



УДК 577.112.088.3

## ПОЛУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНОГО ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА ЧЕЛОВЕКА И ЕГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ПРОТАМИНОМ КЕТЫ

© 2005 г. А. В. Соколов, Е. Т. Захарова, М. М. Шавловский, В. Б. Васильев<sup>#</sup>Отдел молекулярной генетики, ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН,  
197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12

Поступила в редакцию 12.05.2004 г. Принята к печати 31.08.2004 г.

Обнаружено взаимодействие между церулоплазмином (ЦП, ферро- $O_2$ -оксидоредуктаза, КФ 1.16.3.1), медьпротеидом плазмы крови человека и протамином (ПР) кеты, катионным полипептидом позвоночных, формирующим компактную структуру ДНК сперматозоидов. При добавлении ПР к ЦП в отношении 2 : 1 моль/моль происходит уменьшение электрофоретической подвижности ЦП. В ЦП определены два типа центров связывания для ПР: два высокоаффинных ( $K_{d1} = 5.31 \times 10^{-7}$  М) и четыре низкоаффинных ( $K_{d2} = 1.56 \times 10^{-5}$  М) центра. Показано, что ПР кеты образует комплекс с ЦП разных видов животных. Комплекс ЦП–ПР диссоциирует при повышении ионной силы (0.3 М NaCl), понижении pH ниже 4.7, при добавлении полианионов (ДНК, липополисахариды, гепарин) и полилизина, что говорит об его электростатической природе. Взаимодействие ЦП с ПР увеличивало в 1.5 раза скорость катализируемого церулоплазмином окисления  $Fe^{2+}$ . С помощью аффинной хроматографии на ПР-сефарозе из плазмы крови, предварительно обработанной аргинин-сефарозой и гепарин-сефарозой для удаления факторов свертывания крови, с 90%-ным выходом выделен практически непротеолизированный мономерный ЦП, остававшийся стабильным более 2 мес. при 37°C.

**Ключевые слова:** церулоплазмин, медьпротеиды, протамин, протеолиз белков, факторы свертывания крови, белок-белковые взаимодействия.

### ВВЕДЕНИЕ

Церулоплазмин (ЦП, ферро- $O_2$ -оксидоредуктаза, КФ 1.16.3.1) – полифункциональный белок, основной медьпротеид плазмы крови с молекулярной массой 132 кДа. ЦП участвует в метаболизме железа, окисляя  $Fe^{2+}$  до  $Fe^{3+}$  [1, 2], окисляет биогенные амины [3], является антиоксидантом [4–6] и относится к белкам острой фазы воспаления [7]. В настоящее время ЦП применяется как медицинский препарат, в частности, используют его свойства антиоксиданта крови и стимулятора гемопоэза, уменьшающего интоксикацию и иммунодепрессию [8–12].

В структуре ЦП различают 6 гомологичных доменов [13]. Ферментативные функции ЦП обеспечивают 6 прочно связанных ионов меди, которые по спектральным свойствам делятся на три типа. Только полный набор ионов меди определяет все виды функциональной активности белка. Аминокислотные лиганды, формирующие медьсвязыва-

ющие центры, входят в состав разных доменов. Особую роль в координации ионов меди имеет С-концевой (шестой) домен, содержащий наибольшее число аминокислот – лигандов этих ионов [13].

Многочисленные функции ЦП проявляет благодаря широкой субстратной специфичности. Взаимодействуя с другими белками, ЦП также может приобретать новые функции. В ряде работ изучены взаимодействия ЦП с некоторыми белками и пептидами *in vitro* и выдвинуты предположения о роли этих белковых комплексов *in vivo* [14–23]. Так, конкурируя с факторами свертывания крови (ФСК) FV и FVIII за связывание протеина С, ЦП, возможно, участвует в регуляции свертывания [14]. Обнаруженная способность ЦП *in vitro* взаимодействовать с миелопероксидазой и ингибировать ее прооксидантные свойства [15], возможно, обеспечивает ему *in vivo* дополнительную антиоксидантную активность.

Для полноценного встраивания  $Fe^{3+}$  в ферритин важно не только наличие интактного ЦП, обладающего ферроксидазной активностью, но и возможность его непосредственного контакта с ферритином [16–18]. Взаимодействие ЦП с гипоталамическим нейропептидом (PACAP 38) [19], возможно, играет определенную роль в нейрорегуляторных процессах. Обнаруженный на астронитах мембраносвязанный ЦП [20] благодаря

Сокращения: ЛПС – липополисахариды; ЛФ – лактоферрин; ПР – протамин; ФСК – факторы свертывания крови; ЦП – церулоплазмин; PBS – буфер, содержащий 0.15 М NaCl, pH 7.4, 1.9 мМ  $Na_2HPO_4$ / 8.1 мМ  $NaH_2PO_4$ ; poly(Lys) – полилизин; QAE – тетрааминоэтил-; PMSF – фенилметилсульфонилфторид.

<sup>#</sup> Автор для переписки (факс: (812) 234-94-89; эл. почта: vadim@biomed.spb.su).

комплексообразованию с ферропортином 1 участвует в регуляции уровня железа в ЦНС и в предотвращении свободнорадикальных реакций [21]. Было обнаружено взаимодействие ЦП и мембраносвязанной плацентарной щелочной фосфатазы [22], значение которого предстоит выяснить.

Нами обнаружен комплекс ЦП с лактоферрином (ЛФ) [23, 24], относящимся к семейству трансферринов бактерицидным белком, который содержится в молоке, других секретах, а также в нейтрофильных гранулах лейкоцитов [25]. Поскольку ЦП при определенных условиях также проявляет бактерицидные свойства [26], мы предположили, что комплекс ЦП–ЛФ может участвовать в механизмах клеточной защиты [24].

Изучая особенности взаимодействия ЦП с ЛФ, мы показали, что комплекс ЦП–ЛФ диссоциирует при добавлении гепарина, липополисахаридов (ЛПС) и ДНК [24]. Поскольку перечисленные агенты взаимодействуют с ЛФ, а именно с его *N*-концевым аргининовым кластером ( $R^2-R-R^5$ ) [27], мы предположили, что именно этот кластер отвечает за комплексообразование ЛФ с ЦП [24]. Однако синтезированная нами аргинин-сефароза связывала ЦП с низкой эффективностью. Учитывая важную роль аргининовых кластеров в связывании ЦП, мы решили исследовать способность богатого аргинином протамина кеты (ПР) взаимодействовать с ЦП. Протамины – катионные полипептиды, на 50–95% состоящие из аргинина. ПР рыб используют как фармакологический препарат для нейтрализации действия антикоагулянта гепарина [28, 29].

Выделение недеградированного и стабильного ЦП со времени его открытия в 1948 г. [30] остается весьма трудной задачей. Так, применение для этих целей QAE-сефадекса требует последующего высаливания белка и гель-фильтрации для избавления от металлопротеиназы, вызывающей деградацию ЦП [31]. Использование на всех стадиях выделения хелаторов металлов (EDTA, 1.10-фенантролин) в качестве ингибиторов металлопротеиназы может привести к потере церулоплазмином ионов меди, т.е. необратимо понизить его ферментативную активность. Более традиционные методы выделения ЦП, например на DEAE-сефадексе или AE-агарозе [32–34], приводят к получению препарата, нестабильного при хранении, который подвергается “спонтанному” протеолизу.

Отмечено, что при выделении ЦП с применением хроматографии на DEAE-сефадексе, QAE-сефадексе, AE-агарозе [32–34] в препаратах присутствует примесь протромбина (ПТ). В наших предварительных исследованиях попытка удалить ПТ путем неспецифической адсорбции протромбинового комплекса на сульфате бария привела к выделению ЦП, еще более протеолизованного, чем без такой обработки [35]. Показано,

что при такой обработке происходит контактная активация ФСК [36].

