

КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗЫ И ФИБРОНЕКТИНА И ЕГО МОДУЛЯЦИЯ ЛИГАНДАМИ ФИБРОНЕКТИНА

О.Ю.ЯНКОВСКИЙ, И.А.ЯБЛУНОВСКАЯ, В.Н.КОКРЯКОВ, Г.М.АЛЕШИНА,
Л.Р.ХИЛАЖЕТДИНОВА, Н.Ю.ГОВОРОВА, Г.М.ПОДСУХИНА, Ю.В.ГАВРИЛОВА,
А.В.ВАХРУШЕВ, Н.В.ЛЕОНОВА

Государственный НИИ особо чистых биопрепаратов, Санкт-Петербург

Фибронектин плазмы крови человека, иммобилизованный на агарозе, в условиях, близких к физиологическим, взаимодействует с растворимой миелопероксидазой ($K_d=2,43$ мкМ). Более прочный комплекс образуется при взаимодействии миелопероксидазы с фибронектином, сорбированным на колонке с иммобилизованным желатином ($K_d=0,94$ мкМ) — естественным лигандом фибронектина. При наличии в жидкой фазе термоагрегированного IgG (но не нативного), прочность связи МПО в комплексе еще более усиливается (0,06 мкМ). Предполагается, что миелопероксидаза может служить одним из компонентов сложной надмолекулярной структуры — реального иммунного комплекса. Обсуждается роль взаимодействия этого фермента с фибронектином как возможного механизма довооружения фагоцитов, так и в качестве способа предотвращения тканевого повреждения оксидантами, генерируемыми экстрацеллюлярной миелопероксидазой в очаге воспаления.

Резорбтивная клеточная резистентность макрофагов как явление резкого усиления их микробицидных свойств коррелирует с приобретением этими клетками способности галогенировать белки [1, 2]. Последнее, как известно, является характеристикой миелопероксидазного катализа. Вместе с тем известно также, что эти клетки в отличие от нейтрофилов не обладают миелопероксидазой (МПО) — наиболее мощным из бактерицидных факторов защитных клеток [3]. Предполагается, что данное свойство макрофаги приобретают, захватывая экстрацеллюлярную МПО, секретированную нейтрофилами в процессе активации или фагоцитоза [2]. Однако на поверхности макрофагов не обнаружены специфические рецепторы для связывания этого белка. В этой связи мы предположили, что в составе плазмы крови могут находиться белки, способные как ассоциировать МПО, так и взаимодействовать с рецепторным аппаратом фагоцита. В качестве потенциального переносчика этого белка нами был исследован фибронектин (ФН) — неспецифический опсонин плазмы крови, способный ассоциировать широкий круг веществ как экзогенной, так и эндогенной природы [3]. Исследование взаимодействия ФН с МПО было проведено методом количественной аффинной хроматографии в варианте распределительного равновесия.

Методика. ФН и МПО выделяли с помощью описанных нами ранее методов [4, 5]. IgG получали стандартным методом ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе [6], предварительно удалив из сыворотки крови человека псевдоглобулины. Для этой цели сыворотку диализовали в течение ночи против H_2O , диализат центрифугировали и осадок отбрасывали. После чего супернатант трехкратно переосаждали в 40% насыщения $(NH_4)_2SO_4$ и осадок после растворения в H_2O диализовали в 0,01 М фосфатном буфере pH 6,5 в объеме 1:100 с трехкратной сменой буфера. После ионообменной хроматографии фракцию IgG фильтровали в PBS (0,01 М фосфатный буфер pH 7,4 в 0,15 М NaCl) через колонку с IgG-агарозой для удаления возможной примеси антииммунноглобулинов. Затем IgG дочищали на колонке с иммобилизованным белком А золотистого стафилококка (производства НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург) — специфическом сорбенте этого белка. Термоагрегированный IgG получали по методу [7]. Для изучения ассоциации растворимой МПО использовали рециркулирующую систему, состоящую из перистальтического насоса Місгорегрех (ЛКВ, Швеция), колонки с инактивированной BrCN-агарозой ($V = 2$ мл) (для оценки уровня неспецифического связывания МПО), колонки с иммобилизованным ФН ($V = 2$ мл) или с иммобилизованным желатином ($V = 2$ мл) с предварительно сорбированным на нем ФН в условиях насыщения. Систему уравнивали PBS. Иммобилизацию белков на BrCN-активированной агарозе вели по стандартной методике [8]. Объем несвязанной жидкости в структуре матрицы геля определяли в режиме гель-фильтрации с помощью фенолового красного с использованием колонки с немодифицированной агарозой 4В ($V = 50$ мл). Эксперимент осуществляли внесением различ-

