

УДК 577.122.7

©Коллектив авторов

**ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ БЕЛКОВ
СЕМЕЙСТВА МАКРОГЛОБУЛИНОВ МЕЖДУ СОБОЙ
И С РЕЦЕПТОРАМИ ЭНДОЦИТОЗА
(ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ ТРАНСМЕМБРАННОГО ПЕРЕНОСА)**

В.Н. Зорина*, Р.М. Зорина, Н.А. Зорин

ЦНИЛ ГОУ ДПО Новокузнецкого государственного института
усовершенствования врачей, 654005 Новокузнецк, Кемеровская обл.,
пр. Строителей, д. 5; тел.: (3843)45-84-18, (3843)45-56-41;
эл. почта: zorin@ngiuv.net, macroglobulin@yuandex.ru

Проведён ряд экспериментов для уточнения механизмов, позволяющих белкам семейства макроглобулинов (МГ) доставлять регуляторные субстанции внутрь клеток. Показано, что все представители семейства не только конкурируют за связывание с протеиназами, но и могут взаимодействовать между собой. Мы подтвердили, что только комплекс альфа-2-макроглобулина (МГ) с протеиназой способен реагировать с основным рецептором эндоцитоза (белком, связанным с рецептором липопротеинов, ЛРП). Впервые показано, что при взаимодействии МГ сначала с протеиназой, а затем с ЛРП происходит постепенное конформационное уплотнение формирующегося мультикомплекса, демонстрирующего, в конечном итоге, парадоксально большую электрофоретическую подвижность по сравнению с нативным МГ. Мы предполагаем, что данное ступенчатое конформационное уплотнение, вместе с описанной ранее нейтрализацией заряда (по отношению к рI компонентов внутренних сред организма) при реакции с протеиназой, а затем с ЛРП и является ключевым моментом механизма трансмембранного переноса. Учитывая, что МГ транспортирует широкий спектр белков-регуляторов, он способен взаимодействовать не только с ЛРП, но и с сигнальным рецептором (gr78), а также может, в зависимости от состава и количества проникающих в клетку комплексов, регулировать как собственный синтез, так и синтез ЛРП и его блокатора (рецептор-ассоциированного белка, РАП), этот основной представитель семейства МГ, очевидно, играет ведущую роль в регуляции межклеточных взаимодействий и в передаче сигнала внутрь клетки.

Ключевые слова: семейство макроглобулинов, альфа-2-макроглобулин, ЛРП, трансмембранный биотранспорт, протеиназа.

ВВЕДЕНИЕ. В основе механизмов управления биологических систем лежит принцип доставки эффекторов к их субстратам. Для цитокинов, гормонов пептидной природы и многих других регуляторных макромолекул основными транспортерами являются белки семейства МГ [1-3]. Данная группа белков присоединяет эффекторы посредством образования связи с гидрофобными сайтами на своей поверхности [4, 5]. При этом, ряд авторов утверждает, что сформированные транспортные комплексы приобретают способность присоединяться к рецепторам эндоцитоза (в основном к так называемому белку, связанному с рецептором липопротеинов, ЛРП – от LRP, lipoprotein receptor related protein) клеток-мишеней только после специфической для МГ трансформации – конформационного уплотнения, вызванного присоединением протеиназы или

* - адресат для переписки

метиламина к внутреннему тиоловому эфиру [1, 2, 5]. В результате трансформации комплекс, состоящий, например, из альфа-2-макроглобулина (МГ), несомого эффектора и протеиназы в зональном электрофорезе демонстрирует большую подвижность, чем нативный МГ, имеющий заведомо меньшую относительную молекулярную массу [1]. Кроме того, суммарный заряд образованного триплета нейтрализуется, независимо от рI исходных компонентов, достигая значений, характерных для жидких сред организма [3]. В результате нейтрализации заряда комплекс теряет флотирующие свойства и осаждается на рецепторы эндоцитоза клеток-мишеней. Предполагается, что при взаимодействии рецептора с вышеупомянутым триплетом общий заряд вновь нейтрализуется, и сложный комплекс рецептор-МГ-протеиназа-эффектор погружается внутрь клетки, где эффектор и реализует свои регуляторные функции [3]. Однако, следует отметить, что молекулярная масса основного рецептора эндоцитоза (ЛРП) не превышает 600 кДа, а его менее распространенного аналога – мегалина (gp330) – почти вдвое меньше [6]. Тем не менее, вышеописанный сложный комплекс, который может иметь суммарную молекулярную массу более 1000 кДа, беспрепятственно проникает через “отверстие” в цитоплазматической мембране, ранее занимаемое ЛРП. Таким образом, целью нашей работы было уточнение механизмов вышеупомянутых процессов и поиск объяснения подобного парадоксального эффекта.