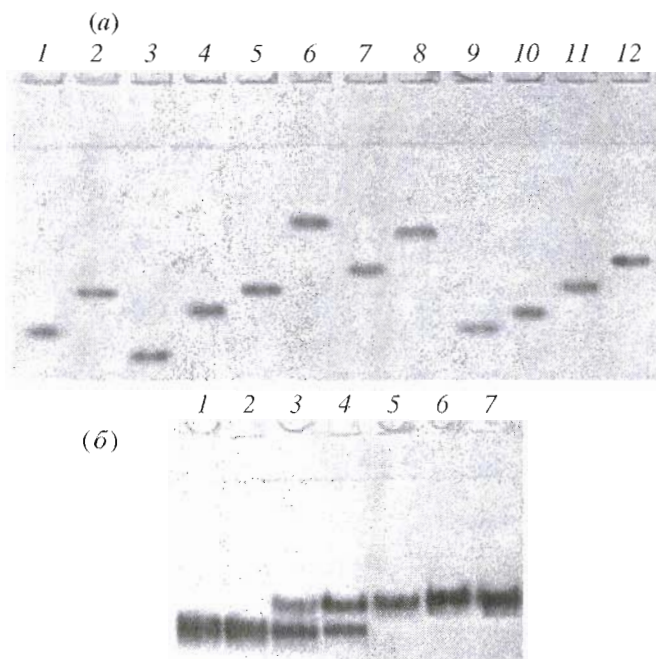
В крови большинства китообразных отсутствуют ФСК, ответственные за контактную активацию свертывания крови, при этом изученные к настоящему времени ЦП дельфинов устойчивы к спонтанному протеолизу [35, 37]. В работе [35] мы высказали гипотезу об участии ФСК в протеолизе ЦП в организме человека. Мы предположили, что, нейтрализовав или удалив из плазмы ФСК, можно получить непротеолизованный ЦП человека. Известно, что антикоагулянт гепарин связывает следующие ФСК: FXII, FXIIa, FXI, FXIa, прекалликреин, калликреин, FIX, FIXa и тромбин (FIIa) [36, 38]. Последние исследования показали, что иммобилизованный гепарин сорбирует из плазмы крови указанные ФСК как в присутствии антитромбина III [39], так и без него [40].

В наших предварительных экспериментах, направленных на поиски сравнительно простого и эффективного метода выделения недеградированного ЦП, хроматография исходной плазмы на колонках с аргинин-сефарозой (для удаления протромбина) и гепарин-сефарозой (для удаления ФСК) способствовала получению стабильного препарата ЦП человека [35]. Ранее была описана димерная форма ЦП с молекулярной массой 200 кДа [41], до сих пор получение 6 мг мономерного ЦП с помощью гель-фильтрации упоминалось в работе [31], однако, этот метод малоэффективен для выделения больших количеств ЦП. В настоящей работе описана обработка плазмы крови при выделении стабильного ЦП, обнаружено сродство ЦП к ПР, которое также было использовано для получения мономерного ЦП, и изучены некоторые свойства комплекса ЦП–ПР.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Образование комплекса ЦП–ПР.** При добавлении ПР кеты к сывороткам крови человека, кролика, собаки, дельфина, крысы и мыши, содержащейся в них ЦП формировал комплексы с ПР кеты. Образование таких комплексов наблюдали, изучая электрофоретическую подвижность ЦП-содержащей зоны при ПААГ-электрофорезе без SDS. Зону выявляли с помощью окраски *o*-дианизидином [42], применяемой для определения оксидазной активности ЦП (рис. 1а).

Можно видеть, что при мольном соотношении ЦП–ПР, равном 3 : 2 и 1 : 1, оксидазная активность ЦП делится между двумя зонами, окрашиваемыми *o*-дианизидином (рис. 1б, дорожки 3, 4). При соотношении ЦП–ПР = 1 : 2 оставалась только зона ЦП с уменьшенной подвижностью (рис. 1а, 5). Дальнейшее увеличение количества ПР, добавленного к ЦП, не привело к появлению новых зон с оксидазной активностью.

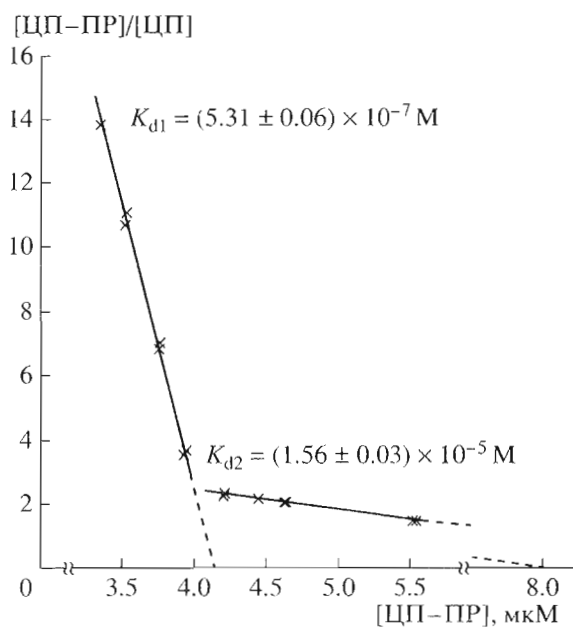


**Рис. 1.** Результаты ПААГ-электрофореза (без SDS, окраска *o*-дианизидином) (а): сыворотки кролика (10 мкл, 1, 2), дельфина (5 мкл, 3, 4), собаки (5 мкл, 5, 6), человека (5 мкл, 7, 8), крысы (1 мкл, 9, 10), мыши (10 мкл, 11, 12) в отсутствие ПР (1, 3, 5, 7, 9, 11) и в присутствии 1 мкг ПР; (б): ЦП человека (1.5 мкг, 2) и его смесей с ПР в отношении 2 : 1 (1), 3 : 2 (3), 1 : 1 (4), 1 : 2 (5), 1 : 4 (6); 1 : 8 (7).

Появление новой ЦП-содержащей зоны при добавлении ПР указывает на образование ими стабильного комплекса с меньшей, чем у исходного ЦП, электрофоретической подвижностью. Нами был сделан предварительный вывод о стехиометрии комплекса – ЦП–ПР = 1 : 2.

**Определение константы диссоциации ( $K_d$ ) комплекса ЦП–ПР.** Изучение связывания ЦП с ПР-сефарозой в равновесной системе позволило построить график в координатах Скэтчарда (рис. 2). Наличие на графике двух прямолинейных участков, говорит о существовании на ЦП двух типов центров связывания для ПР с константами диссоциации  $K_{d1} = (5.31 \pm 0.06) \times 10^{-7}$  М и  $K_{d2} = (1.56 \pm 0.03) \times 10^{-5}$  М. Если предположить, что ПР имеет лишь один участок связывания с ЦП, то путем экстраполяции прямолинейных участков графика на ось абсцисс можно определить наличие на ЦП двух высокоаффинных центров и четырех низкоаффинных.

**Диссоциация комплекса ЦП–ПР.** Комплекс ЦП с ПР диссоциировал при повышении ионной силы до 0.3 М NaCl или понижении pH до 4.7. Полианионы – ДНК, ЛПС и гепарин, взаимодействуют с ПР и вытесняют ЦП из комплекса ЦП–ПР, что видно по исчезновению зоны комплекса и появлению зоны ЦП при ПААГ-электрофорезе без SDS



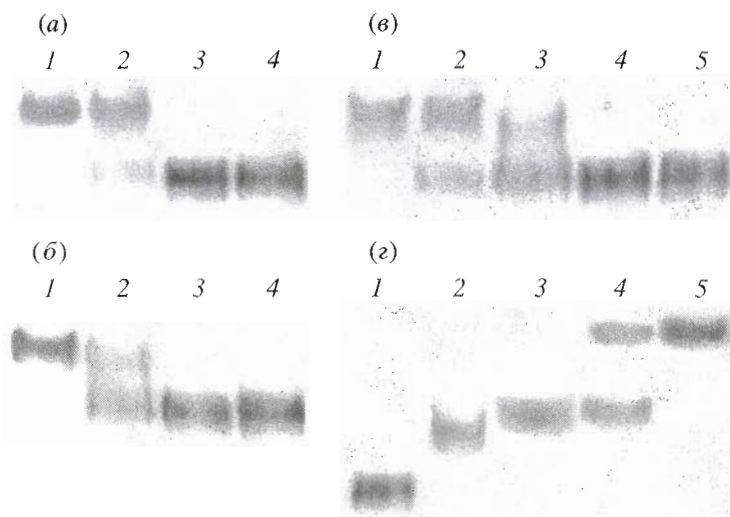
**Рис. 2.** Зависимость в координатах Скэтчарда отношения концентрации ЦП, связанного с ПР-сефарозой, к концентрации несвязанного ЦП от концентрации комплекса ЦП–ПР (4°C, PBS).

