

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ И БАКТЕРИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ МОНОМЕРНОЙ И ДИМЕРНОЙ ФОРМ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗЫ

Т.В. Вахрушева^{1*}, А.В. Соколов^{1,2}, В.А. Костевич^{1,2}, В.Б. Васильев^{2,3}, О.М. Панасенко^{1,4}

¹Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины,
119435, Москва, ул. Малая Пироговская, 1а; эл. почта: tvvakhrusheva@yahoo.com

²Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург

³Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

⁴Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва

Проведено сравнительное исследование ферментативной и бактерицидной активности зрелой, димерной миелопероксидазы (МПО) и её мономерной формы. Димерную МПО выделяли из клеток линии HL-60. В качестве мономерной формы использовали геми-МПО, которую получали из димерной МПО восстановлением дисульфидной связи, соединяющей протомеры в димер. Оценивали оба вида ферментативной активности, свойственных МПО (пероксидазную и галогенирующую), каждую из которых измеряли двумя методами. Бактерицидную активность системы МПО/H₂O₂/Cl⁻ тестировали, используя лабораторный штамм *Escherichia coli* DH5α. Не было выявлено разницы в ферментативной и бактерицидной активности между димерной МПО и геми-МПО. Обе формы фермента не отличались между собой и по устойчивости к HOCl – основному продукту катализируемых МПО реакций. HOCl вызывала дозо-зависимое уменьшение пероксидазной и хлорирующей активности, и это уменьшение происходило одинаковым образом в образцах димерной МПО и геми-МПО. При концентрации димерной МПО и геми-МПО, уравненной по гемму, отмечен несколько больший бактерицидный эффект в случае системы геми-МПО/H₂O₂/Cl⁻ по сравнению с системой димерная МПО/H₂O₂/Cl⁻. Это, скорее всего, обусловлено увеличением вероятности контакта фермента с поверхностью бактерий благодаря тому, что при равной концентрации по гемму количество молекул геми-МПО в два раза больше количества молекул димерной МПО. Методом Вестерн-блоттинга с использованием антител против МПО впервые показано, что HOCl вызывает расщепление димерной молекулы на мономерные субъединицы, по-видимому, в результате окисления дисульфидной связи между ними. Это позволяет предположить, что появление в крови МПО, соответствующей по массе мономеру, связано с повреждением димерной МПО активными формами галогенов, особенно при их избыточной продукции, создающей окислительный/галогенирующий стресс при воспалительных заболеваниях.

Ключевые слова: миелопероксидаза, геми-миелопероксидаза, хлорирующая активность, пероксидазная активность, бактерицидная миелопероксидазная система, окислительный/галогенирующий стресс

DOI: 10.18097/PBMC20186402175

ВВЕДЕНИЕ

Миелопероксидаза (МПО) (донор: H₂O₂ оксидоредуктаза, КФ 1.11.1.7) в организме человека локализуется в основном в нейтрофилах и моноцитах. При активации этих клеток МПО частично секретируется во внеклеточное пространство. Вдобавок к тому, что этот фермент может функционировать как классическая пероксидаза, он обладает галогенирующей активностью, то есть способностью катализировать реакцию между H₂O₂ и галогенидами Cl⁻, Br⁻, I⁻ или псевдогалогенидом SCN⁻, которая приводит к образованию соответствующих гипо(псевдо)галогидных кислот: HOCl, HOBr, HOI, HOSCN. Эти реакционные соединения обладают бактерицидным действием, благодаря чему МПО выполняет важную роль в осуществлении лейкоцитами противомикробной функции.

В нормальных зрелых лейкоцитах МПО присутствует в виде димера (~145 кДа), состоящего из идентичных гем-содержащих протомеров, соединенных дисульфидной связью. МПО кодируется единственным геном, который в норме экспрессируется исключительно в миелоидных клетках, так что во время дифференцировки гранулоцитов в костном мозге только промиелоциты и промиеломоноциты активно синтезируют МПО [1, 2]. В обзоре [3] подробно изложен современный взгляд на биосинтез, процессинг и сортинг МПО. На определенном этапе посттрансляционного процесса формирования зрелой, димерной МПО возникает её мономерный предшественник (проМПО), уже содержащий гем и, соответственно, функционально активный. Его дальнейший путь из эндоплазматического ретикулума идет через аппарат Гольджи в азурофильные гранулы, где происходит димеризация

Принятые сокращения: МПО - миелопероксидаза; проМПО - мономерный предшественник МПО; геми-МПО - мономерная форма МПО, полученная восстановлением дисульфидной связи в нативной димерной МПО; АБТС - 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота); СВ - целестиновый синий В; ТНБ - 5-тио-2-нитробензойная кислота; ДТНБ - 5,5'-дителиобис(2-нитробензойная кислота); КОЕ - колониеобразующие единицы; ЦТАБ - цетилтриметиламмония бромид.

* - адресат для переписки

и тем самым завершается синтез зрелой МПО. Однако, по не понятным пока причинам, часть молекул проМПО конститутивно секретируется из клетки. Аналогичная ситуация наблюдается в культуре клеток HL-60 при индукции их дифференцировки в гранулоцитарном направлении [4]. В качестве указания на существование *in vivo* не полностью процессированной, мономерной МПО приводятся данные об обнаружении в плазме крови здоровых людей МПО с массой, равной примерно половине массы зрелой МПО [5], а также выделение “половинной” МПО из нейтрофилов от больных хронической миелоидной лейкемией [6].