МЕТОДИКА. Для получения препаратов нативного МГ использовали, свежую цитратную плазму крови мужчин, полученную на Новокузнецкой станции переливания крови. Целевой продукт получали последовательным сочетанием удаления плазминогена хроматографией на лизин-агарозе, дробного осаждения полиэтиленгликолем-6000, диализа, анионообменной и цинк-хелатной хроматографии [7]. Полученные препараты МГ проверяли на степень чистоты при помощи перекрестного иммуноэлектрофореза в агарозе, содержащей поликлональные антитела против всех белков сыворотки крови человека, а затем электрофореза в пластинах полиакриламидного геля (в восстанавливающих условиях). Для дальнейшей работы использовали препараты со степенью очистки не менее 95%.

Для очистки ассоциированного с беременностью протеина плазмы А (РАРР-А) и ассоциированного с беременностью альфа-2-гликопротеина (АБГ) использовали сочетание хроматографии на гепарин-агарозе, анионообменной хроматографии, металлхелатной хроматографии [8].

Для извлечения ЛРП плаценту отмывали от следов крови и гомогенизировали в 0,05 М фосфатном буфере с рН 7,4, содержащем 0,15 М NaCl, 0,1% твин-40 (“Sigma”, США) и 0,005 М фенилметилсульфонилфторида (“Sigma”) в соотношении 1/4 (вес/объем). Экстракт осветляли центрифугированием (38000 g), и гель-хроматографией на картриджах Р-6. Частичную очистку ЛРП проводили путём хроматографии на BrCN-агарозе (“Sigma”) с иммобилизованным МГ, модифицированным метиламином [9]. Неадсорбированный материал элюировали забуференным фосфатами физиологическим раствором, а целевой продукт – 0,05 М глицин-HCl буфером с рН 2,8. Примеси удаляли посредством рециклической гельхроматографии материала первого пика белка на колонке TSK-Gel HW-60S (“Toyo Soda”, Япония). Достигнутая степень очистки – около 95% (1 видимый преципитат при электрофорезе в пластинах полиакриламидного геля в невосстанавливающих условиях).

Ракетный иммуноэлектрофорез выполняли по стандартной методике [10] в пластинах 1%-ной агарозы (“Sigma”), содержащей моноспецифические поликлональные кроличьи антисыворотки против исследуемых белков. Концентрация антисывороток подбиралась в серии предварительных экспериментов.

При использовании вариантов с промежуточным гелем и конкуренцией белков, конкурирующие $I\bar{A}$ вносили в лунку в соотношении 1 моль / 1 моль. Промежуточный гель состоял из 0,5 мл иммобилизованного фермента и 2,5 мл

1%-ной агарозы ("Sigma"), а основной – из 1%-ной агарозы ("Sigma"), содержащей моноспецифические поликлональные кроличьи антисыворотки против исследуемого в конкретном эксперименте МГ.