ных концентраций МПО в присутствии или в отсутствие IgG (или агрегированного IgG). Продолжительность опыта 16-18 ч при 20°C. Концентрацию несвязанного белка (P) определяли в циркулирующей жидкости, а сорбированной МПО (q) — после его элюции в 0,05 М глицин-HCl pH 2,8 в 0,5 М NaCl и немедленного доведения pH до нейтральных значений 0,5 М NaOH. После чего из установленной величины концентрации в элюате (Pt) вычитали значение концентрации несвязанного белка (P). Поскольку объем элюата был фиксированным (3,5 мл), а объем несвязанной жидкости в колонке 1,72 мл (86% от объема колонки), то полученную концентрацию МПО (Pt-P) умножали на 2,03 (коэффициент разбавления). Для предотвращения элюции ФН с колонки с желатин-агарозой перед началом опытов сорбент обрабатывали глутаровым альдегидом по методике [9] с последующей промывкой колонки десятью объемами PBS.

Результаты и обсуждение. Полученные в результате иммобилизации белков индивидуальные сорбенты содержали следующие концентрации ФН: ФН-агароза — 4,2 мГ ФН на 1 мл геля; ФН-желатин-агароза — 1,6 мГ ФН на 1 мл геля. С учетом внутреннего объема геля (несвязанной жидкости в структуре матрицы), составляющего 86%, эти значения равны соответственно 4,9 мг/мл (10,9 мкМ) и 1,9 мг/мл (4,2 мкМ). Исследование взаимодействия жидкофазной МПО с иммобилизованным ФН, а также с ФН, предварительно сорбированным на желатине, выявило следующее (рис. 1 и 2). В первом случае константа диссоциации комплекса (K_d) составляет 2,43 мкМ, а число связывающих участков для МПО на ФН-агарозе (m) равняется 13,05 мкМ. Таким образом, K_d укладывается в интервал значений данной величины, соответствующих специфическому белок-

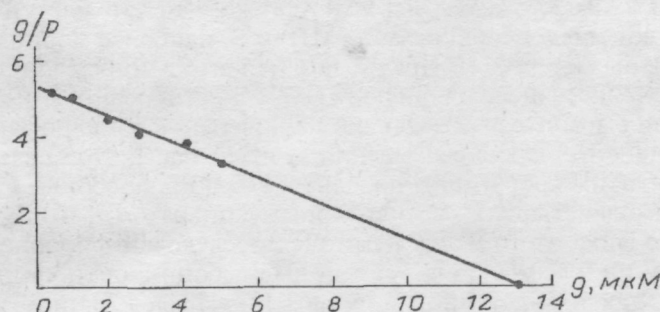


Рис. 1. График Скетчарда взаимодействия МПО с твердофазным ФН. Концентрация иммобилизованного ФН 10,9 мкМ, объем сорбента 2 мл, температура 20°C, циркулирующий раствор PBS, элюирующий раствор 0,05 М глицин-HCl pH 2,8 в 0,5 М NaCl, объем элюата 3,5 мл. p — концентрация свободной МПО в циркуляции; q — концентрация связанной МПО на сорбенте $m=13,05$ мкМ; константа диссоциации комплекса МПО-ФН $K_d=2,43$ мкМ. Каждая экспериментальная точка — результат отдельного целого опыта.

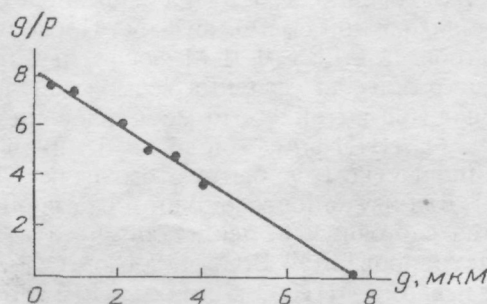


Рис. 2. Графики Скетчарда взаимодействия МПО с твердофазным ФН, связанным с матрицей через желатин.

Концентрация иммобилизованного ФН 4,2 мкМ, объем сорбента 2 мл, температура 21°C, циркулирующий раствор PBS, элюирующий раствор 0,05 М глицин HCl pH 2,8 в 0,5 М NaCl, объем элюата 3,5 мл. p — концентрация свободной МПО в циркуляции; q — концентрация связанной МПО на сорбенте; концентрация участков связывания МПО на сорбенте $m=7,58$ мкМ; константа диссоциации комплекса МПО-ФН $K_d=0,94$ мкМ. Каждая экспериментальная точка — результат отдельного целого опыта.