В связи с тем, что синтез МПО не заканчивается мономерной формой, возник вопрос о преимуществах преобладающей в организме димерной формы. Показано, что димерная молекула МПО более термостабильна и конформационно устойчива, чем мономерная [7-9]. Исследования каталитических свойств двух форм МПО выявили только небольшие различия в функционировании мономерной и димерной МПО, и большинство исследователей сходятся во мнении об отсутствии принципиальной разницы между этими формами в отношении и пероксидазной и галогенирующей активностей [8-11].

В наших [12] и других [13] исследованиях показано, что зрелая МПО может инактивироваться продуктами катализируемых этим ферментом реакций, например, HOCl. На наш взгляд, это явление имеет важное значение как механизм саморегуляции фермента, препятствующий возникновению галогенирующего стресса, то есть избыточного образования активных форм галогенов, которые, помимо бактерицидного действия, способны повреждать биомолекулы организма, провоцируя возникновение и осложнение воспалительных заболеваний [14].

В связи с этим целью нашей работы было выяснить, как изменяется активность мономерной МПО под влиянием HOCl. Второй целью было выяснить, зависит ли бактерицидное действие системы МПО/H₂O₂/Cl⁻ от того, находится МПО в димерной или мономерной форме.

МЕТОДИКА

В работе использовали PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM фосфат, pH 7,4), HEPES, NaCl, KI, NaH₂PO₄·2H₂O, ЭДТА, таурин, каталазу из печени быка, дигидрохлорид *o*-дианизидина, диаммониевую соль 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты) (АБТС), 5,5'-дитиобис(2-нитробензойную кислоту) (ДТНБ), гипохлорит натрия (NaOCl), пероксид водорода (30%), целестиновый синий В (СВ), йодацетамид, глутамин, эмбриональную сыворотку телят, среду RPMI-1640, среду LB, сефакрил S-200 HR, гепарин-сефарозу, фенил-сефарозу (все от “Sigma-Aldrich” (США)); 2-меркаптоэтанол, нитроцеллюлозу, Tween-20, белки сухого молока для блоттинга, конъюгат пероксидазы хрена с антителами козла против IgG кролика, полученные от “Bio-Rad” (США).

5-Тио-2-нитробензойную кислоту (ТНБ) получали из ДТНБ в 50 mM Na-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 1 mM ЭДТА [15]. Водный 4 mM раствор СВ фильтровали через поры размером 0,45 мкм и хранили в темноте. Рабочие растворы H₂O₂ готовили в PBS, разбавляя перед употреблением коммерческий раствор. Концентрацию H₂O₂ измеряли по поглощению при 240 нм ($\epsilon_{240} = 43,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [16]). Раствор HOCl готовили перед употреблением, разбавляя коммерческий NaOCl. HOCl (pK_a 7,5 [17]) в водном растворе при нейтральном pH находится в виде смеси молекулярной формы HOCl и аниона OCl⁻. Далее смесь HOCl/OCl⁻ будем обозначать как HOCl. Концентрацию измеряли при pH 12 по поглощению OCl⁻ при 292 нм ($\epsilon_{292} = 350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [17]).

Для измерения поглощения использовали спектрофотометр Cary 50 Bio UV-Visible фирмы “Varian” (Австралия).

В тексте приведены конечные концентрации веществ в образце.

Получение димерной и мономерной МПО

В качестве источника МПО использовали линию клеток HL-60 (промиелоцитарная лейкемия), которые культивировали при 37°C и 100%-ном увлажнении воздуха в роллерных бутылках для суспензионных культур на среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональную сыворотку телят, 2 mM глутамин и 25 mM HEPES-буфер (pH 7,4). Раз в неделю клетки осаждали из среды центрифугированием при 1500 g, осадок ресуспендировали в минимальном объеме свежей среды и 1/5 объема этой среды переносили в роллерную бутылку со свежей средой, а остальные клетки трижды отмывали от среды с помощью PBS и после ресуспендирования в двух объемах 100 mM Na-ацетатного буфера (pH 4,7) замораживали. Димерную МПО выделяли из экстракта замороженных клеток HL-60, полученного в результате лизиса с помощью ультразвука (44 кГц), и очищали с помощью аффинной хроматографии на гепарин-сефарозе, гидрофобной хроматографии на фенил-сефарозе и гель-фильтрации на сефакриле S-200 HR [18]. Этот метод позволяет выделять гомогенный препарат димерной МПО с высокой удельной активностью и характеристикой чистоты $A_{430}/A_{280} > 0,85$.

Мономерную форму МПО получали с помощью обработки димерной МПО (145 мкМ) 2-меркаптоэтанолом (молярное соотношение МПО:2-меркаптоэтанол = 1:4) в течение 30 мин при 37°C в 100 mM Na-карбонатном буфере, pH 9,4. Затем SH-группы блокировали йодацетамидом в течение 30 мин при 4°C (молярное соотношение МПО:йодацетамид = 1:20). Полученный белок концентрировали на специальных ячейках VivaSpin 20 (“Sartorius”, Германия), удерживающих белки с молекулярной массой более 30 кДа, заменяя при этом буфер на 100 mM Na-ацетатный, pH 5,5. Используя гель-фильтрацию на колонке с сефакрилом S-200 HR (114×1,5 см), уравновешенной 100 mM Na-ацетатным буфером (pH 5,5), отделяли следы димера

от мономерной МПО. Во фракциях измеряли A_{430} и A_{280} , а также оценивали молекулярную массу с помощью SDS-электрофореза в ПААГ без инкубации проб в условиях восстановления дисульфидных связей.

Хлорирующая активность МПО

Хлорирующую активность оценивали с помощью методов, основанных на взаимодействии HOCl , продуцированной МПО, с таурином с образованием N-хлорамина таурина.