Электрофорез в пластинах 4,5% полиакриламидного геля (в невосстанавливающих условиях) проводили с использованием оборудования и рекомендаций по проведению электрофореза для MiniProtean II ("Bio-Rad", США). Пластины геля фиксировали и окрашивали 0,04% раствором кумасси G-250 ("Sigma") в хлорной кислоте.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Поскольку именно образование комплекса с протеиназой является ключевым фактором, позволяющим МГ проникать в клетку, прежде всего следовало уточнить, какой из белков семейства имеет преимущество при формировании подобного комплекса. Мы провели серию опытов с применением ракетного иммуноэлектрофореза с промежуточным гелем, содержащим иммобилизованный фермент – трипсин или плазмин (рис. 1, 2). Как видно из рисунка 1, связывание МГ с иммобилизованным трипсином вызывает снижение высоты преципитата, добавление АБГ не оказывает существенного влияния, а добавление РАРР-А приводит к дополнительному уменьшению высоты преципитата. При повторе эксперимента с использованием плазмينا (ПЛ) в качестве иммобилизованного фермента мы продемонстрировали, что связывание МГ с ПЛ тоже вызывает снижение высоты преципитата, добавление АБГ в лунку в качестве конкурента практически полностью отменяет данный эффект, а добавление РАРР-А не влияет на интенсивность связывания МГ с ПЛ.

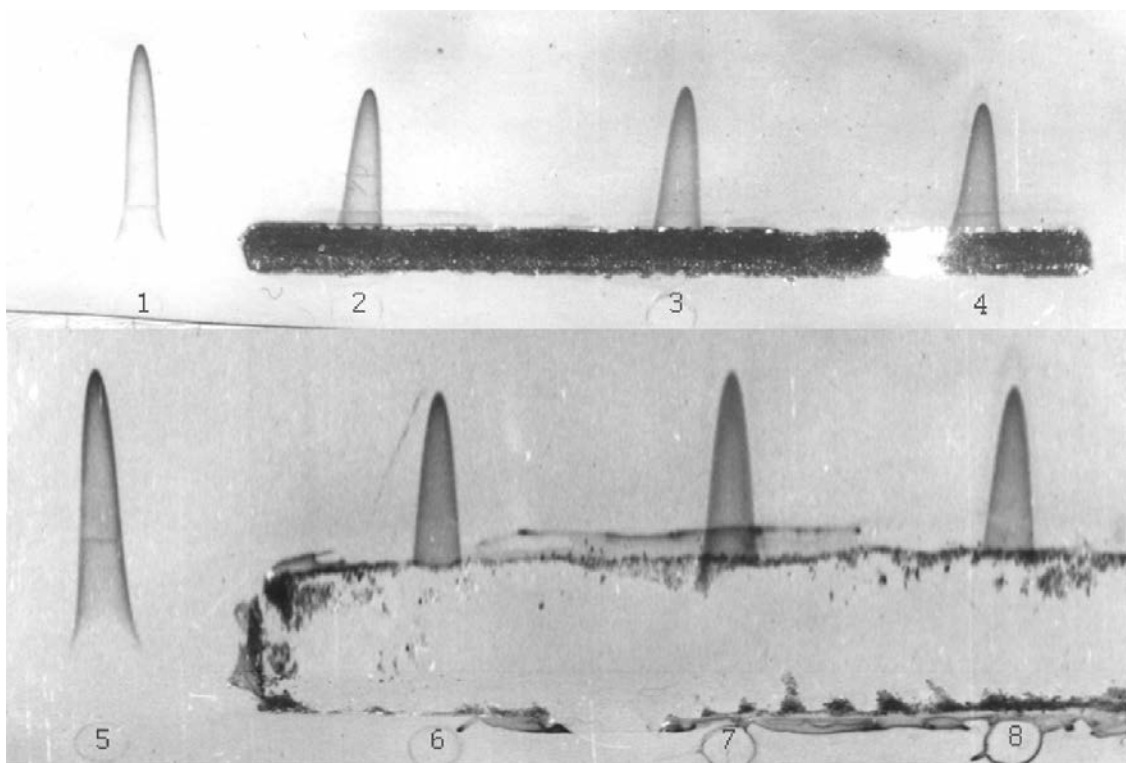


Рисунок 1.

Конкурентное взаимодействие МГ, АБГ и РАРР-А за иммобилизованный в промежуточном геле трипсин (Тр) либо плазмин (Пл).

Пояснения: 1) МГ без контакта с иммобилизованным Тр; 2) МГ контакт с Тр;

3) МГ контакт с Тр + АБГ; 4) МГ контакт с Тр + РАРР-А;

5) МГ без контакта с иммобилизованным Пл; 6) МГ контакт с Пл; 7) МГ контакт с Пл + АБГ;

8) МГ контакт с Пл + РАРР-А.