(рис. 3а–в). В отличие от перечисленных полианионов, poly(Lys) взаимодействует с ЦП (рис. 3г), вытесняя ПР из комплекса. Хотя poly(Lys) связывает ЦП, выделить его из плазмы крови, используя синтезированную нами poly(Lys)-сефарозу, не удалось (данные на приводятся), видимо, другие белки плазмы крови сорбируются на ней с большей эффективностью.

Ранее для изученного нами комплекса ЦП–ЛФ, образованного за счет электростатического взаимодействия [24], была определена  $K_d = 1.8 \times 10^{-6}$  М [23], что на порядок выше, чем  $K_{d1} = (5.31 \pm 0.06) \times 10^{-7}$  М, вычисленная для комплекса ЦП–ПР (рис. 2). Это говорит в пользу относительно большей прочности комплекса ЦП–ПР. Действительно, при денатурирующем ЭФ в ПААГ (рис. 4) видно, что при добавлении ПР к комплексу ЦП–ЛФ, ЦП обнаруживается в зоне с подвижностью, характерной для его комплекса с ПР, а не в зоне комплекса ЦП–ЛФ.

Антитела к ЦП не препятствуют взаимодействию ЦП с ПР (рис. 5). Вследствие образования комплекса с ПР происходило замедление ЦП в агарозе при движении в первом (горизонтальном) направлении, которое составило 12% расстояния между точкой нанесения и пиком свободного ЦП. Сходные изменения наблюдались при миграции ЦП во втором (вертикальном) направлении, когда пик его преципитации был на 10% ниже, чем пик свободного ЦП. Если бы комплекс диссоциировал в присутствии антител к ЦП, то пик преципитации ЦП после выхода из комплекса был бы равен

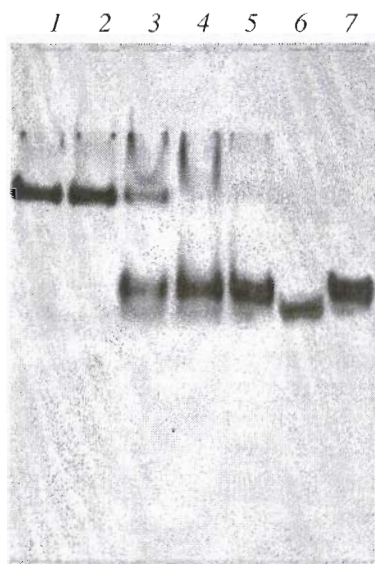




**Рис. 3.** Диссоциация комплекса ЦП–ПР (1.5 мкг ЦП + 0.1 мкг ПР, ЦП–ПР = 1 : 2, моль/моль) под действием ДНК (а), ЛПС (б), гепарина (в) и poly(Lys) (г). При ПААГ-электрофорезе без SDS (окраска *o*-дианизидином) к комплексу ЦП–ПР (а, б, в – дорожка 1, г – дорожка 2) добавлены: (а) ДНК – 0.02 (2), 0.04 мкг (3); (б) ЛПС – 0.01 (2), 0.05 мкг (3); (в) гепарин – 0.005 (2), 0.01 (3), 0.02 мкг (4); (г) poly(Lys) – 0.05 (3), 0.1 мкг (4). Дорожки 4 (а, б), дорожка 5 (в) и дорожка 1 (г): ЦП (1.5 мкг); дорожка 5 (г): ЦП + poly(Lys) (1.5 мкг + 0.1 мкг).

по высоте пика свободного ЦП (рис. 5а). В условиях ракетного иммуноэлектрофореза комплекс ЦП с ПР также не диссоциировал в присутствии антител к ЦП. В отличие от комплекса ЦП–ЛФ [24], преципитационный пик ЦП в присутствии ПР уменьшается (данные не приводятся).

**Ферроксидазная активность комплекса ЦП–ПР.** Ферроксидазная активность ЦП, т.е. скорость

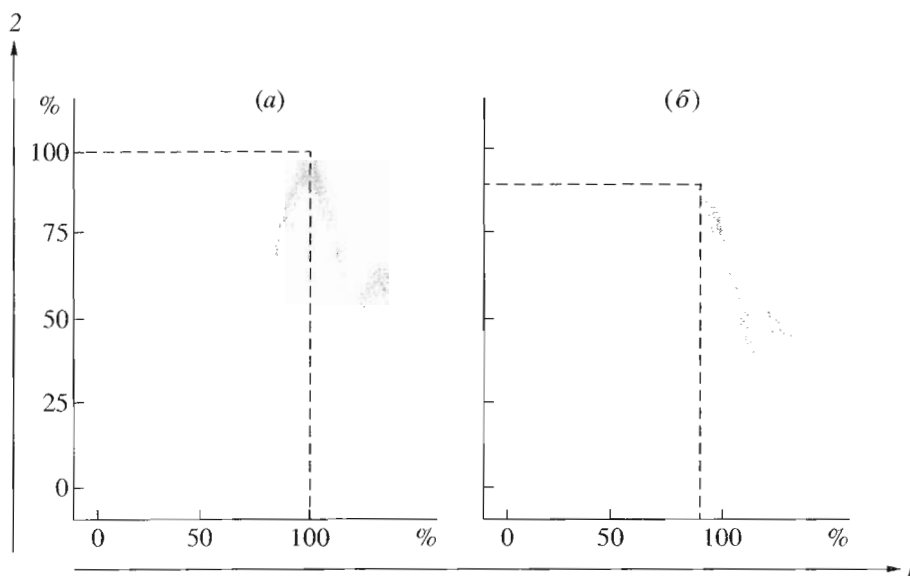


**Рис. 4.** Диссоциация комплекса ЦП–ЛФ (дорожка 1, 2 мкг ЦП + 3 мкг ЛФ, ЦП–ЛФ = 1 : 2, моль/моль) в ПААГ-электрофорезе без SDS (окраска *o*-дианизидином) при добавлении ПР 0.12 (2), 0.24 (3), 0.48 (4), 1 мкг (5). Дорожка 6 – ЦП (2 мкг), дорожка 7 – ЦП (2 мкг) + ПР (0.5 мкг).

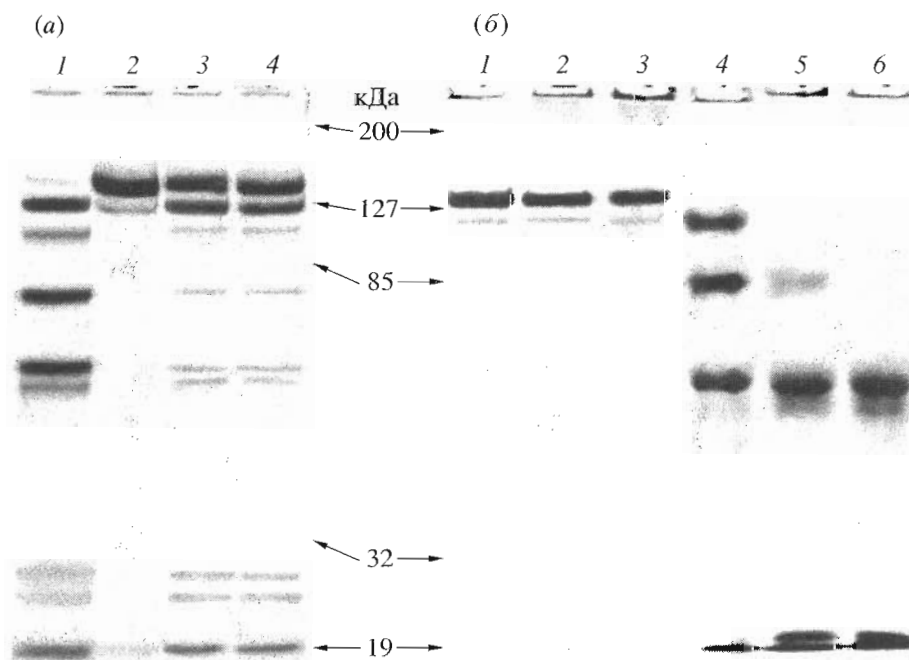
окисления  $Fe^{2+}$  до  $Fe^{3+}$  под действием ЦП, различалась у препаратов ЦП с разной степенью протеолитической фрагментации, обнаруживаемой при SDS-ПААГ-электрофорезе (рис. 6а). Добавление ПР к любому из использованных препаратов ЦП (как протеолизованному, так и нативному) увеличивало скорость окисления  $Fe^{2+}$  в 1.5 раза, причем добавление ПР свыше стехиометрического соотношения ЦП : ПР = 1 : 2 не вызывало дальнейшего увеличения активности ЦП (табл. 1). Увеличение ферроксидазной активности ЦП при добавлении к нему ПР, возможно, объясняется способностью полиаргининового кластера в составе ПР реагировать с отрицательно заряженным С-концевым участком в молекуле ЦП и таким образом изменять структуру активного центра фермента по типу аллостерического взаимодействия.