В одном из методов N-хлорамина таурина определяли по его реакции с ТНБ как описано в [15]. Окисление ТНБ регистрировали по уменьшению поглощения при 412 нм ($\epsilon_{412} = 14150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [19]). Реакционная смесь содержала МПО (10 нМ по гемму), 20-25 мкМ H_2O_2 и 10 мМ таурин в PBS. Для оценки активности было выбрано количество HOCl , продуцированное в первые две минуты ферментативной реакции, когда утилизирована примерно половина H_2O_2 . Реакцию останавливали с помощью каталазы (20 мкг/мл) и добавляли ТНБ (~130 мкМ). Количество HOCl рассчитывали, исходя из разницы между величиной поглощения при 412 нм в испытуемом образце и образце сравнения, который содержал те же компоненты за исключением H_2O_2 .

В другом методе N-хлорамина таурина определяли по его реакции с СВ [20]. Окисление СВ регистрировали, записывая кинетику уменьшения поглощения при 650 нм. Реакционная среда содержала МПО (10 нМ по гемму), 50 мкМ H_2O_2 , 100 мМ NaCl , 500 мкМ таурин, 200 мкМ СВ и 5 мкМ KI (в качестве катализатора реакции между СВ и N-хлорамином таурина) в 100 мМ Na-ацетатном буфере, pH 5,5. Начальную (в интервале 0-20 с) скорость уменьшения поглощения СВ считали скоростью ферментативной реакции.

Пероксидазная активность МПО

В качестве субстратов для пероксидазной активности МПО использовали *o*-дианизидин и АБТС. За образованием окисленных субстратов наблюдали по возрастанию поглощения, регистрируя кинетические кривые при длине волны 460 нм и 414 нм в случае *o*-дианизидина и АБТС, соответственно. Наклон прямолинейного участка в первые 10 с кинетической кривой служил мерой скорости реакции.

При использовании *o*-дианизидина реакционная смесь содержала МПО (10 нМ по гемму), 380 мкМ *o*-дианизидин и 50 мкМ H_2O_2 в 100 мМ Na-фосфатном буфере, pH 6,2 [21], а при использовании АБТС – МПО (10 нМ по гемму), 800 мкМ АБТС и 80 мкМ H_2O_2 в 100 мМ Na-ацетатном буфере, pH 5,5 [22].

Вестерн-блоттинг

Пробы МПО (1 мкг белка на дорожке) до и после инкубации с HOCl (при разном мольном соотношении гем: HOCl в 100 мМ Na-ацетатном буфере (pH 5,5) в течение 30 мин при комнатной температуре) подвергали SDS-электрофорезу в ПААГ без кипячения проб и обработки 2-меркаптоэтанолом, проводили

полусухой перенос на нитроцеллюлозную мембрану, а затем Вестерн-блоттинг с антителами против МПО (антитела кролика против МПО в разведении 1:1000 и конъюгат пероксидазы хрена с антителами козла против IgG кролика в разведении 1:5000 в 3%-ном растворе сухого молока в PBS с 0,05% Tween-20). Окрашивание зон на мембране осуществляли с помощью 4-хлор-нафтола и H_2O_2 [23]. Получение антител кроликов против МПО подробно описано в работе [21].

Бактерицидная активность системы МПО/ H_2O_2 / Cl^-

Жидкую культуру *Escherichia coli* (штамм DH5 α , “Invitrogen”, США) выращивали в аэробных условиях в питательной среде LB в течение ночи при 37°C на качалке (150 об/мин). Клетки тщательно отмывали в PBS. Рабочую бактериальную суспензию в PBS готовили так, чтобы в конечном объеме образца после внесения в него всех компонентов оптическая плотность при 550 нм была равной 0,35. К бактериям добавляли МПО (10 нМ по гемму) и спустя 5 мин 20-25 мкМ H_2O_2 (или PBS в контрольные образцы); образцы инкубировали в течение 40 мин при 37°C. Затем производили серийное разбавление в PBS и высевали бактерии на агаризованную среду LB. Через 20 ч инкубации при 37°C подсчитывали колониеобразующие единицы (КОЕ). Выживаемость бактерий в образце клеток с полной системой МПО/ H_2O_2 / Cl^- выражали как количество КОЕ в % по отношению к контрольному образцу, содержащему все те же компоненты за исключением H_2O_2 .

Статистическая обработка результатов

Результаты представлены как средние значения \pm стандартные отклонения. Достоверность различий средних величин рассчитывали с применением *t*-критерия Стьюдента, считая различия достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Для обработки результатов использовали пакет программ Statistics 6.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Аналогом природной мономерной формы МПО может служить молекула, представляющая собой половину димера, полученная *in vitro* из зрелой МПО путём восстановления дисульфидной связи [9, 24]. Такая мономерная форма МПО была названа геми-МПО (от греч. *hemi-*, что означает *полу-*) [24]. Получение геми-МПО из димерной молекулы МПО путём восстановительного алкилирования дисульфидной связи между протомерами было впервые осуществлено в работе [24]. Методика включает два этапа: использование восстанавливающего агента и затем йодацетамида для алкилирования образовавшихся сульфгидрильных групп в неденатурирующих условиях. Состоятельность методики доказана в работах [9, 24], в которых получаемый таким образом продукт был охарактеризован с помощью различных методов (гель-фильтрация, методы скоростной седиментации и седиментационного равновесия, нативный и SDS-электрофорез в ПААГ и др.) и однозначно представлял собой протомер

СРАВНЕНИЕ СВОЙСТВ МОНОМЕРНОЙ И ДИМЕРНОЙ ФОРМ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗЫ

димерной МПО. В нашей работе для получения геми-МПО мы основывались на упомянутом выше подходе, внося не принципиальные модификации, касающиеся выбора восстанавливающего агента (2-меркаптоэтанол вместо дитиотреитола) и состава буферного раствора.