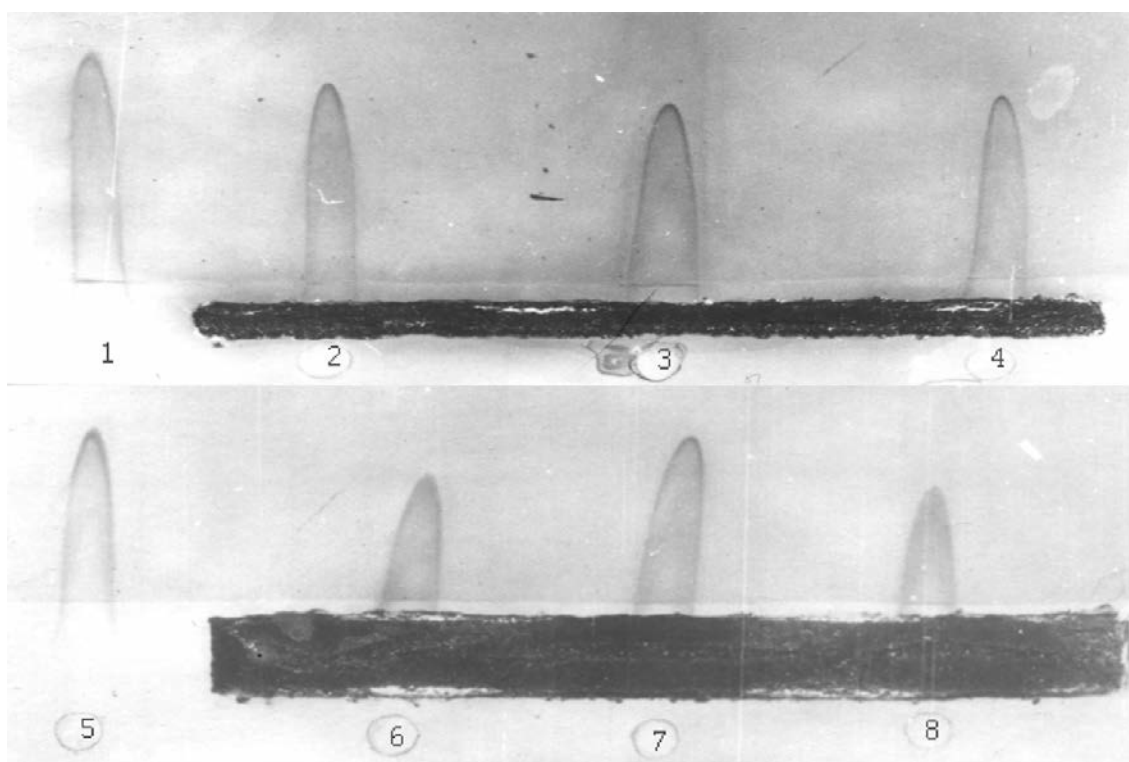


Рисунок 2.

Конкурентное взаимодействие АБГ, МГ и РАРР-А за иммобилизованный в промежуточном геле трипсин (Тр) либо плазмин (Пл).

Пояснения: 1) АБГ без контакта с иммобилизованным Тр; 2) АБГ контакт с Тр;

3) АБГ контакт с Тр + МГ; 4) АБГ контакт с Тр + РАРР-А;

5) АБГ без контакта с иммобилизованным Пл; 6) АБГ контакт с Пл; 7) АБГ контакт с Пл + МГ;

8) АБГ контакт с Пл + РАРР-А.

При повторе серии с использованием АБГ в качестве опытного образца и МГ либо РАРР-А в качестве конкурентных белков (рис. 2) установлено, что АБГ связывается с иммобилизованным трипсином, что выражается в снижении высоты преципитата по сравнению с контролем, добавление МГ или РАРР-А усиливает этот эффект (РАРР-А в меньшей степени, чем МГ). Напротив, в случае, когда в промежуточном геле иммобилизован плазмин, добавление МГ в качестве конкурента полностью отменяет снижение высоты преципитата, происходящее при реакции АБГ с Пл. Добавление РАРР-А усиливает уменьшение площади преципитата.