За одно и то же время фрагментированный ЦП окислял меньшие количества  $Fe^{2+}$ , чем нативный фермент. Как показали предыдущие исследования [43], ионы меди в ЦП и компоненты его белковой глобулы взаимно обеспечивают структурную стабильность каталитического центра. При ограниченном протеолизе ЦП в первую очередь расщепляется пептидная связь, соединяющая С-концевой фрагмент (19 кДа) с остальной частью молекулы. Этот фрагмент содержит 3 из 4 ионов  $Cu^{2+}$  каталитического центра [44, 45], поэтому ограниченный протеолиз не может не влиять на активный центр. По-видимому, этим и объясняется снижение ферроксидазной активности протеолизованного ЦП.

**Характеристики ЦП, полученного на ПР-сефарозе.** ЦП, полученный на ПР-сефарозе из 200 мл



**Рис. 5.** Перекрестный иммуноэлектрофорез ЦП (0.5 мкг, *a*) и комплекса ЦП–ПР (1 : 2) (0.5 мкг ЦП + ПР 0.03 мкг, *б*). В горизонтальном направлении (1) – разделение в 1%-ной агарозе; в вертикальном (2) – преципитация в 1%-ной агарозе, содержащей антитела к ЦП (0.5 мг на 1 мл агарозы); окраска Кумасси R-250. На осях – расстояние от точки нанесения до пика ЦП без ПР (в процентах).



**Рис. 6.** Протеолитическая фрагментация препаратов ЦП (20 мкг) по данным SDS-ПААГ-электрофореза. Окраска Кумасси R-250. (*a*). Препарат коммерческого ЦП (1), фракции ЦП с ПР-сефарозы 0.33 М NaCl при высокой скорости элюции (2); 1 М (3) и 4 М NaCl (4) при низкой скорости элюции. (*б*). Стабильность препаратов ЦП при хранении при 37°C. Препарат ЦП (фракция элюата 0.33 М NaCl), пропущенный через гепарин-сефарозу после инкубации в течение 7 (1), 35 (2) и 70 сут (3). Контрольный препарат ЦП из плазмы, не обработанной аргинин- и гепарин-сефарозой, после инкубации в течение 7 (4), 35 (5) и 70 сут (6).

цитратной плазмы, которую предварительно пропускали через колонки с аргинин- и гепарин-сефарозой (см. “Эксперимент. часть”) для освобождения от протромбина и ФСК, был гомогенен по данным ПААГ-электрофореза без SDS (рис. 7).

Димерные 200-кДа формы ЦП, присутствующие в коммерческих препаратах этого белка (рис. 7, 4), вероятнее всего, образуются в результате ковалентной сшивки двух полипептидных цепей [41]. При SDS-ПААГ-электрофорезе двух зон с по-

**Таблица 1.** Влияние ПР на скорость феррооксидазной реакции ЦП

Препарат ЦП	Скорость, мкмоль Fe <sup>2+</sup> /мин 1 мг ЦП		
	Без ПР	ЦП : ПР = 1 : 2, моль/моль	ЦП : ПР = 1 : 3, моль/моль
Стабильный, полученный на ПР-сефарозе*	0.118 ± 0.004	0.161 ± 0.005	0.163 ± 0.004
Коммерческий**	0.086 ± 0.004	0.125 ± 0.005	0.122 ± 0.004

\* Дорожка 2, рис. 6а.

\*\* Дорожка 1, рис. 6а.

движностью “В” они соответствовали 200-кДа белкам, т.е. димерным формам ЦП [41] (данные не приводятся). При выделении ЦП на ПР-сефарозе использование 0.075 М NaCl (рН 7.4) для элюции примесных белков и увеличение скорости элюции ЦП буфером с 0.33 М NaCl (рН 7.4) позволяло получать мономерный ЦП (рис. 7, 1), следы димеров выявлялись только при длительной (12 ч) окраске *o*-дианизидином и не окрашивались Кумасси R-250 (рис. 7, 5). Большая часть димеров оставалась на колонке со смолой и десорбировалась 1 и 4 М NaCl (рН 7.4) при низкой скорости элюции (рис. 7, 2, 3). Незначительная часть димеров десорбировалась с ПР-сефарозы при уменьшении скорости элюции ЦП буфером с 0.33 М NaCl (рН 7.4) от 3 до 0.5 мл/мин на 3 см<sup>2</sup> сечения колонки (данные не приводятся). В исходной плазме и плазме после хроматографии на ар-

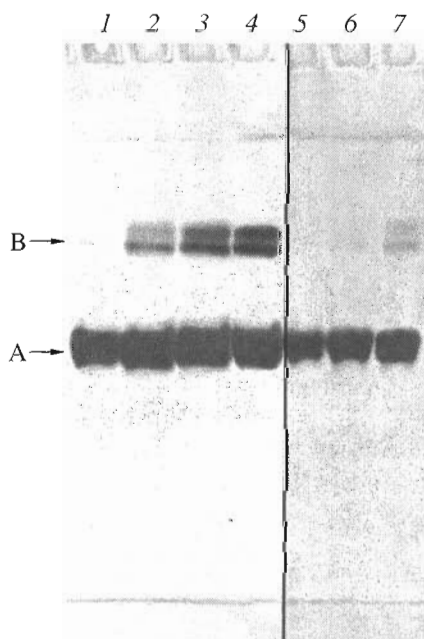
гинин-сефарозе и гепарин-сефарозе димеры ЦП не выявлялись, однако, их можно обнаружить в элюате после хроматографии на DEAE-сефадексе при выделении ЦП (данные не приводятся).

Фракция ЦП, полученная элюцией с ПР-сефарозы 0.33 М NaCl (рН 7.4), на 95% была представлена 132-кДа зоной по данным SDS-ПААГ-электрофореза (рис. 6а, дорожка 2). Полученный препарат ЦП был стабилен при инкубации в PBS при 37°C более 2 мес., т.е. при SDS-ПААГ-электрофорезе выявлялась преобладающая 132-кДа зона (рис. 6б, 1, 2, 3). ЦП во фракциях, элюированных 1 и 4 М NaCl, содержал димеры, и, в отличие от фракции 0.33 М NaCl (практически не содержала димеров), выделялся протеолизированным на крупные фрагменты (рис. 6а, дорожки 3, 4). Принадлежность к ЦП выявленных при SDS-ПААГ-электрофорезе всех минорных фрагментов была подтверждена с помощью Вестерн-блота.

Контрольный препарат ЦП, полученный из плазмы, не подвергнутой колоночной хроматографии на гепарин- и аргинин-сефарозе, подвергался спонтанному протеолизу – уже через 1 неделю инкубации при 37°C проверка с помощью SDS-ПААГ-электрофореза не обнаруживала зоны 132-кДа (рис. 6б, дорожка 4).