Работа выполнена на зрелой МПО (из клеток HL-60) и полученной из неё геми-МПО. Данные гель-фильтрации и электрофореза, подтверждающие положительный результат получения геми-МПО, приведены на рисунке 1. Видно, что фракции 4-7, которые были использованы для дальнейшей работы, представляют собой гомогенный препарат белка с молекулярной массой (75 кДа) в два раза меньшей, чем у димерной МПО (145 кДа), и с характеристикой чистоты $RZ = A_{430}/A_{280}$ не менее чем 0,85.

Мы оценивали оба вида каталитической активности, свойственной МПО (пероксидазную и галогенирующую), каждую из которых измеряли

двумя независимыми методами. При проведении этих и других экспериментов концентрацию МПО и геми-МПО уравнивали по гемму. Результаты не выявили различий в каталитической активности между димерной МПО и геми-МПО (таблица), что согласуется с данными других исследователей [8-10].

Для выяснения влияния HOCl на каталитическую активность димерной МПО и геми-МПО мы инкубировали фермент (0,5 мкМ по гемму) с возрастающими концентрациями HOCl в 100 мМ Na-ацетатном буфере (pH 5,5) при комнатной температуре в течение 30 мин. После инкубации измеряли хлорирующую и пероксидазную активности. Результаты в виде зависимости активности от мольного соотношения HOCl :гем представлены на рисунке 2. Видно, что и пероксидазная, и хлорирующая активность при увеличении концентрации HOCl уменьшались вплоть до полного

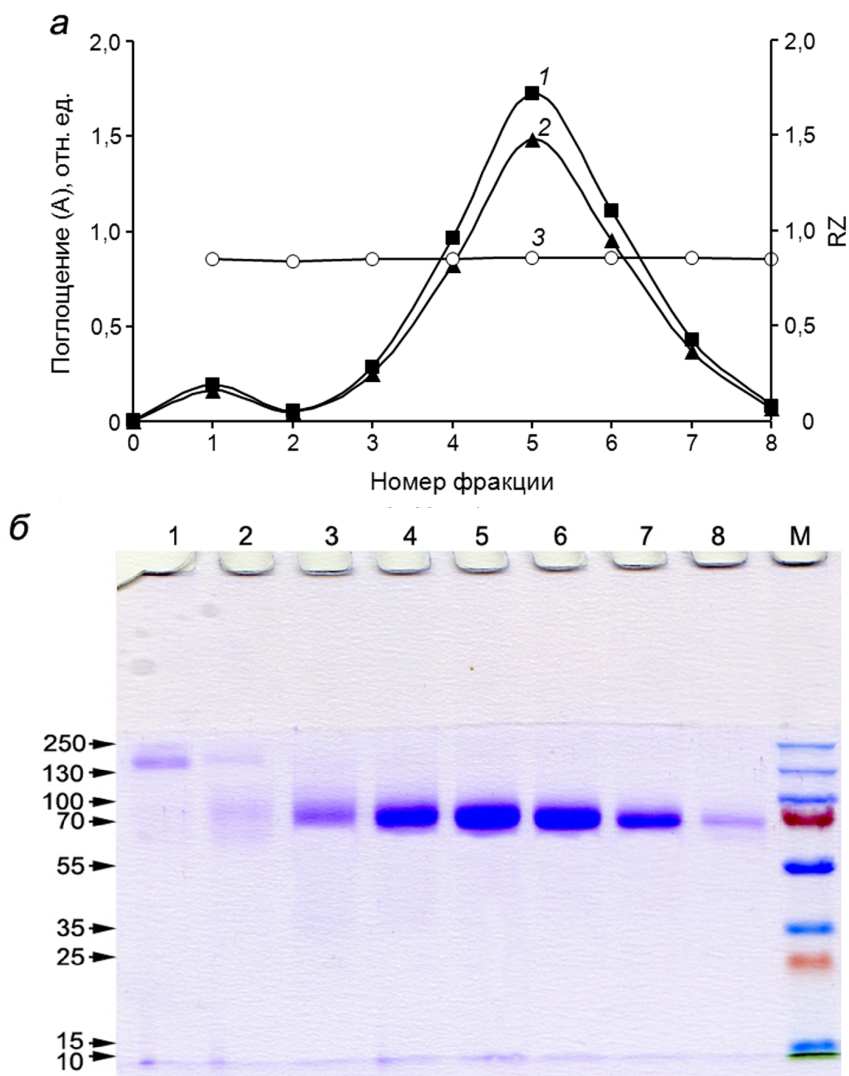


Рисунок 1. (а) Профиль гель-фильтрации (на колонке с сефакрилом S-200 HR) МПО после обработки димерной МПО 2-меркаптоэтанолом и йодацетамидом с целью получения геми-МПО. 1 - поглощение при 280 нм (■); 2 - поглощение при 430 нм (▲); 3 - характеристика чистоты $RZ = A_{430}/A_{280}$ (○). Левый пик - выход остатков димерной МПО; правый пик - выход геми-МПО. (б) Электрофоретический анализ фракций гель-фильтрации. Результаты SDS-электрофореза в ПААГ без кипячения и обработки проб 2-меркаптоэтанолом. М - маркер молекулярной массы, стрелками указаны положения маркеров и значения их молекулярной массы (кДа).

