирование 0,05 М ЭДТА-буфером с pH 7,4; 2 – элюирование 0,05 М глицин-HCl буфером с pH 2,8

Проведенное исследование показало, что прикрепление лигандов к трансформированному МГ происходит за счёт нековалентных связей. Можно полагать, что МГ связывает большую часть лигандов гидрофобными центрами связывания, имеющимися на каждой его субъединице [3, 4, 7, 13]. Однако, хелатирующий агент (ЭДТА) освобождает большую часть альбумина, что позволяет предположить связь этого белка с атомами цинка, входящими в состав МГ [2, 4, 7]. Не менее вероятно и то, что иммуноглобулины атакуют МГ как чужеродный антиген, а не пассивно присоединяются к его гидрофобным центрам связывания. “Чужеродность” МГ может возникать, как минимум, по двум причинам. В ходе трансформации МГ возможна демаскировка ранее стерически недоступных участков [6], распознаваемых иммунной системой как чужеродные. Это же свойство может сообщаться “неоантигенными” детерминантами [5], появляющимися при присоединении лигандов. Способность плазмина присоединяться к МГ нековалентно является известным фактом [3, 7, 14], но наши результаты показали, что фермент, присоединенный к гидрофобным центрам связывания МГ, не атакуется серпинами. Даже при краткосрочном хранении он лизирует все компоненты элюатов, что доказывает сохранение его активности. При длительном сохранении такого комплекса в циркуляции возникает вероятность разрушения им всех стерически доступных субстратов. Феномен образования комплексов МГ-липопротеины обнаружен нами впервые. Ранее считалось, что липопротеины могут самостоятельно проникать в клетки после

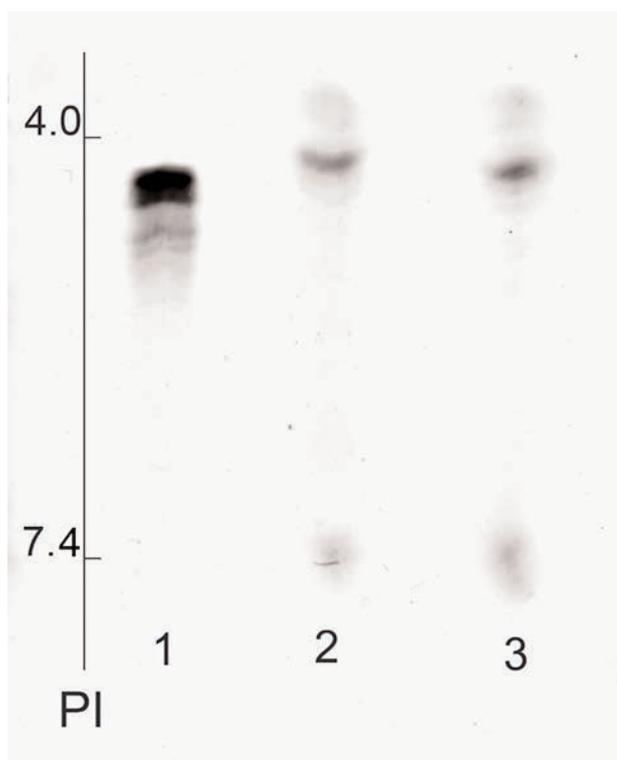
реакции с LRP [15]. Поскольку концентрации липопротеинов и МГ в плазме крови сопоставимы и существенно превосходят концентрации комплексов этих белков, есть все основания считать, что указанные комплексы образуются после трансформации МГ, период полувыведения которого не превышает 1-2 минут [4, 6-8]. Наличие АБГ в числе лигандов МГ также достаточно интересно. Оба белка представляют собой функциональные и структурные аналоги, совпадение аминокислотных последовательностей которых достигает 68% [4, 5, 14]. Скорее всего, их связывание идет не за счёт гидрофобных центров, а обусловлено реакцией с общими лигандами, такими как плазмин. Наличие комплексов МГ с цитокинами доказало ранее гипотетически предполагавшийся факт существования этих комплексов в качестве основного варианта биотранспорта цитокинов [4, 6, 7].