Для уточнения вопроса, имеет ли значение определенная последовательность реакции, т.е. происходит ли формирование описанного выше триплета в виде последовательной реакции МГ сначала с протеиназой, а потом с ЛРП, либо нативный МГ может и напрямую взаимодействовать с ЛРП, мы провели следующий эксперимент. Методом ракетного электрофореза в геле, содержащем поликлональную кроличью моноспецифическую антисыворотку против МГ, исследовали высокоочищенные препараты нативного, трансформированного МГ, а также их смеси с ЛРП (рис. 3). Как видно из полученных нами результатов, добавление ЛРП к препарату нативного МГ не влияет на высоту полученного пика. Напротив, при смешивании ЛРП с трансформированным МГ происходит уменьшение площади пика, по сравнению с контрольным образцом (чистым препаратом трансформированного МГ).

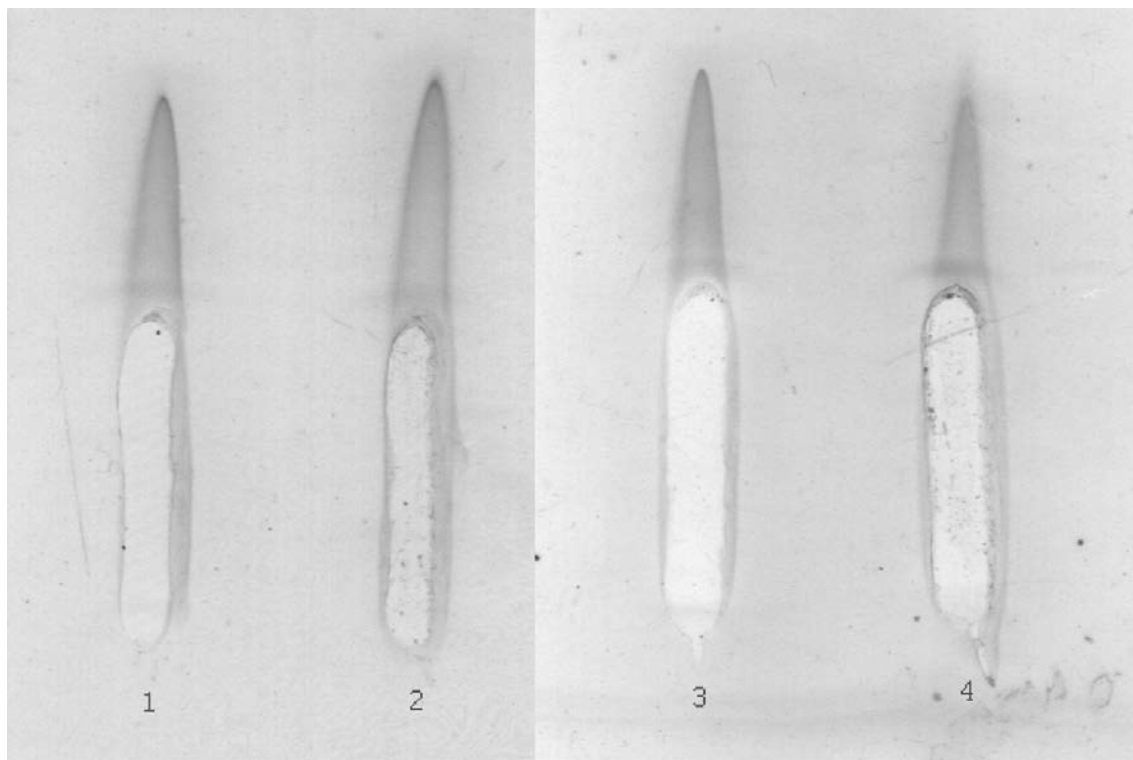


Рисунок 3.

Ракетный иммуноэлектрофорез различных конформационных форм МГ с ЛРП.
Пояснения: 1) Препарат нативного МГ + электрофоретический буфер; 2) препарат нативного МГ + ЛРП; 3) препарат трансформированного МГ + электрофоретический буфер; 4) препарат трансформированного МГ + ЛРП.