Таблица. Пероксидазная и галогенирующая (хлорирующая) активности димерной МПО и геми-МПО

	Параметр для оценки ферментативной активности	Димерная МПО	Геми-МПО
Пероксидазная активность	*Начальная скорость окисления АБТС, $\Delta A_{414}/\text{мин}$	$0,097 \pm 0,001$	$0,096 \pm 0,002$
	*Начальная скорость окисления <i>o</i> -дианизидина, $\Delta A_{460}/\text{мин}$	$0,83 \pm 0,08$	$0,85 \pm 0,05$
Хлорирующая активность	**Начальная скорость продукции HOCl, $\Delta A_{650}/\text{мин}$	$0,108 \pm 0,005$	$0,112 \pm 0,005$
	HOCl (мкМ), продуцированная за две первые минуты ферментативной реакции	$13,2 \pm 0,6$	$13,4 \pm 0,4$

Примечание: * - скорости окисления АБТС и *o*-дианизидина оценивали по увеличению поглощения ΔA в единицу времени при длинах волн, соответствующих окисленным продуктам этих соединений; ** - скорость продукции HOCl оценивали по уменьшению поглощения СВ при его окислении вследствие реакции с N-хлорамином таурина. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение для пяти экспериментов.

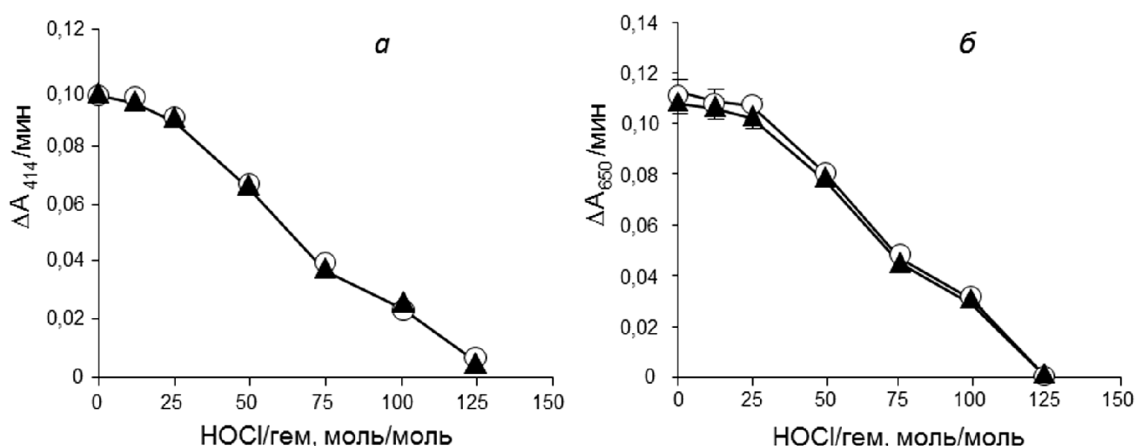


Рисунок 2. Зависимость пероксидазной (а) и хлорирующей (б) активности димерной МПО (▲) и геми-МПО (●) после их инкубации в присутствии HOCl от мольного соотношения HOCl:гем. Результаты выражены как средние значения и их стандартные отклонения для трех экспериментов. Величины стандартного отклонения на графиках не видны, так как их размер не превышает размера маркеров.

исчезновения при мольном соотношении HOCl:гем = 125, и это уменьшение происходило одинаковым образом в образцах геми-МПО и димерной МПО.

При исследовании влияния HOCl на димерную МПО следовало иметь в виду, что мишенью для HOCl среди прочего является дисульфидная связь. Константа скорости реакции HOCl с ней в белках имеет величину порядка 10^5 - 10^7 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [25]. Мы предположили, что под действием HOCl может произойти окислительная деструкция дисульфидной связи между протомерами МПО, что приведет к образованию мономерных молекул МПО. Для проверки этого предположения мы, проинкубировав димерную МПО с разными концентрациями HOCl, провели Вестерн-блоттинг с использованием антител к МПО. Полученные данные показаны на рисунке 3. Видно, что продукт, реагирующий с антителом против МПО и имеющий половинную массу (~75 кДа), появлялся уже при соотношении HOCl:гем = 4 моль/моль, и его количество возрастало с увеличением концентрации HOCl, а количество исходных, димерных молекул при этом уменьшалось (рис. 3). Это говорит о разрыве дисульфидной связи между мономерными субъединицами, вероятнее всего, в результате её реакции с HOCl. Как видно из рисунка 3, после добавления

к димерной МПО 12,5-кратного мольного избытка HOCl (относительно гема) в растворе присутствовали примерно в равном количестве димерные и мономерные молекулы. Каталитическая активность в этой смеси мономерных и димерных молекул оказалась такой же, как в случае геми-МПО при соответствующей концентрации HOCl (рис. 2). Это можно трактовать как отсутствие разницы в эффекте HOCl на активность мономерной и димерной форм МПО. В растворе МПО, которая исходно была димерной, после инкубации с HOCl при соотношении HOCl:гем = 50 моль/моль преобладали мономерные молекулы (рис. 3). Этот раствор и соответствующий раствор геми-МПО показали одинаковую каталитическую активность, что наблюдалось и при более высоких значениях мольного соотношения HOCl:гем (рис. 2). Такой результат представляется вполне закономерным, так как после обработки димерной МПО высокими концентрациями HOCl сравниваемые растворы димерной МПО и геми-МПО становились по сути одинаковыми, состоящими из мономерных молекул.

