УДК: 615: 28

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ С БЕЛКАМИ ИЗ СЕМЕЙСТВА ИНГИБИТОРОВ СЕРИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ

[1]Шамова О.В., [1]Орлов Д.С., [1]Ямщикова Е.В., [2]Орлов С.Б., [1]Кокряков В.Н.

[1]НИИ Экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург, e-mail: oshamova@yandex.ru;
[2]Саратовский государственный медицинский университет, Саратов,

Изучено взаимодействие антимикробных пептидов (АМП) из нейтрофильных гранулоцитов с белками плазмы крови, принадлежащими к семейству ингибиторов сериновых протеиназ (серпинов). Получены данные, свидетельствующие в пользу предположения о возможности связывания дефенсинов и некоторых других АМП с белками-серпинами, не имеющими антипротеазной активности, а выполняющими важную функцию в работе нейроэндокринной системы – кортикостероид-связывающим глобулином (транскортином) и тироксин-связывающим глобулином; а также о способности дефенсина модулировать биологическую активность транскортина.

Ключевые слова: врожденный иммунитет, антимикробные пептиды, серпины, транскортин

INVESTIGATION OF THE INTERACTION OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES WITH PROTEINS OF SERINE PROTEASE INHIBITORS FAMILY

[1]Shamova O.V., [1]Orlov D.S., [1]Yamschikova E.V., [2]Orlov S.B., [1]Kokryakov V.N.

[1]Institute of Experimental medicine RAMS, St-Petersburg, e-mail: oshamova@yandex.ru;
[2]Saratov State Medical University, Saratov

An interaction of antimicrobial peptides (AMP) of neutrophils with plasma proteins of serine protease inhibitors (serpins) superfamily has been investigated. We have obtained the data supporting an idea on a possibility of binding of defensins and some other AMP to serpins which have a lack of anti-protease activity, but playing an important role in the neuroendocrine system functioning, such as corticosteroid binding globulin (transcortine) and thyroxin-binding globulin. An ability of defensin to modulate the biological activity of transcortine has been demonstrated.

Keywords: innate immunity, antimicrobial peptides, transcortine

Антимикробные пептиды (АМП) нейтрофильных гранулоцитов являются одними из ключевых эффекторных молекул системы врожденного иммунитета человека и животных [2]. Кроме способности инактивировать патогенные микроорганизмы АМП проявляют и ряд других биологических эффектов, в частности, для некоторых АМП – дефенсинов из нетрофилов человека – описано свойство связываться с белками из семейства ингибиторов сериновых протеиназ (серпинов), причем в результате такого связывания снижается ингибирующее действие серпинов в отношении протеиназ, а также блокируется антимикробная активность дефенсинов [7]. Белки из семейства серпинов выполняют в организме разнообразные функции, участвуя в реакциях, определяющих образование, активность и деградацию различных гуморальных факторов белковой природы, а также служат переносчиками разнообразных молекул, в том числе, гормонов и цитокинов [1], и, таким образом, связывание с дефенсинами, поступающими в кровь и ткани организма при дегрануляции нейтрофилов, может играть значимую роль в регуляции этих функций. Одними из представителей семейства серпинов являются кортикостероид-связывающий глобулин, или транскортин (ТК), и тироксин-связывающий глобулин (ТСГ) – белки, являющиеся важными компонентами нейроэндокринной системы. Хотя эти белки практически не обладают антипротеазной активностью и выполняют в организме функции, не связанные с этой активностью, однако они имеют структурное сходство с другими белками-серпинами, что позволяет предположить, что дефенсины и, возможно, другие АМП, тоже могут связываться с ними. Изучение молекулярных механизмов взаимодействия АМП с эффекторными белками нейроэндокринной системы является актуальной задачей биологии и медицины. **Целью работы** явилось изучение способности дефенсинов и других АМП взаимодействовать с белками плазмы крови человека, принадлежащих к семейству нгибиторов сериновых протеиназ, и модулировать их биологическую активность.