Наиболее интересные данные были получены нами при анализе МГ и его комплексов с лигандами методом электрофореза в полиакриламидном геле (рис. 4). Результаты наших экспериментов подтвердили ранее опубликованные сообщения о том, что трансформированный МГ имеет несколько большую электрофоретическую подвижность по сравнению с нативным, и что только трансформированный МГ способен реагировать с ЛРП. Эти результаты также убедительно демонстрируют, что при образовании “тяжёлого” мультикомплекса трансформированный МГ – ЛРП, суммарная электрофоретическая подвижность полученного комплекса практически не отличается от подвижности одного трансформированного МГ.

ОБСУЖДЕНИЕ. Продемонстрированные нами в первом эксперименте эффекты конкуренции между представителями семейства МГ могут быть объяснены как простыми различиями в молекулярной массе, так и принципиальными различиями в механизмах реакции между белками. Так, в случае взаимодействия с иммобилизованным трипсином, добавление более легкого по молекулярной массе АБГ (360 кДа) не оказывает влияние на связывание МГ (720 кДа) с ферментом, а добавление МГ в реакцию, с последующим проявлением преципитата АБГ при помощи специфической антисыворотки, приводит к уменьшению площади преципитата. Самый “тяжёлый” РАРР-А (810 кДа) вызывает снижение пика при его добавлении и в случае МГ и в случае АБГ. Учитывая, что МГ способен связываться с АБГ [3], можно предположить, что дополнительное уменьшение площади преципитата связано с перекрёстным взаимодействием между белками семейства, причем белок с большей молекулярной массой способен атаковать более лёгкий, но не наоборот.

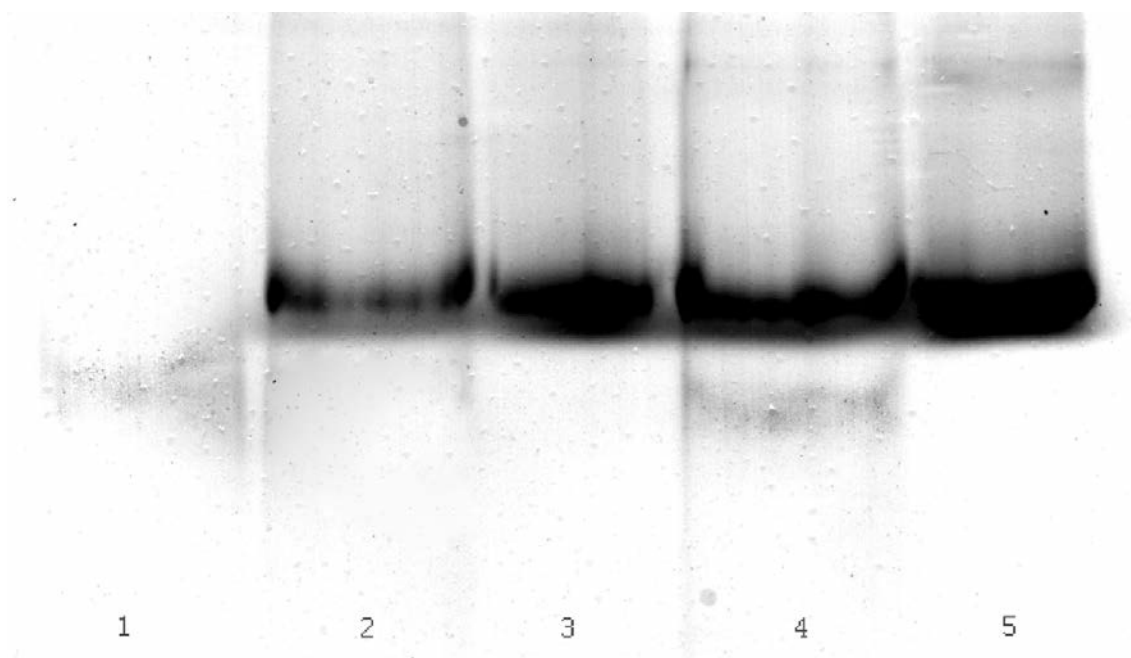


Рисунок 4.

Электрофорез в полиакриламиде препаратов МГ.