Наши данные противоречат результатам эксперимента по измерению хлорирующей активности димерной МПО и геми-МПО после инкубации с HOCl в работе [8]. В этой работе, например, 50-кратный мольный избыток HOCl (по отношению к гему)

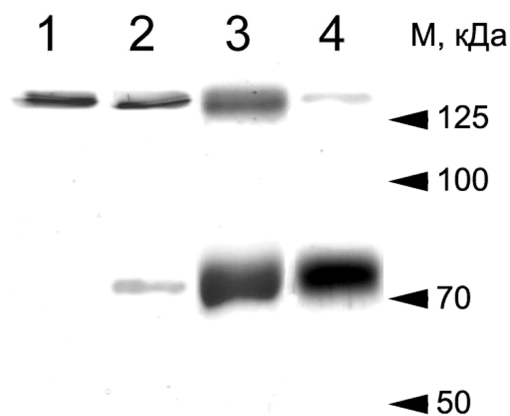


Рисунок 3. Данные Вестерн-блоттинга с антителами к МПО (антитела кролика против МПО и конъюгат пероксидазы хрена с антителами козла против IgG кролика) после SDS-электрофореза в ПААГ без кипячения и обработки проб 2-меркаптоэтанолом. Анализ выполнен после инкубации димерной МПО с разными концентрациями HOSCl : 1 - без HOSCl ; 2 - HOSCl :гем=4 моль/моль; 3 - HOSCl :гем=12,5 моль/моль; 4 - HOSCl :гем=50 моль/моль.

вызывал падение хлорирующей активности димерной МПО на 70%, а геми-МПО на 85% по сравнению с нативным ферментом. Авторами [8] сделан вывод, что более высокая стабильность димерной МПО в присутствии HOSCl по сравнению со стабильностью геми-МПО может быть причиной для существования лейкоцитарной МПО в организме в виде димера. Однако наши результаты по измерению ферментативной активности (рис. 1), подкреплённые данными Вестерн-блоттинга (рис. 3), говорят о том, что изменение хлорирующей и пероксидазной активности в ответ на действие HOSCl не зависит от того, является ли исходно МПО димерной или мономерной.

Результаты Вестерн-блоттинга (рис. 3) – это впервые полученные данные, показывающие, что дисульфидная связь между протомерами МПО легко разрывается в присутствии HOSCl . Вполне вероятно, что такое может происходить в организме при окислительном/галогенирующем стрессе, когда имеет место избыточная продукция активных форм кислорода и галогенов и сама молекула МПО становится мишенью для этих соединений, в том числе для HOSCl . Важно отметить, что реакция с антителами против МПО сохранялась у МПО, обработанной HOSCl , то есть большинство антигенных детерминант МПО оставались неповреждёнными даже после воздействия на фермент 50-кратного мольного избытка HOSCl (относительно гема). Таким образом, на основе наших данных можно предположить, что обнаружение в крови молекул МПО с массой, соответствующей мономеру, может объясняться не только клеточной секрецией не полностью процессированной МПО, но и распадом димера МПО на мономеры под действием активных форм галогенов при развитии окислительного/галогенирующего стресса.

Полученные результаты сравнения каталитических свойств димерной МПО и геми-МПО, как нативных, так и после обработки HOSCl , позволяют считать, что связывание протомеров дисульфидным мостиком не играет существенной роли в каталитической активности МПО и мономерные субъединицы в димере функционируют независимо друг от друга.

Антибактериальная функция нейтрофилов неразрывно связана с галогенирующей и, в первую очередь, с хлорирующей активностью МПО. Используя лабораторный штамм *DH5α* кишечной палочки *E. coli*, мы сравнили бактерицидное действие системы $\text{MPO}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{Cl}^-$ в случае димерной МПО со случаем геми-МПО. О бактерицидном эффекте судили по количеству выживших бактерий после инкубации с полной системой $\text{MPO}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{Cl}^-$ в сравнении с количеством жизнеспособных клеток в контрольном образце, проинкубированном с димерной МПО (или геми-МПО) без добавления H_2O_2 , то есть с нефункционирующим ферментом. Димерная МПО, геми-МПО или H_2O_2 по отдельности при выбранных нами экспериментальных условиях не оказывали влияния на бактерии: количество КОЕ в этих образцах было таким же, как в отсутствие этих соединений, и составляло 180-200 млн. КОЕ/мл (рис. 4).

Использование двух разных концентраций H_2O_2 (20 мкМ и 25 мкМ) и колебания в количестве бактерий в исходной суспензии обусловили разную степень бактерицидного эффекта системы $\text{MPO}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{Cl}^-$.

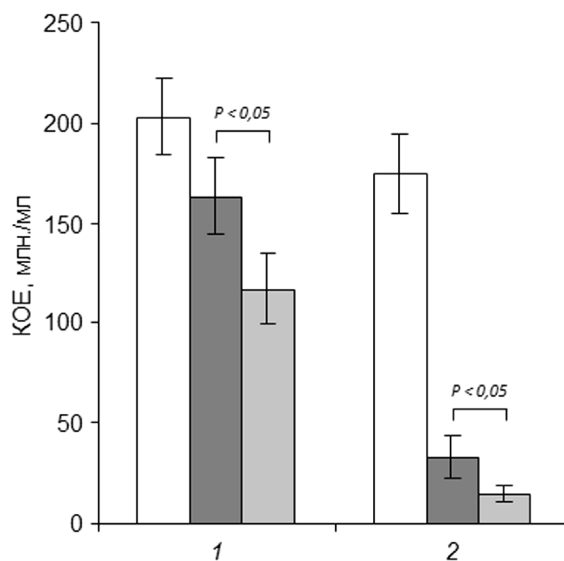


Рисунок 4. Бактерицидный эффект системы $\text{MPO}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{Cl}^-$, выражающийся в уменьшении числа КОЕ после инкубации *E. coli* с этой системой по сравнению с инкубацией контрольных образцов (аналогичные условия, но без добавления H_2O_2 (белые столбики)). Димерная $\text{MPO}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{Cl}^-$ – тёмно-серые столбики; геми- $\text{MPO}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{Cl}^-$ – светло-серые столбики. Концентрация димерной МПО и геми-МПО составляла 10 нМ по гемму. Приведены результаты двух независимых экспериментов с использованием разных концентраций H_2O_2 (1 - 20 мкМ, 2 - 25 мкМ). Представлены средние значения и их стандартные отклонения, полученные на основании подсчёта КОЕ на восьми “параллельных” чашках.