Препарат ЦП, выделенный из больших объемов плазмы (см. “Эксперимент. часть”), не отличался по характеристикам от препарата, выделенного на ПР-сефарозе из плазмы, пропущенной через колонку с аргинин-сефарозой и гепарин-сефарозой. Однако метод получения ЦП из объемов плазмы, превышающих 200 мл, до некоторой степени позволил обозначить целесообразность применения аргинин- и гепарин-сефарозы. Электрофорез элюата, собранного при хроматографии ЦП на аргинин-сефарозе, показал наличие 72-кДа белка, выявляемого антителами к FII (протромбину). Аналогично, в элюате с гепарин-сефарозы электрофорез выявил 40-кДа белок, связывавший антитела к FII (перекрестная реакция с тромбином – FIIa).

Получение стабильного ЦП человека осложняется его чрезвычайной чувствительностью к протеолизу [46, 47]. Существует гипотеза о том, что тромбин (FIIa) является протеиназой, деградирующей ЦП [39]. Однако удаление с помощью аргинин-сефарозы одного FII из плазмы крови не позволило нам получить стабильный препарат ЦП



**Рис. 7.** Гомогенность препаратов ЦП (25 мкг), полученных на ПР-сефарозе. ПААГ-электрофорез без SDS (1–4 – окраска *o*-дианизидином, 5–7 – окраска Кумасси R-250). А – подвижность мономерного ЦП, В – подвижность димеров. 1, 5 – ЦП (фракция элюата 0.33 М NaCl); 2, 6 – ЦП (1 М NaCl); 3, 7 – ЦП (4 М NaCl); 4 – препарат коммерческого ЦП.



Таблица 2. Постадийная очистка ЦП при выделении из больших объемов плазмы

Стадия и фракция	Стабильность*, сут	$A_{610}/A_{280}$	ЦП, мг**	Белок, мг***	ЦП/белок, мг/мг	Очистка (раз)	Выход, %
1. Цитратная плазма (2000 мл)	–	–	600	191 000	0.003	–	100
2. После DEAE-сефадекса	7	0.006	450	2300	0.196	65	75
3. После QAE-сефадекса	7	0.020	350	690	0.507	169	58.3
4. Спиртовое осаждение	7	0.033	300	380	0.790	263	50
5. Элюат после аргинин-сефарозы	9	0.039	280	310	0.903	301	46.7
6. Фракция 0.33 M NaCl с ПР-сефарозы	9	0.052	260	261	0.996	332	43.3
7. Элюат после гепарин-сефарозы	Более 60	0.052	250	251	0.996	332	41.7

\* Длительность сохранения при 37°C 132-кДа зоны.

\*\* По окислению *n*-фенилендиамина [52].

\*\*\* По методу Лоури-Фолина [53].

человека [35]. Объяснить частичную протеолитическую деградацию ЦП, элюируемого с аргинин-сефарозы, действием тромбина нельзя, так как в препаратах ЦП, полученных без стадий хроматографии на аргинин- и гепарин-сефарозе, олигонуклеотидный ингибитор тромбина d(GGTTGGTGTGGTTGG) [48] не подавлял протеолиз ЦП – 132-кДа зона в SDS-ПААГ-электрофорезе исчезала через 9 сут инкубации белка при 37°C (данные не приводятся).

Соотношение  $A_{610}/A_{280}$  является наиболее адекватным критерием оценки чистоты препаратов ЦП.  $A_{610}$  обусловлено ионами “голубой меди” (или ионами меди I типа). Именно их сохранность в ЦП, с одной стороны, и отсутствие белковых примесей в препарате с другой, обеспечивают соотношение  $A_{610}/A_{280}$  0.045 и выше [31]. Препарат ЦП, полученный из количеств плазмы, превышающих 200 мл, после хроматографии на ПР-сефарозе имел соотношение  $A_{610}/A_{280}$ , равное 0.052, что соответствует высоко очищенному ЦП [31]. Таким же соотношением  $A_{610}/A_{280}$  было и в препарате ЦП, когда после хроматографии на ПР-сефарозе его пропускали через колонку с гепарин-сефарозой (табл. 2). Однако, если в первом препарате белковая 132-кДа зона, соответствующая целостной молекуле ЦП, полностью исчезала через 9 сут инкубации при 37°C, то второй препарат ЦП оставался стабильным более 2 мес. Данные об исчезновении 132-кДа зоны в препаратах ЦП получены при SDS-ПААГ-электрофорезе проб, отбирившихся через каждые 2 сут в течение первых двух недель инкубации при 37°C и далее – через каждые 7 сут (суммированы в табл. 2). Подобно ЦП, полученному из 200 мл плазмы, не подвергнутой хроматографии через аргинин- и гепарин-сефарозу, ЦП, не пропущенный через гепарин-сефарозу (табл. 2, стадия б), распался за 2 мес. до низкомолекулярных фрагментов, тогда как в обработанном препарате преобладающая 132-кДа зона выявлялась и на 70-е сут инкубации при 37°C.

В целом наши данные подтверждают, что антикоагулянт гепарин является лучшим ингибито-

ром протеолиза ЦП. Очевидно, полученный нами препарат ЦП не содержит протеиназ. Об этом можно судить по результатам его инкубации в течение более чем 2 месяцев при 37°C, так и не вызвавшей протеолитической деградации белка. До сих пор был описан препарат, стабильный в течение 4 недель [31].

Таким образом, последовательное применение аргинин- и гепарин-сефарозы при выделении ЦП позволяет получить стабильный препарат этого белка, а ПР-сефароза является достаточно емким сорбентом ЦП, который, кроме того, позволяет выделять ЦП в мономерной форме.

В предыдущих работах [23, 49] мы получили данные об отсутствии видоспецифичности при образовании комплексов ЦП и ЛФ разных видов животных в любых парных комбинациях. Исследование, проведенное в настоящей работе, доказало образование комплексов церулоплазминами разных видов животных (человека, кролика, собаки, дельфина, крысы и мыши) с ПР кеты (рис. 1а). Вероятным объяснением этого феномена является присутствие в ЦП разных млекопитающих эволюционно консервативных (табл. 3), сходных по заряду участков для связывания с положительно заряженными кластерами аминокислот. В трехмерной структуре ЦП человека обозначенные нами последовательности (табл. 3), удаленные друг от друга в составе полипептидной цепи, образуют общую отрицательно заряженную поверхность на глобуле ЦП (согласно программе Sn3D 4.0 при анализе структуры ЦП [13]). В пользу нашего предположения говорит недавно обнаруженное специфическое взаимодействие ЦП с нейрпептидом гипоталамуса PACAP 38, которое обеспечивается C-концевым декапептидом последнего: K<sup>29</sup>-R-Y-K-Q-R-V-K-N-K<sup>38</sup> [19]. Этот кластер из всех белков плазмы избирательно взаимодействует с ЦП, сходные по заряду аминокислотные кластеры были обнаружены нами в белках, взаимодействующих с ЦП [14, 15, 23]. При анализе их последовательностей можно выявить положительно заряженные

**Таблица 3.** Отрицательно заряженные аминокислотные последовательности, гомологичные в ЦП человека, крысы и мыши (база данных GenBank)

Аминокислотная последовательность*	Домен	Положение в белке	Организм***
EPEKVDKDNEDFQE**	2	242–255	<i>H. s.</i>
EPEKVDKDNEDFQE (100, 100)		241–254	<i>R. n.</i>
EPEKVDKDNEDFQE (100, 100)		241–254	<i>M. m.</i>
DENESLLLED**	4	586–595	<i>H. s.</i>
DENESLLLED (90, 100)		580–589	<i>R. n.</i>
DENESLLLED (90, 100)		581–590	<i>M. m.</i>
DQVDKEDEDFQE**	4	605–616	<i>H. s.</i>
ENVDKEDDFQE (83, 100)		599–610	<i>R. n.</i>
DQVDKEDEDFQE (100, 100)		600–611	<i>M. m.</i>
EVEWDYSPQREWE**	5	740–752	<i>H. s.</i>
EVEWDYSPSRDWE (85, 92)		734–746	<i>R. n.</i>
EVEWDYSPSR <del>A</del> WE (85, 85)		735–747	<i>M. m.</i>
DENESWYLDD**	6	924–933	<i>H. s.</i>
DENESWYLDD (100, 100)		919–928	<i>R. n.</i>
DENESWYLDD (100, 100)		920–929	<i>M. m.</i>
DHPEKVNKDDEEFIE**	6	940–955	<i>H. s.</i>
DHPEK <del>N</del> KDNEEFIE (87, 87)		934–949	<i>R. n.</i>
<u>DHPEKVNKDNEEFIE</u> (87, 93)		936–351	<i>M. m.</i>

\* В скобках указана степень гомологии (в процентах, без учета, с учетом консервативности негомологичных аминокислот (жирный шрифт, подчеркнуты)).