Пояснения: 1) ЛРП; 2) нативный МГ; 3) трансформированный МГ; 4) нативный МГ + ЛРП; 5) трансформированный МГ + ЛРП.

Довольно неожиданны результаты конкуренции МГ и АБГ за иммобилизованный плазмин – и при проявлении преципитата антисывороткой против МГ и при использовании антисыворотки против АБГ добавление конкурента полностью отменяет эффект уменьшения площади преципитата за счёт связывания исследуемого МГ с ферментом. Обнаруженный феномен, безусловно, нуждается в дополнительном изучении.

Наши дальнейшие исследования подтвердили высказываемые ранее [1, 2] мнения о том, что только трансформированный протеиназой МГ способен связываться с основным рецептором эндоцитоза и, вероятно, вызвать последующую суммарную нейтрализацию мультикомплекса МГ-эффектор-протеиназа-рецептор [3].

Исследование препаратов МГ, ЛРП и их комплексов показало, что последовательное формирование сначала комплекса МГ-протеиназа, а затем мультикомплекса МГ-протеиназа-ЛРП не приводит к уменьшению электрофоретической подвижности. Напротив, она последовательно увеличивается на каждом этапе, что явно свидетельствует о поэтапном конформационном уплотнении формирующегося мультикомплекса. По нашему мнению, именно это уплотнение позволяет комплексу МГ-протеиназа-эффектор-ЛРП погружаться после нейтрализации суммарного заряда внутрь клетки через “отверстие”, занимаемое ранее одним ЛРП.

Семейство МГ у человека представлено тремя белками, каждый из которых способен связывать различные эффекторные субстанции при помощи гидрофобных или ковалентных взаимодействий и циркулировать определённое время, без взаимодействия с рецепторами. МГ присоединяют и транспортируют практически все известные цитокины, значительную часть гормонов пептидной природы, простагландины, липиды, иммуноглобулины, т.е. могут обоснованно претендовать на роль универсальных транспортёров биологически активных субстанций [1, 5]. При этом различные представители семейства, различающиеся по иммуносупрессивному и другим видам воздействия на клетки конкурируют

между собой не только за связывание с регуляторными субстанциями, но и за связывание с протеиназами, без которого невозможно взаимодействие с клеточными рецепторами, поскольку только после присоединения выброшенной в циркуляцию (к примеру при воспалении) протеиназы к внутреннему тиоловому эфиру какого-либо белка из семейства МГ, происходит конформационная перестройка и уплотнение мультикомплекса, состоящего из протеиназы, МГ и эффекторов, присоединившихся до или сразу после реакции с протеиназой, а также уравнивание суммарного заряда мультикомплекса и заряда среды микроокружения [3]. Подобная “нейтрализация” способствует снижению флотационных характеристик и облегчает взаимодействие с доступными рецепторами, в первую очередь с рецепторами эндоцитоза – ЛРП, по причине его широкой распространённости и высокого аффинитета к трансформированным МГ. Взаимодействие с рецептором в свою очередь приводит к повторному уплотнению, нейтрализации всего комплекса рецептор-IA-протеиназа-лиганды, и, как следствие, к его быстрому погружению внутрь клетки, несмотря на то, что суммарная молекулярная масса комплекса ЛРП-МГ-протеиназа-лиганды значительно превышает массу одного ЛРП. При этом, часть доставленных лигандов разрушается в лизосомах, а часть проходит процессинг в эндосомах [11]. Помимо этого, возможна корцепция ЛРП с поверхностными сигнальными рецепторами при присоединении мультикомплексов МГ, позволяющая передать сигнал и запустить каскад внутриклеточных реакций до погружения комплекса в клетку [12]. Очевидно, что направленность реализуемых процессов определяется типом эффектора в составе комплекса, а также тем, какой именно представитель семейства МГ является доминирующим в общем пуле комплексов. Необходимо также отметить, что система представляет собой саморегулирующийся механизм, поскольку известно, что экспрессия ЛРП регулируется транспортируемыми МГ субстанциями – интерлейкином-10, интерфероном- γ , и лактоферином [13, 14].