белковому взаимодействию [10]. Однако если сопоставить концентрацию МПО-связывающих участков с концентрацией ФН на колонке, то они приблизительно равны (с некоторым превышением концентрации таких участков). Учитывая эмпирические данные о том, что в результате иммобилизации белка значительная часть его лигандсвязывающих сайтов, как правило, оказывается недоступной [11], можно ожидать, что молекула ФН обладает несколькими взаимодействиями с МПО. Это не является неожиданным, так как молекула ФН состоит из 2 полипептидных цепей — продуктов одного гена и содержащих практически идентичные домены для взаимодействия со многими лигандами [3]. Взаимодействие МПО с ФН, предварительно сорбированным на желатинагаразе, характеризуется более высоким аффинитетом ($K_d = 0,94$ мкМ). Концентрация участков связывания составляет 7,6 мкМ, что почти дважды превышает концентрацию "ориентированного" ФН на сорбенте (4,2 мкМ).

В качестве дополнительного компонента взаимодействия в данном опыте желатин был выбран нами как имитатор С1q-субкомпонента первого компонента комплемента, обладающего также коллагеноподобным участком и связывающегося с высокой степенью сродства с той же структурой на поверхности ФН, что и желатин ($K_d = 10$ нМ) [3]. Благодаря тому, что связывание желатина (как и С1q) осуществляется только в N-концевой области молекулы ФН, можно ожидать, что в отличие от непосредственной иммобилизации этого белка на матрице геля в данном случае все его молекулы ориентированы единообразно, все МПО-связывающие участки экспонированы и доступны для взаимодействия с МПО. Таким образом, можно заключить, что ФН содержит по одному такому участку на каждой из двух субъединиц, а также, что желатин (или С1q) может усиливать такое взаимодействие.

Добавление в циркулирующий раствор нативного IgG практически не сказалось на картине взаимодействия МПО и ФН. Однако при добавлении термоагрегированного IgG, при фиксированной его концентрации в циркулирующей системе (1,27 мкМ) график Скэтчарда (рис. 3) приобрел вид кривой, что позволило предположить наличие двух независимых типов центров связывания МПО. Такой график представляется функцией с четырьмя параметрами: концентрациями МПО-связывающих центров различного типа mt_1 , mt_2 и соответствующими константами диссоциации K_{d1} , K_{d2} . Полагая константу диссоциации комплекса МПО — ФН известной ($K_{d2} = 0,94$ мкМ), по критерию наименьших квадратов методом градиентного спуска были вычислены значения остальных

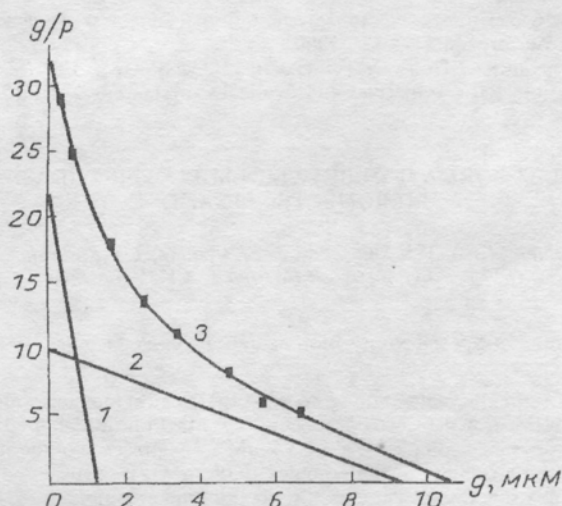


Рис. 3. Графики Скэтчарда взаимодействия МПО: с твердофазным ФН, связанным с матрицей через желатин (2), с комплексом ФН-IgG_{агрег.} (3)

Концентрация иммобилизованного ФН 4,2 мкМ, концентрация термоагрегированного IgG 1,27 мкМ, объем сорбента 2 мл, температура 21°C, циркулирующий раствор PBS, элюирующий раствор 0,05 М глицин-HCl pH 2,8 в 0,5 М NaCl, объем элюата 3,5 мл.

p — концентрация свободной МПО в циркуляции; q — концентрация связанной МПО на сорбенте; концентрации участков связывания МПО на ФН $m_0 = 9,45$ мкМ, на комплексах ФН-IgG_{агрег.} $m_1 = 1,29$ мкМ; константы диссоциации комплекса МПО-ФН $K_{d2} = 0,94$ мкМ, комплекса МПО-(ФН-IgG_{агрег.}) $K_{d1} = 0,06$ мкМ. Каждая экспериментальная точка — результат отдельного целого опыта.