Материал и методы исследования

Для оценки влияния серпинов на антимикробную активность пептидов использовали метод радиальной диффузии в агарозных гелях [5]. В чашки Петри заливали 1%-й агарозный гель (при температуре 43 °С), содержащий *Listeria monocytogenes* EGD; после застывания в геле прокалывали отверстия для внесения проб. Пептиды инкубировали с различными белками-серпинами 30 мин при 37 °С (контрольные пробы содержали индивидуальные фракции пептидов без добавления серпинов). По окончании инкубации пробы вносили в лунки в подготовленных чашках Петри. Чашки Петри помещали на 3 часа в термостат и инку-

бировали при температуре 37°С. Далее в чашки вливали агарозный гель, содержащий 6%-й триптический гидролизат сои, и снова помещали в термостат (37°С) на 18–20 часов. По окончании инкубации измеряли зоны ингибирования роста бактерии и определяли величину антимикробной активности: Антимикробная активность (в условных единицах) = (диаметр зоны ингибирования в мм)×10 – (диаметр лунки в мм)×10.

Конъюгацию дефенсина человека HNP-1 с биотином проводили в 0,05 М натрий-фосфатном буфере pH 6.5 в течение 24 ч при комнатной температуре при перемешивании с помощью магнитной мешалки. В данных условиях метка присоединяется к N-концевой аминокислоте [8], что позволяет сохранять биологическую активность молекулы. Молярное соотношение пептид : биотин составляло 1:5. Для конъюгации использовали длинноцепочечный вариант биотина (NHS-LC-biotin, Pierce, США). По окончании конъюгации в реакционную смесь вносили трифторуксусную кислоту до конечной концентрации 0,1%-й. Далее проводили очистку меченого дефенсина от несвязавшегося пептида и других нежелательных продуктов реакции с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке Vydac C-18 (США) с использованием линейного градиента вода–ацетонитрил от 0 до 60% в присутствии 0,1% трифторуксусной кислоты. Идентификация и оценка чистоты полученного биотинилированного пептида осуществлялась масс-спектрометрически с помощью MALDI-TOF MS.

Изучение связывания биотинилированного пептида с серпинами проводили с использованием дот-блот теста. Серпины наносили на нитроцеллюлозную мембрану. После полного высыхания капли мембрану на 50 мин помещали в блокирующий буфер (3% желатин, 1% БСА (бычий сывороточный альбумин), 10 мМ трис-HCl буфер, содержащий 100 мМ NaCl, pH 7,5) и оставляли на 1 час на шейкере при температуре 37°С (все последующие этапы – кроме последнего, также при этих условиях). Далее буфер сливали, промывали мембрану буфером для промывки (0,1% твин-20 в 10 мМ трис-HCl буфере, содержащем 100 мМ NaCl, pH 7,5). В чашку Петри с мембраной вносили раствор биотинилированного дефенсина, инкубировали 40 минут, после чего промывали мембрану буфером для промывки три раза (10 мин, 5 мин, 5 мин). Далее связавшийся с иммобилизованными на мембране серпинами дефенсин выявляли с помощью меченного пероксидазой авидина. Для этого мембрану помещали в раствор конъюгата авидина с пероксидазой хрена в блокирующем буфере на 40 мин. После инкубации с авидином мембрану три раза (10 мин, 5 мин, 5 мин) промывали буфером для промывки и 5 мин промывали 50 мМ трис-HCl буфером (pH 7,4). Последний этап – добавление раствора диаминобензидина (0,5 мг диаминобензидин, 1 мл 50 мМ трис-HCl (pH 7,4), 0,25 мкл перекиси водорода 30%) – проводили при комнатной температуре без шейкера. После проявления окраски в местах нанесения серпинов мембрану промывали дистиллированной водой. Контролем служили мембраны, на которые вместо исследуемых серпинов наносили человеческий сывороточный альбумин.

Для оценки влияния дефенсина на способность транскортина связывать гидрокортизон транскортин (фирма Affiland (Бельгия)) в конечной концентрации 1 мкМ инкубировали с дефенсином человека HNP-1, взятым в разных концентрациях, при 37°С в течение 1 ч в среде RPMI-1640 (контрольные пробы, инкубировавшиеся в тех же условиях, содержали транскортин без добавления дефенсина). Затем к пробам добавляли кортизол (гидрокортизон, Sigma (США)) и инкубировали еще 30 мин (включив дополнительный контроль – пробы, содержащие только кортизол). Далее, для отделения несвязавшегося с транскортином кортизола, пробы подвергали микродиализу. В верхнюю камеру диализной ячейки вносили пробы после инкубации. В нижнюю камеру, отделенную от верхней диализной мембраной (мембрана с НОММ 3,5 кДа), вносили по 200 мкл среды RPMI-1640. Диализ проводили в течение 18 часов. Материал, прошедший через мембрану в нижнюю камеру и содержащий свободный кортизол, отбирали и определяли в нем концентрацию кортизола (с использованием набора реактивов для иммуноферментного анализа фирмы Алкор Био, Санкт-Петербург).