\*\* Последовательности, с которыми производили сравнение.

\*\*\* *H. s.* – *Homo sapiens*, *R. n.* – *Rattus norvegicus*, *M. m.* – *Mus musculus*.

кластеры аминокислот: K<sup>374</sup>-R-K-G-R<sup>378</sup> в молекуле миелопероксидазы, S<sup>20</sup>-R-R-R-L<sup>24</sup>, R<sup>59</sup>-R-W-E-K<sup>63</sup> и R<sup>136</sup>-E-K-E-A-K-R-N-R<sup>144</sup> в молекуле протеина С, R<sup>2</sup>-R-R-R<sup>5</sup> в молекуле ЛФ.

Полученные в данной работе результаты доказывают возможность выделения непротеолизованного ЦП, стабильного при хранении в течение длительного времени. Удаление из плазмы крови ряда ФСК позволило нам, с одной стороны, получать непротеолизированный ЦП человека и, с другой стороны, обеспечило условия для его длительного хранения без деградации.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали конъюгат пероксидазы хрена и антител осла к антителам кролика, сефарозу 4В, DEAE-сефадекс А-50, QAE-сефадекс А-50, CM-сефарозу (Amersham Biosciences, Вели-

кобритания), Chelex 100, Твин-20, сухое молоко, окрашенные маркеры молекулярной массы (Bio-Rad, США), бромциан (Fluka, Швейцария), триэтиламин, соль Мора (Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O), EDTA (Merck, Германия), акриламид, аргинин, метиленисакриламид, тетраметилэтилендиамин (Reanal, Венгрия), полный и неполный адъюванты Фрейнда, азид натрия (NaN<sub>3</sub>), глицерин, Кумасси R-250, меркаптоэтанол, нитроцеллюлозу (NC-2), персульфат аммония, Трис (Serva, Германия), глицин, *o*-дианизидин, ДНК цыпленка, SDS, липополисахариды (ЛПС) *Salmonella typhimurium*, poly(Lys) (M 500 кДа), протамин кеты (M 4 кДа), реактив Фолина-Чокальтеу, *n*-фенилендиамин, фенилметилсульфонилфторид (PMSF), 3-(2-пиридил)-5,6-бис(4-фенилсульфоновая кислота)-1,2,4-триазин (феррозин), 4-хлор-1-нафтол (Sigma, США), ингибитор тромбина d(GGTTGGTGTGGTTGG) (ЛИТЕХ, Россия), гепарин (Spofa, Польша). PBS (phosphate buffer saline) представлял собой 0.15 M NaCl, pH 7.4, 1.9 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/8.1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Ингибиторы протеолиза ЦП представляли собой растворы 0.5 M EDTA-NaOH (pH 8.0) и 0.1 M PMSF в этаноле.

ЛФ выделяли из грудного молока [23], коммерческий препарат ЦП выделен в НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера [32]. SDS-ПААГ-электрофорез проводили для определения молекулярной массы белков [50], миграцию ЦП наблюдали в ПААГ-электрофорезе без SDS [51], ЦП в ПААГ специфически окрашивали *o*-дианизидином (тест на оксидазную активность [42]), определение содержания ЦП в пробах проводили по окислению *n*-фенилендиамина [52], определение содержания общего белка в пробах – по методу Лоури-Фолина с использованием коммерческого ЦП в качестве стандарта [53], перекрестный иммуноэлектрофорез проводили для наблюдения за диссоциацией комплекса ЦП-ПР антителами [54]. Для доказательства принадлежности зон к ЦП и к протромбину (PII) при SDS-ПААГ-электрофорезе проводили Вестерн-блоттинг [55]. После трехкратной иммунизации кроликов по 100 мкг белка (после препаративного электрофореза без SDS из ПААГ вырезали белковую зону для иммунизации) у животных забирали антисыворотку к ЦП и к протромбину (PII) [56].

**Образование комплекса ЦП-ПР** изучали электрофоретически (ПААГ-электрофорез без SDS), наблюдая поведение смеси ЦП и ПР в известных молярных соотношениях. Минимальное количество ПР, вызывавшее полное исчезновение зоны с подвижностью неизменного фермента, принималось за стехиометрическое по отношению к использованному в опыте ЦП.

**Ферроксидазную активность ЦП** оценивали, измеряя скорость окисления Fe<sup>2+</sup>. В основе методики лежит спектрофотометрическое определение Fe<sup>2+</sup> при реакции с феррозином [57]. В нашей



модификации реакционная смесь включала 5 мл буфера 0.089 М  $\text{AcONa}/0.011$  М  $\text{AcOH}$ , pH 5.5, содержащего 75, 100, 125 или 150 мкг ЦП и такое количество ПР, которое обеспечивало определенный молярный избыток по отношению к ЦП (ЦП : ПР = 1 : 2, 1 : 3), 50 мкл свежеприготовленного в концентрации 1.5 мг/мл раствора соли Мора  $(\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O})$  в 0.1 М натрий-ацетатном буфере, pH 5.5. Реакцию проводили при 20°C. После добавления раствора соли Мора ( $\text{Fe}^{2+}$ ) и быстрого перемешивания из реакционной смеси через определенные промежутки времени (2, 4, 6 и 8 мин) отбирали по 1 мл раствора. Останавливали реакцию, добавляя к отобранной пробе 10 мкл 18 мМ феррозина. По убыванию во времени количества  $\text{Fe}^{2+}$ , определяемого спектрофотометрически ( $\epsilon_{564} 27900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), рассчитывали скорость ферроксидазной реакции относительно количества фермента, использованного в опыте. Контролем служила смесь со спонтанно окисленным железом и ЦП, изначально ингибированным  $\text{NaN}_3$  (до 0.1 мкМ). Белковые растворы и буферы перед использованием пропускали через колонку с Chelex 100 (BioRad, США). Среднее отклонение величины оптического поглощения раствора феррозина по четырем опытам не превышало 2%.

**Иммобилизация гепарина, аргинина и протамина на BrCN-активированной сефарозе.** К 5 мл сефарозы 4В, последовательно отмытой на стеклянном фильтре предварительно охлажденными до -20°C 10 мл 30% ацетона и 10 мл 60% ацетона, добавляли 5 мл 60% ацетона, 1 мл раствора  $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$  (150 мг/мл ацетона) и 1 мл раствора BrCN (100 мг/мл ацетона). После 5 мин активации при -20°C смолу отмывали на стеклянном фильтре охлажденными до -20°C 10 мл 60% ацетона, 10 мл 30% ацетона и 50 мл дистиллированной воды, закисленной HCl до pH 3.0 при 0°C. Для сшивки со смолой к ней добавляли равный объем PBS, содержащего лиганд (гепарин или аргинин 10 мг на 1 мл смолы). Реакцию проводили в течение 12 ч при постоянном перемешивании при 4°C. Гепарин-сефарозу, аргинин-сефарозу после синтеза обрабатывали 1 М NaCl и 0.02 М Трис/0.18 М глицин, pH 8.0. ПР-сефарозу (3 мг ПР на 1 мл смолы) после синтеза обрабатывали 0.2 М Трис-глицином, pH 8.0, 0.1 М  $\text{NaHCO}_3$  и 0.018 М  $\text{AcONa}/0.082$  М  $\text{AcOH}$ , pH 4.0. Полученные смолы хранили в PBS с добавлением  $\text{NaN}_3$  до концентрации 0.02%.

**Концентрацию ЦП** определяли спектрофотометрически, используя для гомогенного препарата коэффициенты  $a_{280} = 1.61$  мл/мг на 1 см,  $a_{610} = 0.0741$  мл/мг на 1 см [58, 59]. Соотношение  $A_{610}/A_{280} > 0.045$  служило критерием получения нативного препарата ЦП [31]. Для гомогенного препарата ЛФ использовали коэффициент  $a_{280} = 1.46$  мл/мг на 1 см [23].