ных трех параметров: $K_{d1} = 0,06$ мкМ, $m_{11} = 1,29$ мкМ, $m_{12} = 9,45$ мкМ. С учетом того факта, что K_d для связывания агрегированного IgG на иммобилизованном ФН составляет $0,043$ мкМ [7], а нами была использована его концентрация, равная $1,27$ мкМ, равновесная концентрация комплекса ФН — IgG должна была составить $1,19$ мкМ, что очень близко к вычисленному значению $m_{11} = 1,29$ мкМ. В этой связи можно полагать, что более высокоаффинная константа $K_{d1} = 0,06$ мкМ характеризует взаимодействие фермента с предварительно образовавшимся комплексом ФН — IgG агрег. Некоторое превышение концентрации МПО-связывающих участков на свободном ФН ($m_{12} = 9,45$ мкМ) над ранее приведенной для данной колонки с ФН-желатин-агарозой ($m_1 = 7,6$ мкМ) находится в пределах погрешности метода [11]. Как известно, агрегированный IgG является имитатором многих эффекторных функций иммунного комплекса [12], а в состав реального иммунного комплекса в качестве одного из компонентов входит ФН [3]. В этой связи можно высказать предположение, что МПО также может являться составным компонентом такого комплекса, благодаря чему, будучи поглощенной фагоцитом в составе иммунного комплекса, она обеспечивает более эффективное уничтожение микроорганизмов макрофагами. В случае же микроорганизмов, препятствующих слиянию фагосомы с лизосомой, этот фермент, будучи захвачен из экстрацеллюлярного пространства, обеспечивает уничтожение таких микроорганизмов уже в фагосоме лейкоцитов (нейтрофилов и макрофагов). Наконец, такой механизм удаления МПО из внеклеточного пространства в очаге воспаления (в неспецифической фазе благодаря ФН, в специфической — в составе иммунного комплекса) может служить одним из способов предотвращения повреждения собственных тканей мощными оксидантами, генерируемыми данным ферментом [13].

ЛИТЕРАТУРА

1. Пугаревский В.Е. Зернистые лейкоциты и их свойства. — М., 1978.
2. Heifets L., Imai K., Goren M.B. // Res. J. Reticuloendothel. Soc. — 1980. — Vol. 28, N 4. — P. 391-404.
3. Ruoslahti E. // Ann. Rev. Biochem. — 1988. — Vol. 57. — P. 375-413.
4. Янковский О.Ю., Говорова Н.Ю., Шаронов Б.П., Лылова С.Н. // Вестн. ЛГУ. Сер. 3. — 1988. — вып. 1. — С. 71-76.
5. Yankovsky O.Yu., Zhebrun A.B., Borovkova Yu.A. // International Conference on Medical Biotechnology, Immunization and AIDS. — Leningrad, 1991. — P. 6-7.
6. Брок И. // Иммунологические методы. / Под ред. Г.Фримеля. — М., 1987. — С. 390-413.
7. Salvarrey M., Rostagno A. // Clin. exp. Immunol. — 1989. — Vol. 76, N 1. — P. 92-96.
8. Безвершенико И.А. Аффинная хроматография. — Киев, 1978.
9. Wood J.N. // Veth. molec. Biol. — 1984. — Vol 1. — P. 279-286.
10. Варфоломеев С.Д., Зайцев С.В. Кинетические методы в биохимических исследованиях. — М., 1980.
11. Туркова Я. Аффинная хроматография. — М., 1980.
12. Кихоу Дж. // Иммуноглобулины / Под ред. Г.Литмена, Р.Гуда. — М., 1981. — С. 235-265.
13. Klebanoff S.J. // Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates. — 2-d Ed. / Eds. J.I. Gallin et al. — New York, 1992. — P. 541-588.

MODULATION OF COMPLEX FORMATION BETWEEN MYELOPEROXIDASE AND FIBRONECTIN BY FIBRONECTIN LIGANDS

O.Yu. Yankovsky, I.A. Yablunovskaya, V.N. Kokrjakov, G.M. Aleshina, L.P. Khilatzhetdinova, N.Yu. Govorova, G.M. Podsukhina, Yu.V. Gavrilova, A.V. Vakhrushev

Institute of Special Purity Biopreparations, S-Petersburg, Russia

Human blood plasma fibronectin immobilised on agarose in physiological interacts with soluble myeloperoxidase ($K_d = 2,43$ mM). Interaction of myeloperoxidase with fibronectin adsorbed on immobilised gelatina, natural fibronectin ligand, resulted in formation more stable complex ($K_d = 0,94$ mM). The presence of thermoaggregated (but not native) IgG in the liquid phase increased a stability of the complex ($0,06$ mM). It is suggested that myeloperoxidase could represent a component of complex supermolecular structure, real immune complex.