Результаты исследований и их обсуждение

Свойство дефенсинов человека HNP-1, HNP-2, HNP-3 связываться с рядом белков из семейства ингибиторов сериновых протеиназ, или серпинов, было показано уже более десяти лет назад [6]. При подобном связывании дефенсинов с серпинами (α1-антихимотрипсином, α1-антитрипсином) антимикробные и цитотоксические свойства дефенсинов снижались и, в свою очередь, значительно уменьшалась способность серпинов ингибировать ферментативную активность сериновых протеиназ [6]. Авторы рассматривали такое связывание как механизм защиты собственных клеток организма от повреждающего действия антимикробных пептидов, когда, при дегрануляции нейтрофилов концентрация этих пептидов в крови достигает высокого уровня [6].

Нами было высказано предположение, что связывание антимикробных пептидов с белками из семейства серпинов может играть роль и в других процессах, учитывая, что функции серпинов в организме многообразны. Одним из членов семейства серпинов является белок транскортин (кортикостероидсвязывающий глобулин; серпин А6). Этот белок имеет структурное сходство с α1-антитрипсином, однако практически лишен свойства ингибировать сериновые протеиназы. Он представляет собой гликопротеин, циркулирующий в крови и специфически связывающий кортикостероиды, участвуя в их транспорте и депонировании. Еще одним белком-серпином, не обладающим антипротеазной активностью, является тироксин-связывающий глобулин – гликопротеин с молекулярной массой около 50000 Да, связывающий тироксин и трийодтиронин – гормоны, осуществляющие регуляцию йодного обмена, энергообмена, синтеза белка и играющие важную роль в развитии организма в целом. Пред-

ставляло интерес выяснить, имеет ли место взаимодействие дефенсинов и других АМП с транскортином и тироксин-связывающим глобулином.

Одним из доказательств, свидетельствующих в пользу возможности связывания АМП с серпинами, является отмена антимикробной активности пептидов в присутствии этих белков.

Было изучено влияние транскортина (ТК), тироксин-связывающего глобулина (ТСГ) и α1 – антитрипсина (ААТ) на антимикробные свойства АМП: дефенсина человека HNP-1, дефенсина кролика NP-1, протегрина 1 свиньи, индолицидина быка и бактенецина 5 козы. Пептиды (10 мкМ) преинкубировали с серпинами (ААТ, ТК, ТСГ; 10 мкМ) в течение часа, а затем их антимикробную активность исследовали с помощью метода радиальной диффузии (рис. 1). В контрольных группах пептиды инкубировали в тех же условиях, но без серпинов.