**Константу диссоциации ( $K_d$ )** определяли добавлением к 1 мл ПР-сефарозы (3 мг ПР на 1 мл смолы) растворов ЦП (конечные концентрации 3–5.5 мкМ) в PBS при 4°C. После достижения равновесия при постоянном перемешивании свободный ЦП определяли спектрофотометрически по величине  $A_{610}$  [59]. Количество ЦП, связанного с ПР-сефарозой, вычисляли по разности известного количества ЦП, добавленного к ПР-сефарозе, и ЦП, определенного в супернатанте. График в координатах Скэтчарда строили по зависимости отношения количества ЦП, связанного с ПР-сефарозой, и несвязанного ЦП от концентрации образовавшегося комплекса. По углам наклона прямолинейных участков зависимости на графике определяли значения  $K_d$  разных центров связывания. Количество центров определяли экстраполяцией на ось абсцисс прямолинейных участков на графике – по отношению количества полученного комплекса ЦП–ПР к количеству ПР, иммобилизованного на смоле. Среднее отклонение по трем опытам не превышало 2%.

**Для выделения ЦП** к 200 мл цитратной плазмы (0.9% цитрата натрия) добавляли EDTA (до концентрации 10 мМ) и PMSF (до 0.1 мМ), центрифугировали 30 мин при 450 g (4°C). Плазму последовательно пропускали через колонки с: 1) аргинин-сефарозой (2.5 × 10 см) – для удаления протромбина (FII), что контролировалось иммуноэлектрофорезом и Вестерн-блоттингом; 2) гепарин-сефарозой (3 × 5 см) – для удаления FXI, FXII, прекалликреина, тромбина (FIIa) и FIXa [38–40]. Обработанную таким образом плазму наносили на колонку с ПР-сефарозой (1.5 × 4 см), уравновешенную PBS. Промывали от неспецифически связавшихся белков 500 мл 0.075 М NaCl (pH 7.4). Элюцию с колонки производили 30 мл 0.33 М NaCl (pH 7.4) при высокой скорости (3 мл/мин на 3 см<sup>2</sup> сечения колонки), 10 мл 1 М NaCl (pH 7.4) и 10 мл 4 М NaCl при низкой (0.5 мл/мин на 3 см<sup>2</sup> сечения колонки). Основное количество ЦП элюировали с ПР-сефарозы 0.33 М NaCl (pH 7.4). Небольшое количество ЦП содержалось также во фракциях 1 М NaCl (pH 7.4) и 4 М NaCl. Полученный ЦП имел соотношение  $A_{610}/A_{280} = 0.050$ , что соответствует препаратам ЦП высокой степени очистки [31]. Выход ЦП составил 90%. ПР-сефароза сорбировала около 20 мг ЦП на 1 мл смолы. Контрольный препарат, выделенный из плазмы, не обработанной аргинин- и гепарин-сефарозой, при элюции с ПР-сефарозы 0.33 М NaCl (pH 7.4) имел соотношение  $A_{610}/A_{280} = 0.050$  и использовался для наблюдения за сохранением 132-кДа зоны при инкубации при 37°C.

**Для выделения ЦП из больших объемов плазмы** вышеописанную методику модифицировали: к 2000 мл цитратной плазмы (0.9% цитрата натрия) добавляли EDTA (до 10 мМ) и PMSF (до 0.1 мМ), центрифугировали 30 мин при 450 g (4°C). Полу-

ченную плазму разбавляли в 2 раза натрий-ацетатным буфером pH 5.5 до конечной концентрации 0.05 М и смешивали с 10 г DEAE-сефадекса А-50 в течение 2 ч при 4°C. Зеленый осадок смолы набивали в колонку (5 × 15 см). ЦП элюировали линейным градиентом (0.05 → 0.5 М) AcOH-AcONa, pH 5.5 (общий объем 2000 мл). Фракции, содержащие ЦП, объединяли, разбавляли в 2 раза 0.01 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.4) и наносили на колонку с QAE-сефадексом А-50 (5 × 10 см), промывали 500 мл PBS и элюировали 0.4 М NaCl (pH 7.4).

Фракции, содержащие ЦП, объединяли и подвергали спиртовому осаждению. При охлаждении во льду к раствору ЦП добавляли равный объем смеси C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>ОН-CHCl<sub>3</sub> (9 : 1 по объему). Помутневший вследствие осаждения примесей раствор центрифугировали 30 мин при 1000 g (4°C). К супернатанту добавляли 1/2 объема смеси C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>ОН-CHCl<sub>3</sub> (9 : 1) и центрифугировали 30 мин при 1000 g (4°C). Осадок ЦП растворяли в 10 мл PBS, не растворившиеся примеси удаляли центрифугированием в течение 30 мин при 1000 g (4°C). Синий супернатант пропускали через колонку с аргинин-сефарозой (3 × 10 см).

Обработанный таким образом ЦП наносили на колонку с ПР-сефарозой (2 × 10 см), уравновешенной PBS. Промывали 200 мл 0.075 М NaCl (pH 7.4). Элюцию с колонки производили 50 мл 0.33 М NaCl (pH 7.4) при высокой скорости (3 мл/мин на 3 см<sup>2</sup> сечения колонки) и 10 мл 1 М NaCl (pH 7.4) при низкой (0.5 мл/мин на 3 см<sup>2</sup> сечения колонки). Во фракции 1 М NaCl (pH 7.4) содержалось незначительное количество ЦП. Элюат 0.33 М NaCl диализовали против PBS и пропускали через колонку с гепарин-сефарозой (2 × 4 см). Выход ЦП составил 42%. В табл. 2 суммированы данные об очистке ЦП в процессе выделения.

Для анализа гомологичных последовательностей ЦП человека, крысы и мыши использовали базу данных GenBank, для анализа расположения гомологичных последовательностей в трехмерной структуре ЦП человека [13] – программу Cn3D 4.0 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

## БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено при поддержке РФФИ (гранты № 03-04-49201, 02-04-49698), МАС (№ 03-04-06960) и НШ 1730.2003.4.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Osaki S. // J. Biol. Chem. 1966. V. 241. P. 5053–5059.
- Osaki S., Johnson D.A., Frieden E. // J. Biol. Chem. 1966. V. 241. P. 2746–2751.
- Wallas E., Lovstad R.A., Wallas D. // Biochem. J. 1964. V. 92. P. 18–19.
- Bannister J.V., Bannister W.H., Hill A.O., Mahood J.F., Willson R.L., Wolfenden B.S. // FEBS Lett. 1980. V. 188. P. 127–129.
- Yang F., Friedrichs W.E., de Graffenried L. // Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 1996. V. 14. P. 161–169.
- Chen L., Dentchev T., Wong R., Hahn P., Wen R., Bennett J., Dunaief J.L. // Molecular Vision. 2003. V. 9. P. 151–158.
- Whanger P.D., Weswig P.H. // J. Nutr. 1970. V. 100. P. 341–348.
- Справочник VIDAL. М.: Изд-во АстраФармСервис, 2003.
- Shimizu M. // Transfusion. 1979. V. 19. P. 742–748.
- Saenko E.L., Skorobogat'ko O.V., Tarasenko P., Romashko V., Zhuravetz L., Zadorozhnaya L., Senjuk O.F., Yaropolov A.I. // Immunol. Invest. 1994. V. 23. P. 99–114.
- Бердинских Н.К., Антоненко С.Г., Волощенко Ю.В., Чебатареv Е.Е., Гаврич И.Н. // Радиобиология. 1984. Т. 24. С. 199–203.
- Сенюк О.Ф., Скоробогатько О.В., Тарасенко П.Д., Ромашко В.В., Журавец Л.А., Задорожная Л.В., Ярополо А.И. // Биохимия. 1994. Т. 59. С. 1113–1118.
- Zaitseva I., Zaitsev V., Card G., Moshkov K., Bax B., Ralph A., Lindley P. // J. Biol. Inorg. Chem. 1996. V. 1. P. 15–23.
- Walker F.J., Fay P.J. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 1834–1836.
- Segelmark M., Persson B., Hellmark T., Wieslander J. // Clin. Exp. Immunol. 1997. V. 108. P. 167–174.
- van Eden M.E., Aust S.D. // Arch. Biochem. Biophys. 2000. V. 381. P. 119–126.
- Juan S.H., Aust S.D. // Arch. Biochem. Biophys. 1998. V. 355. P. 56–62.
- Reilly C.A., Sorlie M., Aust S.D. // Arch. Biochem. Biophys. 1998. V. 354. P. 165–171.
- Tams J.W., Johnsen A.H., Fahrenkrug J. // Biochem. J. 1999. V. 341. P. 271–276.
- Patel B.N., David S. // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 20185–20190.
- Jeong S.Y., David S. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 27144–27148.
- Hilton M., Spenser D.C., Ross P., Ramsey A., McArde H.J. // Biochem. Biophys. Acta. 1995. V. 1245. P. 153–160.
- Zakharova E.T., Shavlovski M.M., Bass M.G., Gridasova A.A., Pulina M.O., De Filippis V., Beltramini M., Di Muro P., Salvato B., Fontana A., Vasilyev V.B., Gaitskhoki V.S. // Arch. Biochem. Biophys. 2000. V. 374. P. 222–228.
- Pulina M.O., Zakharova E.T., Sokolov A.V., Shavlovski M.M., Bass M.G., Solovyov K.V., Kokryakov V.N., Vasilyev V.B. // Biochem. Cell. Biol. 2002. V. 80. P. 35–39.
- Bullen J.J., Rogers H.J., Leigh C. // Br. Med. J. 1972. V. 1. P. 69–75.
- Klebanoff S.J. // Arch. Biochem. Biophys. 1992. V. 295. P. 302–308.
- van Berkel P.H., Geerts M.E., van Veen H.A., Mericskay M., de Boer H.A., Nuijens J.H. // Biochem. J. 1997. V. 328. P. 145–151.