Увеличение концентрации H_2O_2 (и соответственно увеличение продукции $HOCl$) на фоне несколько меньшей концентрации бактерий приводило к большей выраженности этого эффекта, что проиллюстрировано на рисунке 4 на примере двух типичных экспериментов из пяти. При этом во всех экспериментах количество выживших бактерий в случае геми-МПО было достоверно меньше, чем в случае димерной МПО. В работе [11] в похожем эксперименте не обнаружено достоверного различия в бактерицидной активности между димерной МПО и геми-МПО. Вероятно, данное расхождение в результатах обусловлено тем, что при получении клеточного экстракта для выделения МПО традиционно используется детергент цетилтриметиламмония бромид (ЦТАБ), являющийся катионным поверхностно-активным веществом. Его остаточное количество в препарате МПО может повлиять на носящее ионный характер взаимодействие МПО с поверхностью бактериальных клеток и тем самым отразиться на бактерицидности фермента. Мы же в данной работе для лизиса клеток и гранул применили ультразвук, что позволило нам провести эксперименты с использованием препарата МПО, лишённого недостатков, связанных с присутствием ЦТАБ.

Принимая во внимание отсутствие различия в хлорирующей активности между мономерной и димерной формами МПО, можно предположить, что обнаруженная нами достоверная, но небольшая по абсолютной величине разница между бактерицидным эффектом системы, включающей в себя димерную МПО, и системы с геми-МПО вряд ли обусловлена каким-то специфическим свойством геми-МПО. Всего вероятнее, эта разница объясняется тем, что при одинаковой концентрации гема количество молекул геми-МПО в два раза больше, чем молекул димерной МПО, что должно увеличивать вероятность связывания фермента на поверхности бактерий и, следовательно, способствовать эффективности антибактериального действия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Результаты работы говорят о том, что геми-МПО (мономерная форма МПО) не отличается от димерной МПО по каталитической (хлорирующей и пероксидазной) активности. Такой вывод свидетельствует в пользу гипотезы, согласно которой процесс превращения проМПО в зрелую форму не затрагивает активного центра и сохраняет специфические свойства МПО, уже сформировавшиеся на “мономерной” стадии синтеза, и обе составные части димера функционируют независимо друг от друга. $HOCl$ – соединение, являющееся одним из продуктов катализуемых МПО реакций, – вызывает расщепление димерной молекулы МПО на мономерные субъединицы. В результате реакций с $HOCl$ препараты мономерной и димерной МПО одинаковым образом дозо-зависимо теряют ферментативную активность. Обнаруженные закономерности могут иметь место *in vivo* в условиях окислительного/галогенирующего

стресса при воспалении. Антибактериальная активность системы МПО/ H_2O_2 / Cl^- не зависит от того, является ли МПО димером или геми-МПО. Однако при использовании димерной МПО и геми-МПО в одинаковой концентрации по гему бактерицидный эффект был несколько сильнее в случае геми-МПО. Всего вероятнее, это объясняется тем, что в данном случае количество молекул геми-МПО было в два раза больше, чем молекул димерной МПО, что увеличивало вероятность контакта фермента с поверхностью бактерий и тем способствовало эффективности бактерицидного действия.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследования димерной формы МПО и получение антител к ней поддержаны Российским научным фондом (грант 17-75-30064), исследования мономерной формы МПО – Российским фондом фундаментальных исследований (грант 16-54-00038).

ЛИТЕРАТУРА

1. Johnson K.R., Nauseef W.M., Care A., Wheelock M.J., Shane S., Hudson S., Koeffler H.P., Selsted M., Miller C., Rovera G. (1987) *Nucleic Acids Res.*, **15**(5), 2013-2028.
2. Gullberg U., Bengtsson N., Bulow E., Garwicz D., Lindmark A., Olsson I. (1999) *J. Immunol. Methods*, **232**(1-2), 201-210.
3. Hansson M., Olsson I., Nauseef W.M. (2006) *Arch. Biochem. Biophys.*, **445**(2), 214-224.
4. Taylor K.L., Guzman G.S., Burgess C.A., Kinkade J.M. Jr. (1990) *Biochemistry*, **29**(6), 1533-1539.
5. Olsen R.L., Steingen T.K., Holm T., Little C. (1986) *Biochem. J.*, **237**(2), 559-565.
6. Svensson B.E., Domeij K., Lindvall S., Rydell G. (1987) *Biochem. J.*, **242**(3), 673-680.
7. Banerjee S., Stamper J., Furtmüller P.G., Obinger C. (2011) *Biochim. Biophys. Acta*, **1814**(2), 375-387.
8. Zuurbier K.W., van den Berg J.D., Van Gelder B.F., Muijsers A.O. (1992) *Eur. J. Biochem.*, **205**(2), 737-742.
9. Taylor K.L., Guzman G.S., Pohl J., Kinkade J.M. Jr. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**(26), 15938-15946.
10. Suzuki K., Yamada M., Akashi K., Fujikura T. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.*, **245**(1), 167-173.
11. Andrews P.C., Parnes C., Krinsky N.I. (1984) *Arch. Biochem. Biophys.*, **228**(2), 439-442.
12. Панасенко О.М., Вахрушева Т.В., Григорьева Д.В., Горудко И.В., Соколов А.В., Костевич В.А., Черенкевич С.Н. (2015) Модификация миелопероксидазы в условиях, моделирующих окислительный/галогенирующий стресс. В сб. “Свободные радикалы в химии и жизни”. Сборник тезисов докладов Международной конф. Минск, 25-26 июня, 2015 г. Изд. центр БГУ. Минск, 27-28. ISBN: 978-985-553-292-8.
13. Maitra D., Shaeib F., Abdulhamid I., Abdulridha R.V., Saed G.M., Diamond M.P., Pennathur S., Abu-Soud H.M. (2013) *Free Radic. Biol. Med.*, **63**, 90-98.
14. Панасенко О.М., Горудко И.В., Соколов А.В. (2013) Успехи биологической химии, **53**, 195-244.
15. Kettle A.J., Winterbourn C.C. (1994) *Methods Enzymol.*, **233**, 502-512.