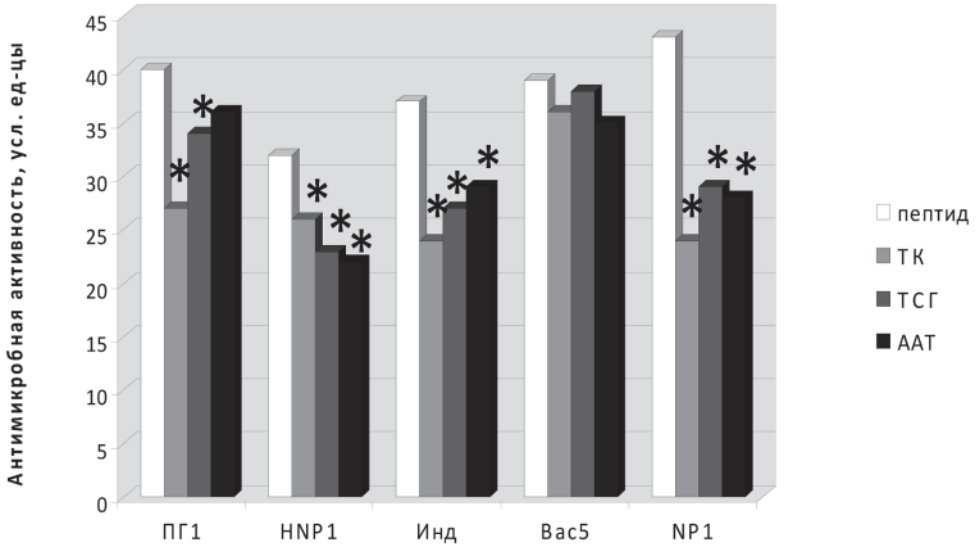

Рис. 1. Влияние серпинов (α1-антитрипсина (ААТ), транскортина (ТК) и тироксин-связывающего глобулина (ТСГ)) на антимикробную активность АМП в отношении Listeria monocytogenes. По оси абсцисс – единицы активности (соответствующие диаметру зон ингибирования роста бактерии пептидами). По оси ординат – группы пептидов (ПГ1 – протегрин 1, HNP-1 – дефенсин человека HNP-1, NP-1 – дефенсин кролика NP-1, Инд. – индолицидин, Bac5 – бактенецин 5). Данные представлены, как средние значения (n = 3-5); звездочками отмечены группы, в которых выявлены достоверные различия по сравнению с контролем (пептид без серпина) (t-критений Стьюдента, p <0,05; данные обрабатывали в программе Statistica 6)

Из рис. 1 видно, что антимикробная активность дефенсинов HNP-1 и NP-1 достоверно снижается в присутствии всех исследуемых серпинов, что находится в согласии с данными литературы [6]. Интересно, что антимикробная активность индолицидина тоже достоверно снизилась, хотя его способность влиять на антипротеазную активность ААТ была значительно ниже, чем у дефенсинов. Можно предположить, что он, вероятно, связывается с серпинами, но в сайте, отличном от такового для дефенсинов, и не затрагивающем участки молекулы, ответственные за антипротеазную активность серпинов. Активность протегрина 1, напротив, не снизилась достоверно в присутствии ААТ, хотя ПГ1 блокировал антипротеазные эффекты ААТ. По-видимому, это связано с характером антимикробной активности ПГ1, который, как было показано ранее, проявляет высокую активность и в низких концентрациях. Ни один из исследованных серпинов не влиял на активность линейного пептида бактенецина 5, что свидетельствует о том, что наличие высокого положительного заряда молекулы, которым обладали все использованные АМП, включая бактенецин, не является определяющим условием для связывания их с серпинами.

Таким образом, полученные данные о снижении антимикробной активности некоторых АМП в присутствии как ААТ, так и ТК и ТСГ, свидетельствуют в пользу предположения о возможности связывания АМП как с серпинами, обладающими антипротеазной активностью, так и с представителями этого семейства, выполняющими в организме другие функции.

Для получения дополнительной информации о возможности связывания АМП (дефенсинов) с ТК и ТСГ нами были проведены эксперименты по изучению связывания

биотинилированного дефенсина человека HNP-1 с иммобилизованными на нитроцеллюлозной мембране серпинами.

Для изучения возможности связывания АМП с ТСГ использовали также дот-блот анализ для оценки связывания биотинилированного дефенсина с серпинами, иммобилизованными на мембране. Для этого на нитроцеллюлозную мембрану наносили ТК, ТСГ и ААТ и далее мембрану обрабатывали в соответствии со стандартной методикой, используемой для дот-блоттинга. Однако вместо антител мембрану обрабатывали раствором, содержащим биотинилированный дефенсин человека HNP-1 и далее связавшийся с иммобилизованным на мембране серпинами дефенсин выявляли с помощью меченного пероксидазой авидина (см. разд. Материалы и методы). На рис. 2 представлены результаты, полученные после выявления биотинилированного дефенсина на мембране.

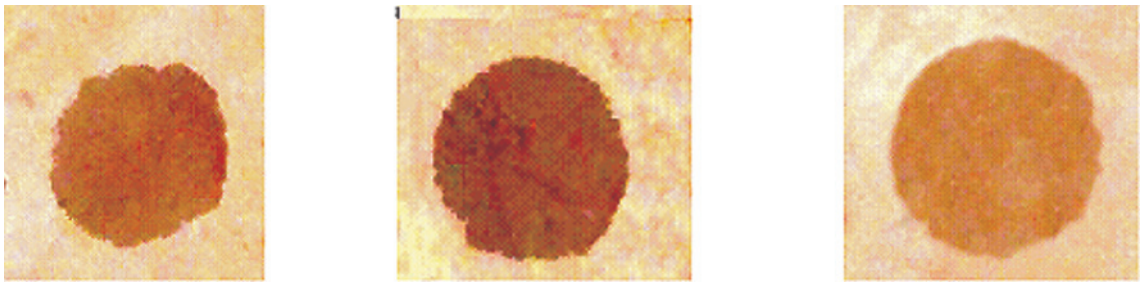

Рис. 2. Участки нитроцеллюлозной мембраны, на которой был выявлен биотинилированный дефенсин человека HNP-1, связавшийся с иммобилизованными на мембране серпинами: 1 – ААТ; 2 – ТК; 3 – ТСГ

Как оказалось, дефенсин выявлялся, как на мембранах, где был нанесен ААТ, так и на мембранах с ТК и ТСГ. Далее планируется получить другие биотинилированные АМП и провести с ними аналогичные эксперименты.