ЛИТЕРАТУРА

1. Birkenmeier G. (2001) *Mod. Asp. Immunobiol.*, **2**, 32-36.
2. Bonacci G.R., Caceres L.C., Sanchez M.C., Chiabrando G.A. (2007) *Arch. Biochem. Biophys.*, **460**, 100-106.
3. Zorina V.N., Zorin N.A., Lykova O.F. et al. (2007) *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, **1**, 216-219.
4. Webb D.J., Roadcap D.W., Dhakenphalkar A., Gonias S.L. (2000) *Protein Sci.*, **9**, 1986-1992.
5. Liu Q., Ling T.Y., Shieh H.S., Johnson F.E., Huang J.S., Huang S.S. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 46212-46218.
6. Зорин Н.А., Зорина В.Н. (2000) *Гематол. Трансфузиол.*, №5, 20-21.
7. Жабин С.Г., Зорина Р.М., Мальцева Н.В., Белогорлова Т.И., Лыкова О.Ф., Чурикова Т.С. (1990) *Гематол. трансфузиол.*, №5, 31-33.
8. Jensen P.H., Moestrup S.K., Gliemann J. (1989) *FEBS letters*, **255**, 275-280.
9. Аксельсен Н., Крелль Й., Бееке Б. (1977) *Руководство по количественному электрофорезу*. Москва, Мир.
10. Birkenmeier G., Carlsson-Bostedt L., Shanbhag V., Kriegel T., Kopperschlager G., Sottrup-Jensen L., Stigbrand T. (1989) *Eur. J. Biochem.*, **183**, 239-243.
11. Shibata M., Sakai H., Sakai E., Okamoto K., Nishishita K., Yasuda Y., Kato Y., Yamamoto K. (2003) *Eur. J. Biochem.*, **270**, 1189-1198.
12. Hussain M.M., Strickland D.K., Bakillah A. (1999) *Ann. Rev. Nutr.*, **19**, 141-172.
13. Marzolo M.P., von Bernhardi R., Bu G., Inestrosa N.C. (2000) *J. Neurosci. Res.*, **60**, 401-411.
14. Morita S.Y., Kawabe M., Sakurai A., Okuhira K., Vertut-Doi A., Nakano M., Handa T. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 24355-24361.

Поступила: 13. 11. 2008.

PECULIARITIES OF INTERACTIONS BETWEEN PROTEINS OF
THE MACROGLOBULIN FAMILY AND WITH THE ENDOCYTIC RECEPTORS
(A POSSIBLE MECHANISM OF TRANSMEMBRANE TRANSFER)

V.N. Zorina, R.M. Zorina, N.A. Zorin

Postgraduate Medical Training Institute, Central Research Laboratory, 5 Stroiteley Ave, Novokuznetsk,
654005 Russia; tel: +7(3843)458418; e-mail: zorin@ngiuv.net

We have conducted a series of experiments, for specification of mechanisms which proteins of the macroglobulin family deliver regulatory substances inside of a cells. We have shown that all members of the family are not only compete for binding to proteinases, but also can interact with each other. We have confirmed that only a complex of alpha-2-macroglobulin (α 2-MG) with proteinase is capable to react with the major endocytic receptor (low-density lipoprotein receptor-related protein, LRP). For the first time we have demonstrated, that interaction of α 2-MG firstly with proteinase, and then with LRP provokes a progressive conformational consolidation of the multicomplex, which is accompanied by a paradoxical increase of the electrophoretic mobility in comparison with native α 2-MG. We suggest that such stepwise conformational consolidation, together with earlier demonstrated charge neutralization (versus pI of internal environments) after interaction firstly with proteinase, and then with LRP, components of is the key moment of the mechanism of transmembrane transfer. Taking into account, that α 2-MG transfers a broad spectrum of protein regulators, and interacts not only with LRP, but also with a signal receptor (grp78), and also can regulate (under certain conditions) both own synthesis, and synthesis of LRP and its blocker (receptor - associated protein, RAP), we suggest that this main member of the macroglobulin family plays a leading role in the regulation of intercellular interactions and in the transmission of signal inside of a cell.

Key words: macroglobulin family, alpha2-macroglobulin, LRP (lipoprotein receptor-related protein), transmembrane biotransport, proteinase.