

СПЕКТРАЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ СВЯЗЫВАНИЯ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ С РЕКОМБИНАНТНЫМ ЛАКТОФЕРРИНОМ ЧЕЛОВЕКА

Семенов Д.А., Куприенко О.С., Вашкевич И.И., Свиридов О.В.

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Лактоферрин является полифункциональным белком, принадлежащим к семейству трансферринов. Данный гликопротеин, который присутствует помимо молока в плазме крови, нейтрофилах и практически всех экзокринных секретах млекопитающих, осуществляет перенос железа в клетки и контролирует уровень свободного металла в биологических жидкостях [1].

Усилиями ученых НАН Беларуси на основе результатов белорусско-российских программ созданы методы и биотехнологии получения рекомбинантного человеческого лактоферрина (рчЛФ), идентичного природному лактоферрину человека, в молоке трансгенных коз-продуцентов и выделения функционально активного белка в чистом виде [2]. Важной характеристикой чистого рчЛФ как конечного продукта научно-производственной цепочки выделения и очистки является его способность связывать и высвобождать ионы железа и других металлов.

Мы изучили спектральные проявления взаимодействия с рчЛФ ионов двух металлов (Fe^{3+} и Eu^{3+}) высокого и среднего сродства к трансферринам. Известно, что все представители семейства трансферринов имеют максимумы поглощения света при 280 и 465 нм и оптическая плотность раствора белка существенно зависит от степени его насыщения железом, причем эта зависимость имеет нелинейный характер [3]. Действительно, за счет потери связанных ионов железа в денатурирующих условиях или цитратном буфере с pH 3,5 в присутствии хелатирующего агента рчЛФ поглощал при 280 нм менее интенсивно, чем интактный рчЛФ в натрий-фосфатном буфере с pH 7,4 при равных концентрациях белка, а полоса в видимой области спектра исчезала. В ходе добавления раствора хлорида железа (III) к исходному белку и получения комплекса рчЛФ- Fe^{3+} наблюдался обратный эффект. Установлено, что абсорбционное отношение A_{280}/A_{465} для железоненасыщенной, исходной и железосодержащей форм белка равняется 580, 129 и 27, что соответствует степени насыщения рчЛФ около 2, 11 и 76%.

В проведенных экспериментах показано, что рчЛФ способен обратимо связывать ионы железа по типичному для трансферринов механизму, который включает взаимодействие ферри-катиона с фенолят-анионом остатка тирозина в активном центре, перенос заряда в образовавшемся комплексе и появление отдельной полосы поглощения в видимом спектре. Эта полоса исчезает вместе с разрушением комплекса.

В случае комплексообразования белком ионов европия прямое измерение абсорбции не показывало видимых изменений, но факт комплексообразования был установлен с помощью дифференциальной спектрофотометрии. Изменения конформации белка, в том числе индуцируемые лантанидами, могут менять окружение боковых цепей некоторых ароматических остатков, например, тирозинов, или вызывать более глубокие возмущения в электронных процессах из-за прямого вовлечения таких остатков в комплексообразование. В любом случае интенсивность возникающих сигналов невелика, и, как правило, они регистрируются только в дифференциальном режиме измерений абсорбции. Методом масс-спектрометрии найдено, что насыщение рчЛФ ионами Eu^{3+} в расчете на два металлсвязывающих сайта в молекуле белка составило 22%.

Такой комплекс, обладающий неповрежденной структурой белка и содержащий ион редкоземельного металла с интенсивной долгоживущей флуоресценцией, нашел полезное применение в исследованиях свойств рчЛФ и при изучении его взаимодействий с биологическими макромолекулами.

Библиографические ссылки

1. Борзенкова Н.В., Балабушевич Н.Г., Ларионова Н.И. Лактоферрин: физико-химические свойства, биологические функции, системы доставки, лекарственные препараты и биологически активные добавки (обзор) // Биофармацевтический журнал. 2010. Т. 2, № 3. С. 3-19.
2. Лукашевич В.С., Будевич А.И., Семак И.В. и др. Получение рекомбинантного лактоферрина человека из молока коз-продуцентов и его физиологические эффекты // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. 2016. Т. 60, № 1. С. 72-81.
3. Majka G., Śpiwak K., Kurpiewska K. et al. A high-throughput method for the quantification of iron saturation in lactoferrin preparations // Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2013. Vol. 405, N 15. P. 5191-5200.

Семенов Д.А., Вашкевич И.И., Владыко А.С., Свиридов О.В. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ КОНКУРЕНТНОГО СВЯЗЫВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА И ВИРУСА SARS-CoV-2 С ГЕПАРАНСУЛЬФАТ ПРОТЕОГЛИКАНАМИ

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ КОНКУРЕНТНОГО СВЯЗЫВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА И ВИРУСА SARS-CoV-2 С ГЕПАРАНСУЛЬФАТ ПРОТЕОГЛИКАНАМИ

Семенов Д.А.¹, Вашкевич И.И.¹, Владыко А.С.², Свиридов О.В.¹

¹Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

²РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Лактоферрин (ЛФ) – это широко известный металлопротеин, относящийся к системе врожденного иммунитета и участвующий в биохимических процессах острой фазы воспаления. Кроме связывания и транспорта ионов железа, одной из многочисленных функций ЛФ является его активность против широкого спектра вирусов человека и животных [1]. Наиболее изученный механизм антивирусной активности заключается в предотвращении данным белком проникновения вирусных частиц в клетки-мишени. Многие вирусы имеют тенденцию связываться с олигосахаридной частью гепарансульфат протеогликана клеточной поверхности, и после первоначального прикрепления вирусная частица взаимодействует со специфическими рецепторами ACE2 и попадает внутрь клетки. В литературе описано, что ЛФ обладает способностью связываться с данными гликозаминогликанами на поверхности клеток, препятствуя адгезии и последующей интернализации вируса [2]. Взаимодействие ЛФ с анионными биополимерами, в частности с гликозаминогликанами, обусловлено наличием в природном белке кластера положительно заряженных аминокислотных остатков на N-конце макромолекулы.

Нашей целью было изучить ингибиторную активность ЛФ человека из молока трансгенных коз-продуцентов (рчЛФ) в отношении специфических взаимодействий вируса SARS-CoV-2 в модельной системе *in vitro* для того, чтобы подтвердить идентичность катионной структуры и противовирусной функции рекомбинантного белка характеристикам природного ЛФ.

Для этого реакцией восстановительного аминирования был синтезирован белковый конъюгат гепарина в качестве модели гепарансульфат протеогликанов клеточной мембраны. Данный подход позволил нам получить биологический объект, приближенный к природному способом присоединения неветвящихся углеводных цепей сульфатированных гликозаминогликанов, несущих отрицательный заряд, к коровому белку. Отметим, что коммерчески доступный гепарин отличается от гепарансульфата степенью сульфатирования углеводной цепи.

Для оценки конкурентного ингибирования связывания вируса SARS-CoV-2 с белковым конъюгатом гепарина в присутствии рчЛФ, синтезированный конъюгат был адсорбирован через белковую часть в лунках пластмассового микропланшета. После предварительной обработки иммобилизованного конъюгата раствором рчЛФ (10 мкг на лунку) вносили вирусные частицы, которые были отобраны в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии как потенциальный кандидат для получения белорусской вакцины от коронавируса, в количестве 100 нг. Образовавшийся на твердой фазе комплекс гепарина с вирусом выявляли путем последовательного внесения сыворотки человека, содержащей