28. *Horrow J.C.* // *Int. Anesthesiol. Clin.* 1985. V. 23. P. 133–144.
29. *Pharo G.H., Horrow J., van Riper D.F., Levy J.H.* // *Anesth. Analg.* 1994. V. 78. P. 181–184.
30. *Holmberg C.G., Laurell C.B.* // *Acta Chem. Scand.* 1948. V. 2. P. 550–556.
31. *Ehrenwald E., Fox P.L.* // *Arch. Biochem. Biophys.* 1994. V. 309. P. 392–395.
32. *Prozorovski V.N., Rashkovetski L.G., Vasiliev V.B., Shavlovskii M.M., Neifakh S.A.* // *Int. J. Pept. Prot. Res.* 1982. V. 19. P. 40–53.
33. *Musci G., Bonaccorsi di Patti M.C., Petruzzelli R., Giartosio A., Calabrese L.* // *Biometals.* 1996. V. 9. P. 66–72.
34. *Bianchini A., Musci G., Calabrese L.* // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 20265–20270.
35. *Захарова Е.Т., Соколов А.В., Соловьев К.В., Пулина М.О., Шавловский М.М., Васильев В.Б.* // III съезд биохимического об-ва, 26.06–01.07 / С.-Пб.: Изд-во Фарос Плюс, 2002. С. 158.
36. *Зубаилов Д.М.* Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования. Казань: Изд-во ФЭн, 2002.
37. *Bonaccorsi di Patti M.C., Galtieri A., Giartosio A.A.* // *Comp. Biochem. Physiol.* 1992. V. 103. P. 183–188.
38. *Olson S.T., Halvorson H.R., Bjork I.* // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. P. 6342–6352.
39. *Cornelius R.M., Sanchez J., Olsson P., Brash J.L.* // *J. Biomed. Mater. Res.* 2003. V. 67. P. 475–483.
40. *Badellino K.O., Walsh P.N.* // *Biochemistry.* 2001. V. 40. P. 7569–7580.
41. *Sato M., Schilky M., Stokert R.J., Morell A.G., Sternlieb I.* // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. P. 2533–2537.
42. *Owen C.A., Smith H.* // *Clin. Chim. Acta.* 1961. V. 6. P. 441–444.
43. *Vassiliev V.B., Kachurin A.M., Beltramini M., Rocco G.P., Salvato B., Gaitskhoki V.S.* // *J. Inorg. Biochem.* 1997. V. 65. P. 167–174.
44. *Ryden L., Bjork I.* // *Biochemistry.* 1976. V. 15. P. 3411–3417.
45. *Ryden L.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1982. V. 79. P. 6767–6771.
46. *Ryden L.* // *FEBS Lett.* 1971. V. 18. P. 321–325.
47. *Sang Q.A.* // *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1995. V. 37. P. 573–581.
48. *Tsiang M., Gibbs C.S., Griffin L.C., Dunn K.E., Leung L.L.K.* // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 19370–19376.
49. *Пулина М.О., Захарова Е.Т., Соловьев К.В., Соколов А.В., Басс М.Г., Шавловский М.М., Васильев В.Б.* // III съезд биохимического об-ва, 26.06–01.07 / С.-Пб.: Изд-во Фарос Плюс, 2002. С. 511.
50. *Laemmli U.K.* // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680–686.
51. *Davis B.J.* // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1964. V. 121. P. 404–427.
52. *Ravin H.A.* // *J. Lab. Clin. Med.* 1961. V. 58. P. 161.
53. *Thorne C.J.R.* *Techniques in Protein and Enzyme Biochemistry.* North Holland: Elsevier, 1978. P. 104.
54. *Laurell C.B.* // *Protides of the Biological Fluids/Ed. H. Peeters.* Amsterdam: Elsevier, 1967. P. 499–502.
55. *Anderson N.L., Nance S.L., Pearson T.W., Anderson N.G.* // *Electrophoresis.* 1982. V. 3. P. 135–142.
56. *Захарова Е.Т., Васильев В.Б., Горбунова В.Б., Шавловский М.М.* // *Биохимия.* 1983. Т. 48. С. 1709–1720.
57. *Brown M.A., Stenberg L.M., Grant Mauk A.* // *FEBS Lett.* 2002. V. 520. P. 8–12.
58. *Noyer M., Dwulet F.E., Hao Y.L., Putnam F.W.* // *Anal. Biochem.* 1980. V. 102. P. 450–458.
59. *De Filippis V., Vassiliev V.B., Beltramini M., Fontana A., Salvato B., Gaitskhoki V.S.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1996. V. 1297. P. 119–123.

## Isolation of Stable Human Ceruloplasmin and Its Interaction with Salmon Protamine

A. V. Sokolov, E. T. Zakharova, M. M. Shavlovskii, and V. B. Vasil'ev<sup>#</sup>

<sup>#</sup>Fax: +7 (812) 234-9489; e-mail: vadim@biomed.spb.ru

*Institute for Experimental Medicine, Russian Academy of Medical Sciences,  
ul. akademika Pavlova 12, St. Petersburg, 197376 Russia*

An interaction was discovered between ceruloplasmin (CP, a ferro-O<sub>2</sub>-oxidoreductase, EC 1.16.3.1), a copper-containing protein of human blood plasma, and salmon protamine (PR), a cationic polypeptide of vertebrates that provides a compact structure of spermatozoid DNA. Addition of PR to CP at a molar ratio of 2 : 1 decreases the CP electrophoretic mobility. Two types of CP binding centers for PR were determined: two centers with a high ( $K_{d1}$  of  $5.31 \times 10^{-7}$  M) and four centers with a low affinity ( $K_{d2}$  of  $1.56 \times 10^{-5}$  M). PR was shown to form complexes with CPs of various animal species. The CP–PR complex dissociates at an increased ionic strength (0.3 M NaCl), at pH decreased below 4.7, or in the presence of added polyanions (DNA, lipopolysaccharides, or heparin) and/or polylysine, which indicates the electrostatic nature of the interaction. The CP–PR interaction increased 1.5-fold the rate of CP-catalyzed oxidation of Fe<sup>2+</sup>. The preliminary treatment of blood plasma with arginine-Sepharose and heparin-Sepharose (to remove the blood coagulation factors) and affinity chromatography on PR-Sepharose helped isolate the practically unproteolyzed monomeric CP in 90% yield; it remained stable for more than two months at 37°C. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 3; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* blood coagulation factors, ceruloplasmin, copper-containing proteins, protamine, protein–protein interactions, proteolysis of proteins