Полученные нами данные убедительно свидетельствуют о наличии многообразия комплексов макроглобулинов с лигандами. При этом многие из них образуются путем присоединения лигандов к гидрофобным центрам связывания циркулирующих макроглобулинов. Образованные комплексы могут находиться в свободной циркуляции до трансформации МГ, вызванной присоединением протеиназ, либо до захвата антителами, атакующими их как чужеродные антигены. В последнем случае утилизация комплексов может идти через рецепторы иммуноглобулинов. Для образования других комплексов необходимым условием является трансформация макроглобулинов при связывании протеиназ [4, 6]. При этом конформация макроглобулинов изменяется [5], и ранее замаскированные гидрофобные центры связывания становятся стерически доступными для связывания соответствующих лигандов. Каждый из макроглобулинов имеет 2-4 гидрофобных центра связывания, а также 2-16 атомов цинка [4, 5, 7]. Это делает теоретически возможным существование сложных надмолекулярных комплексов, состоящих из макроглобулина-носителя, трансформирующего фермента и нескольких несомых лигандов-эффекторов. Поскольку многие лиганды макроглобулинов обладают принципиально важными регуляторными свойствами, можно ожидать, что эти свойства отличны от характеристик монокомплексов макроглобулинов. Во всяком случае, наши результаты показали, что транспортные и регуляторные характеристики макроглобулинов значительно шире, чем это было известно ранее.

Ранее было показано, что трансформированные макроглобулины быстро (период полувыведения 1,5-2 мин) выводятся из циркуляции через LRP [6-8], в то время как нативные молекулы могут находиться в циркуляции в течение длительного времени. Однако, конкретный механизм, позволяющий столь быстро и эффективно удалять макроглобулины из циркуляции, и причина, по которой именно трансформированные макроглобулины обладают наибольшим сродством к универсальному рецептору эндоцитоза, еще не установлены. При помощи изоэлектрического фокусирования нам удалось показать, что трипсин, обладающий исходно кислотными характеристиками, при связывании с нативным (тоже "кислым") МГ образует комплекс с рI 7,4 (рис. 3), что практически не отличается от рН крови. Более того, при взаимодействии нативного МГ с плазмином, обладающим слабощелочными характеристиками, рI образованного комплекса тоже изменяется до 7,4. Таким образом, взаимодействие нативного МГ с протеиназами, вне зависимости от их исходной рI, приводит к смещению рI образованного комплекса до электронейтральных значений при рН внутренних сред организма. Между тем, общеизвестно, что нейтрализация заряда белка, либо комплекса приводит к резкой потере флотирующих характеристик, вплоть до выпадения в осадок. Однако, суммарная электронейтральность комплекса не исключает возможность наличия локального заряда у отдельных его компонентов, обуславливающего возможность связывания с рецепторами. Можно предположить, что взаимодействие нативного МГ с протеиназами, последующее изменение рI комплекса до электронейтрального состояния при рН внутренних сред организма и связанное с этим снижение флотирующей способности приводит к тому, что комплекс МГ с протеиназой быстро адсорбируется на поверхности

## ЛИГАНДЫ $\alpha_2$ -МАКРОГЛОБУЛИНА И ИХ БИОТРАНСПОРТ

ближайших клеток и присоединяется к любому рецептору, способному с ним прореагировать. При этом, именно LRP, вследствие наличия достаточно мощного гидрофобного сайта связывания и широкой распространенности на поверхности практически всех известных типов клеток и их внутренних органелл [4, 6, 8], лучше всего подходит для этих целей. Нам удалось показать, что при изоэлектрическом фокусировании смеси нативного МГ, трипсина и ЛРП, количество комплексов с рI 7,4 значительно выше, чем просто при реакции МГ с ферментом (рис. 3). Данный феномен свидетельствует о том, что трансформируемый МГ активно связывается с ЛРП, и о том, что образующийся сложный комплекс протеиназа-МГ-рецептор тоже электронейтрален при рН внутренних сред организма. По нашему мнению, данный механизм (изменение рI до 7,4 при связывании сначала с протеиназой, а затем с рецептором) является универсальным механизмом трансмембранного переноса трансформированного МГ и дополнительно транспортируемых им биологически активных соединений – при нейтрализации общего заряда комплекса эффектор-МГ-протеиназа-рецептор, столь крупное по молекулярной массе образование, вероятнее всего, “проваливается” внутрь клетки, где и реализует свои регуляторные свойства. В лизосомах его ждет полное расщепление, тогда как в дендритных клетках – ограниченный лизис и презентация антигенной информации [1, 5]. В ядре клетки доставленные эффекторы могут, воздействуя на геном, стимулировать или ингибировать функциональные характеристики клеток-мишеней [7]. Способы высвобождения эффекторов из транспортных комплексов с макроглобулинами пока остаются неизвестными и могут составить предмет последующих исследований.



**Рисунок 3.**

Изоэлектрофокусирование нативного  $\alpha_2$ -макроглобулина (МГ) и его комплексов.

Примечание: рI – Изоэлектрическая точка.

