

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 галоидировать 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 пересаждали 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 A 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 Мисгорегрех (ЛКВ, Швеция), колонки с инактивированной BгCN-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 BгCN-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-

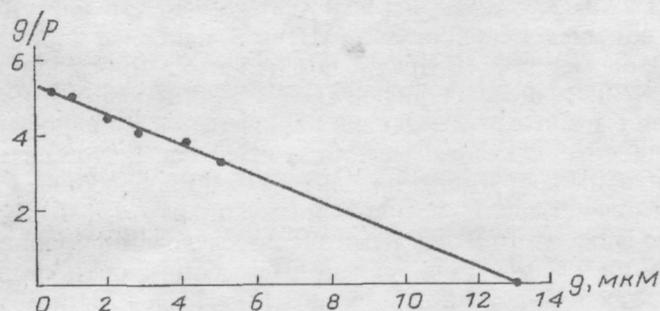


Рис. 1. График Скэтчарда взаимодействия МПО с твердофазным ФН. Концентрация иммобилизованного ФН 10,9 мкМ, объем сорбента 2 мл, температура 20°C, циркулирующий раствор PBS, элюирующий раствор 0,05 М глицин-HCl pH 2,8 в 0,5 М NaCl, объем элюата 3,5 мл. p — концентрация свободной МПО в циркуляции; q — 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.

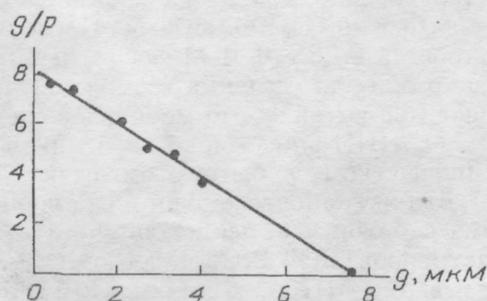


Рис. 2. Графики Скэтчарда взаимодействия МПО с твердофазным ФН, связанным с матрицей через желатин.

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 желатинаггарозе, 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 осталь-

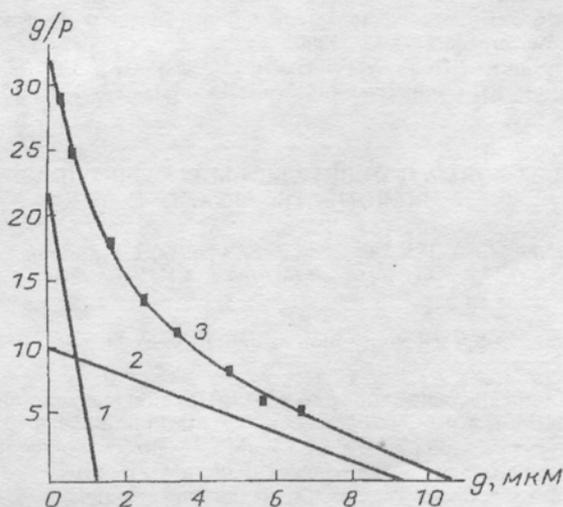


Рис. 3. Графики Скэтчарда взаимодействия МПО: с твердофазным ФН, связанным с матрицей через желатин (2), с комплексом ФН-IgG_{агр.} (3)

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 $m_1 = 9,45$ мкМ, на комплексах ФН-IgG_{агр.} $m_2 = 1,29$ мкМ; константы диссоциации комплекса МПО-ФН $K_{d2} = 0,94$ мкМ, комплекса МПО-(ФН-IgG_{агр.}) $K_{d1} = 0,06$ 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 Джс.* // 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.Khilatzhedinova, N.Yu.Govorova, G.M.Podskukhina, 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.