16. Beers R.F., Sizer I.W. (1952) J. Biol. Chem., **195**(1), 133-140.
17. Morris J.C. (1966) J. Phys. Chem., **70**(12), 3798-3805.
18. Григорьева Д.В., Горудко И.В., Соколов А.В., Костевич В.А., Васильев В.Б., Черенкевич С.Н., Панасенко О.М. (2016) Бюлл. эксперим. биол. мед., **161**(4), 483-488.
19. Eyer P., Worek F., Kiderlen D., Sinko G., Stuglin A., Simeon-Rudolf V., Reiner E. (2003) Anal. Biochem., **312**(2), 224-227.
20. Sokolov A.V., Kostevich V.A., Kozlov S.O., Donskyi I.S., Vlasova I.I., Rudenko A.O., Zakharova E.T., Vasilyev V.B., Panasenko O.M. (2015) Free Radic. Res., **49**(6), 777-789.
21. Горудко И.В., Черкалина О.С., Соколов А.В., Пулина М.О., Захарова Е.Т., Васильев С.Н., Черенкевич С.Н., Панасенко О.М. (2009) Биооргани. химия, **35**(5), 629-639.
22. Sokolov A.V., Ageeva K.V., Pulina M.O., Cherkalina O.S., Zakharova E.T., Vasilyev V.B., Samygina V.R., Vlasova I.I., Panasenko O.M. (2008) Free Radic. Res., **42**(11-12), 989-998.
23. Gorudko I.V., Sokolov A.V., Shamova E.V., Grigorieva D.V., Mironova E.V., Kudryavtsev I.V., Gusev S.A., Gusev A.A., Chekanov A.V., Vasilyev V.B., Cherenkevich S.N., Panasenko O.M., Timoshenko A.V. (2016) Arch. Biochem. Biophys., **591**, 87-97.
24. Andrews P.C., Krinsky N.I. (1981) J. Biol. Chem., **256**(9), 4211-4218.
25. Karimi M., Ignasiak M.T., Chan B., Croft A.K., Rasdom L., Schiesser C.H., Pattison D.I., Davies M.J. (2016) Sci. Rep., **6**, 38572.

Поступила: 05. 12. 2017.
Принята к печати: 09. 02. 2018.

ENZYMATIC AND BACTERICIDAL ACTIVITY OF MONOMERIC AND DIMERIC FORMS OF MYELOPEROXIDASE

T.V. Vakhrusheva¹, A.V. Sokolov^{1,2}, V.A. Kostevich^{1,2}, V.B. Vasilyev^{2,3}, O.M. Panasenko^{1,4}

¹Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine,
1a Malaya Pirogovskaya str. Moscow, 119435 Russia; e-mail: tvvakhrusheva@yahoo.com

²Institute of Experimental Medicine, Saint-Petersburg, Russia

³Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia

⁴Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

This study was carried out to compare the enzymatic and bactericidal activity of mature, dimeric myeloperoxidase (MPO) and its monomeric form. Dimeric MPO was isolated from HL-60 cells. Hemi-MPO obtained from dimeric MPO by reductive cleavage of a disulfide bond between protomeric subunits was used as the monomeric form. Both peroxidase and halogenating (chlorinating) activities of MPO were assayed, each of them by two methods. Bactericidal activity of the MPO/H₂O₂/Cl⁻ system was tested using the *Escherichia coli* laboratory strain DH5α. No difference in the enzymatic and bactericidal activity between dimeric MPO and hemi-MPO was found. Both forms of the enzyme also did not differ in the resistance to HOCl, the main product of MPO. HOCl caused a dose-dependent decrease in peroxidase and chlorinating activity, and the pattern of this decrease was identical for dimeric MPO and hemi-MPO. At equal heme concentration, a somewhat higher bactericidal effect was observed for the hemi-MPO/H₂O₂/Cl⁻ system compared with the dimeric MPO/H₂O₂/Cl⁻ system. However, this is most likely not related to some specific property of hemi-MPO and can be accounted for by the higher probability of contacting between bacterial surface and hemi-MPO molecules due to their two-fold greater number relative to that of dimeric MPO molecules at the same heme concentration. By using Western-blotting with antibodies to MPO, we showed, for the first time, that the dimeric molecule of MPO could be cleaved into two monomeric subunits by HOCl, most probably due to oxidation of the disulfide bond between these subunits. This finding suggests that appearance in blood of MPO corresponding in mass to its monomer may result from the damage of dimeric MPO by reactive halogen species, especially upon their overproduction underlying oxidative/halogenative stress in inflammatory diseases.

Key words: myeloperoxidase, hemi-myeloperoxidase, chlorinating activity, peroxidase activity, bactericidal myeloperoxidase system, oxidative/halogenative stress