Таким образом, в результате проведенных исследований получены данные, подтверждающие предположение о способности дефенсинов связываться с транскортином и тироксин-связывающим глобулином. Следующей задачей было выяснение, способны ли дефенсины модулировать биологическую активность этих серпинов.

Для изучения влияния дефенсина на способность транскортина связывать кортизол (гидрокортизон) использовали следующий подход: транскортин инкубировали с кортизолом в присутствии или отсутствии дефенсина HNP-1 (молярное соотношение пептид : серпин = 5:1). Для отделения несвязавшегося с ТК кортизола использовали диализ в микрокамере. Концентрацию кортизола в диализате (не содержащем ТК) определяли с помощью ИФА. Результаты эксперимента представлены на рис. 3.

Из рис. 3 видно, что концентрация кортизола в среде снижается после инкубации его с ТК (группа 2), в то время как в присутствии дефенсина в инкубационной среде концентрация несвязавшегося с ТК кортизола достоверно повышается, что свидетельствует, что в присутствии дефенсина способность ТК связывать кортизол падает. Можно предположить, что это происходит вследствие связывания ТК с дефенсином. Таким образом, нами получены данные, свидетельствующие в пользу предположения, что дефенсины могут модулировать биологическую активность белка-серпина, участвующего в работе нейроэндокринной системы.

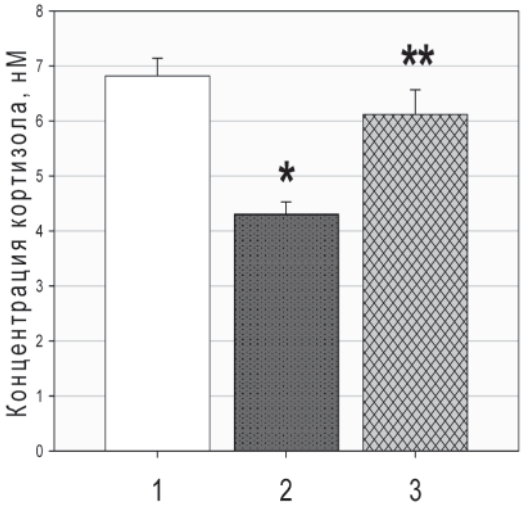

*Рис. 3. Влияние дефенсина HNP-1 на способность ТК связывать кортизол. По оси абсцисс – 1 – кортизол без добавления ТК и пептида (контроль); 2 – кортизол, который инкубировали с транскортином; 3 – кортизол, который инкубировали с транскортином в присутствии дефенсина HNP-1 (молярное соотношение ТК : пептид = 1:5). Данные представлены как средние значения + среднеквадратичные отклонения (n = 5). * – различия по сравнению с контрольной группой достоверны; ** – различия по сравнению с группой 2 достоверны (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$)*

Обсуждая полученные данные, необходимо отметить, что пока трудно оценить значимость взаимодействия дефенсинов с ТК на уровне целостного организма. Известно, что в норме концентрация дефенсинов в крови человека составляет около 10 нМ. Учитывая, что уровень ТК значительно выше (400–800 нМ), можно предположить, что в норме антимикробные пептиды не влияют на функции этого белка. Однако при различных формах патологии (инфекции, воспаления) происходит массовая дегрануляция нейтрофилов и высвобождение во внеклеточное пространство содержимого их лизосомоподобных гранул, в результате чего концентрация АМП в крови и других биологических жидкостях возрастает в десятки и даже сотни раз, например, при сепсисе уровень дефенсинов в крови достигает 3–50 мкМ [10]. Таким образом, можно предположить, что при определенных патологических процессах дефенсины способны модулировать активность транскортина, являющегося одним из важных компонентов нейроэндокринной системы.