1) препарат нативного МГ

2) препарат МГ + трипсин (трансформированный МГ)

3) препарат трансформированного МГ (МГ+трипсин) + рецепторный белок липопротеинов (LRP).

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Таким образом, нам удалось показать, что МГ способен образовывать сложные комплексы с другими белками различной природы за счет дополнительных (нековалентных) взаимодействий. При этом, конформационное изменение (трансформация) молекулы МГ при ковалентном связывании с протеиназами, равно как и дополнительное связывание трансформированного МГ с LRP (основным рецептором эндоцитоза) приводит к суммарной нейтрализации заряда комплекса при рН, характерной для внутренних сред организма. Данный феномен может служить объяснением как быстрого поглощения трансформированного МГ клетками-мишенями через рецепторы эндоцитоза, так и многообразия функций, реализуемых МГ, а точнее, образованными им мультикомплексами с другими биологически активными лигандами. Мы считаем, что дальнейшее изучение макроглобулинов именно в качестве транспортеров биологически активных соединений может иметь существенное значение для установления молекулярных основ физиологических и патологических процессов в организме.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Armstrong P.B., Quigley J.P.* (1999) *Dev. Comp. Immunol.*, **23**, 375-390.
2. *Зорин Н.А., Зорина В.Н.* (2004) *ЖМЭИ*, №3, 105-112.
3. *Tayade S., Esadeg S., Fang. Y., Croy B.A.* (2005) *Mol. Cell. Endocrinol.*, **245**, 60-66.
4. *Зорин Н.А., Зорина В.Н., Зорина Р.М.* (2006) *ЖЭБФ*, **42**, 92-95.
5. *Petersen C.M.* (1993) *Danish Med. Bull.*, **40**, 409-446.
6. *Birkenmeier G.* (2001) *Mod. Asp. Immunol.*, **2**, 32-36.
7. *Зорин Н.А., Зорина В.Н., Зорина Р.М.* (2006) *Биомед. химия*, **52**, 229-238.
8. *Chiabrando G.A., Vides M.A., Sanchez M.C.* (2002) *Arch. Biochem. Biophys.*, **398**, 73-78.
9. *Зорин Н.А., Зорина В.Н.* (2000) *Гематол. трансфузиол.*, №5, 20-21.
10. *Зорин Н.А.* (1983) *Лаб. Дело*, №10, 40-43.
11. *Зорин Н.А., Жабин С.Г.* (1992) *Гематол. трансфузиол.*, №№9-10, 42-43.
12. *Zorin N.A., Zhabin S.G., Semenov N.N.* (1995) *Clin. Chim. Acta*, **239**, 47-55.
13. *Webb D.J., Roadcap D.W., Dhakenphalkar A* (2000) *Protein Sci.*, **9**, 1986-1992.
14. *Sand O., Folkersen J., Westergaard J.C., Sottrup-Jensen L.* (1985) *J. Biol. Chem.*, **260**, 15723-15735.
15. *Burger D., Dayer J.M.* (2002) *Autoimmun. Rev.*, **1**, 111-117.

Поступила: 21. 03. 2006.

ALPHA-2-MACROGLOBULIN LIGANDS AND THEIR BIOTRANSPORT MECHANISMS

*V.N. Zorina, N.A. Zorin, O.F. Lykova, T.V. Konysheva, R.M. Zorina*

Postgraduate Medical Training Institute, Central Research Laboratory, Stroiteley pr., 5, Novokuznetsk, 654005 Russia

Alpha-2-macroglobulin (MG) is a high-molecular weight glycoprotein that possesses a wide range of regulatory functions. Earlier it has been shown that covalent binding of MG with proteinases results in conformational transformation of MG, which enables MG to transport some additional types of cytokines linked by noncovalent interactions. The results of our study have demonstrated that the range of proteins, with the ability for additional binding with transformed MG is variable and comprises IgG, IgA, IgM, albumin, both types of lipoprotein chain, plasmin, some cytokines and even pregnancy associated alpha-2-glycoprotein (structured MG homolog). The major ligands are found to be albumin, IgG, plasmin and, to a lesser degree, lipoproteins. MG interactions with both acidic and low-alkaline proteinases contribute to neutralization of total charge of the formed complex at neutral pH, typical for internal fluids of the organism, and that the addition of low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) increases the amount of electroneutral complexes at pH 7.4. We suppose, that this mechanism enables the transformed MG (or may be its complex with other regulatory proteins) to rapidly precipitate rapidly on cellular surface and then, after binding with LRP and secondary neutralization of the total charge under physiological pH conditions, to pass through cellular membrane and to realize its own regulatory functions.

**Key words:** alpha-2-macroglobulin, low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP), biotransport.