Интересно, что в литературе описано свойство некоторых компонентов лизосомальных гранул нейтрофилов влиять на биологическую функцию ТК и ТСГ. Так, показано, что эластаза из нейтрофилов, внеклеточная концентрация которой тоже увеличивается при инфекционном процессе и в очагах воспаления, способна производить ограниченный протеолиз белков из семейства серпинов, включая ТСГ. В результате этого протеолиза изменяется конформация ТСГ и высвобождается связанный с ним тироксин [4]. Известно также, что в очаге воспаления повышается концентрация свободного тироксина и свободного ТСГ [9]. Согласно концепции Robins J., 2000 [7], свободный тироксин при этом подвергается дейодированию и освободившийся йод участвует в реакциях, связанных с функционированием миелопероксидазной системы нейтрофилов, существенно повышая ее бактерицидную эффективность. К настоящему времени в литературе наблюдаемый феномен высвобождения тироксина из его комплекса с ТСГ в очаге воспаления связывают только с деятельностью эластазы. Изучение способности дефенсинов вносить вклад в осуществление подобных защитных реакций представляет несомненный интерес.

Заключение

Получены данные, свидетельствующие в пользу предположения о возможности связывания дефенсинов и некоторых других АМП с белками из семейства серпинов, не имеющими антипротеазной активности, а выполняющими важную функцию в работе нейроэндокринной системы – кортикостероид-связывающим глобулином (транскортином) и тироксин-связывающим глобулином; а также о способности дефенсина модулировать биологическую активность транскортина.

Работа выполнялась при финансовой поддержке грантов РФФИ (№ 09-04-01655 и № 11-03-12102-офи-м-2011).

Список литературы

1. Гурин А.В. Ингибиторы протеиназ и цитокины крови в механизмах гипертермии при стрессе. – Минск, 2003 – 124 с.

2. Кокряков В.Н. Очерки о врожденном иммунитете. – СПб., 2006 – 261 с.

3. Действие антимикробных пептидов из нейтрофильных гранулоцитов на опухолевые и нормальные клетки в культуре / О.В. Шамова, Г.А. Сакута, Д.С. Орлов, В.В. Зенин, Г.И. Штейн, Н.И. Колодкин, И.В. Афонина, В.Н. Кокряков // Цитология. – 2007. – Т. 49, № 12. – С. 1000–1010.

4. A characteristic serpin cleavage product of thyroxin-binding globulin appears in sepsis area / B. Jirasakuldech, G. Schussler, M. Yap, H. Drew, A. Josehpson, J. Michl // Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 2000. – Vol. 85, №11. – P. 3996–3999.

5. Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides / R.I. Lehrer, M. Roseman, S.S., R. Harwig, Jackson, P. Eisenhauer // Journal of Immunological Methods. – 1991. – Vol. 137. – P. 167–173.

6. Human neutrophil defensins and serpins form complexes and inactivate each other / A. Panyutich, P. Hiemstra, van, S. Wetering, T. Ganz //American Journal of Respiratory Cell Molecular Biology – 1995. – Vol. 12. – P. 351–357.

7. Robbins J. New Ideas in Thyroxin-Binding Globulin Biology // Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 2000. – Vol.12. – P. 65–101

8. Preferential labeling of α-amino N-terminal groups in peptides by biotin: application to the detection of specific anti-peptide antibodies by enzyme immunoassays / I. Selo, L. Negroni, C. Creminon, J. Grassi, J.M. Wal // Journal of Immunological Methods. – 1996. – Vol. 199. – P. 127–38.

9. Schreiber G. The evolutionary and integrative roles of transthyretin in thyroid hormone homeostasis. // Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. – 2002. – Vol. 85, №11. – P. 3994–5.

10. Shi J., Ganz T. The role of protegrins and other elastase-activated polypeptides in the bactericidal properties of porcine inflammatory fluids // Infection and Immunity. – 1998. – Vol. 66. – P. 3611–3617.

Рецензенты:

Рыбакина Е.Г., д.б.н., руководитель лаборатории нейроиммуномодуляции, сотрудник Учреждения Российской академии медицинских наук НИИ экспериментальной медицины Северо-Западного отделения РАМН, г. Санкт-Петербург;

Киселева Е.П., д.м.н., ведущий научный сотрудник Учреждения Российской академии медицинских наук НИИ экспериментальной медицины Северо-Западного отделения РАМН, г. Санкт-Петербург.

Работа поступила в редакцию 12.05.2011.