

А.В. Соколов

ИНТЕРАКТОМИКА МЕТАЛЛОПРОТЕИДОВ

Санкт-Петербург – 2018

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ»

Соколов Алексей Викторович

ИНТЕРАКТОМИКА МЕТАЛЛОПРОТЕИДОВ

Актовая речь на заседании Ученого совета
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»

21 декабря 2018 года

Санкт-Петербург – 2018

*Любой цветок неотвратимо вянет
В свой срок и новым место уступает:
Так и для каждой мудрости настанет
Час, отменяющий ее значенье...
Все круче поднимаются ступени,
Ни на одной нам не найти покоя;
Мы вылеплены Божьей рукою
Для долгих странствий, не для косной лени.
Опасно через меру пристраститься
К давно налаженному обиходу:
Лишь тот, кто вечно в путь готов пуститься,
Выигрывает бодрость и свободу...*

Герман Гессе «Ступени»,
перевод Сергея Сергеевича Аверинцева

Посвящается светлой памяти
Валентины Васильевны Денежкиной

Глубокоуважаемые члены Ученого совета, коллеги и гости!

Когда 14 лет назад я слушал актовую речь моего руководителя профессора Вадима Борисовича Васильева, то едва ли мог в самых смелых фантазиях представить, что так скоро буду удостоен чести выступить со своей речью. Подходя к рубежу, отделяющему молодого ученого от уже «повзрослевшего», невольно хочется проанализировать события, которые происходили в научной молодости. В 2000 году мой учитель биологии Валентина Васильевна Денежкина, в прошлом сотрудница Отдела молекулярной генетики, привела меня в Институт Экспериментальной Медицины. Тогда я еще не мог предположить, сколько счастливых дней я проведу в этом учреждении. Через пять лет на праздновании 115-летия ИЭМа Борис Иванович Ткаченко, вручая диплом за лучший доклад на конференции молодых ученых, сказал мне: «Поздравляю вас, молодой человек, вам очень повезло!», и с этим нельзя было не согласиться.

Отрывок из стихотворения Германа Гессе приведен в начале актовой речи не случайно: в течение начала XXI века мы наблюдали, как благодаря так называемым «омным» наукам, ступень за ступенью, поднимаются на новые и новые высоты наши знания об устройстве живого. Так от геномики, оперирующей информацией о совокупности генов, записанной в цепочках ДНК, ученые перешли к транскриптомике, изучающей мир молекул РНК, транскрибируемых с матриц ДНК. В течение многих лет ИЭМ участвовал в программе РАМН «Протеом человека», внося вклад в развитие науки о совокупности белков, транслируемых с молекул РНК. В настоящее время с развитием техники хроматографии и масс-спектрометрии развивается наука метаболомика, материальные субстраты которой образуются в ходе ферментативных реакций. Однако перечисленные науки оперируют информацией об определенных типах молекул живого организма, а интерактомика раскрывает механизмы сложных взаимодействий между молекулами, причем не только белок-белковых взаимодействий. Интерактомика единственная из всех «омных» наук отвечает на самый важный вопрос биологии: «Почему так получилось?». Почему с определенным промотором молекулы ДНК взаимодействует активатор или репрессор? Почему с молекулой РНК не взаимодействует рибосома и не идет синтез белка? Почему один белок избирательно взаимодействует с другим? Почему низкомолекулярное вещество влияет на то или иное взаимодействие, ферментативную реакцию? Отвечая на эти вопросы, мы получаем инструменты для контроля над сложнейшими процессами, в том числе и патологическими.

Интерактомика базируется на фундаментальных законах живого:

- 1) закон-афоризм Барри Коммонера – **«Все связано со всем»;**
- 2) закон эмерджентности – **«Целое всегда имеет особые свойства, отсутствующие у его частей»;**

3) закон независимости факторов – **«Условия жизни равнозначны, ни один фактор не может быть заменен другим»;**

4) закон минимума – **«Веществом, присутствующим в минимуме, управляется урожай, определяется его величина и стабильность во времени».**

Два последних закона тесно связаны с ролью микроэлементов в функционировании биосистем. Действительно, без участия микроэлементов, связанных с металлопротеидами, невозможны процессы транспорта кислорода и диоксида углерода (гемоглобин, миоглобин, карбоновая ангидраза), функционирования цепей переноса электронов (дыхательные комплексы и цитохромы митохондрий, фотосистемы I и II хлоропластов, пластоцианины, рубредоксины), фиксации азота (нитрогеназа), минерализации скелета (остеопонтин), сигнализации, гомеостаза, иммунитета (кальмодулин, тропонин, «цинковые пальцы» транскрипционных факторов, НАДФН-оксидаза, ксантинооксидаза), а также образования и распада биополимеров (ДНК-, РНК-полимеразы, карбоксипептидазы и аминопептидазы). Без перечисленных процессов невозможно представить себе жизнь. Более того, если придерживаться гипотезы «мира РНК», то на определенном этапе возникновения жизни для эффективного функционирования рибозимов был необходим контакт ионов металлов с РНК.

За редчайшим исключением ионы металлов не существуют в нашем организме отдельно от биомолекул: их поступление в организм, обмен и экскреция зависят от транспортных белков, гормонов, ферментов, в том числе металлопротеидов. Для демонстрации тесной связи обмена железа и меди следует обратиться к истории вопроса, которая более подробно изложена в блестящем обзоре Пола Фокса: *The copper-iron chronicles: The story of an intimate relationship* (Fox, 2003).

Хлороз – «зеленая болезнь» или «болезнь девственниц» – описана еще Гиппократом. Заболевание характеризуется бледным, зеленоватым цветом лица, задержкой или прекращением менструаций, в крайних стадиях комплекс симптомов дополняют капризность, летаргия и геофагия. Первые попытки лечения хлороза препаратами железа были предприняты в конце XVI века (Nicolas Monardes, 1580). В 1745 году итальянский врач Винченцо Менгини наблюдал, что крупички высохшей крови можно собрать магнитом, следовательно, она должна содержать железо. Однако, как сообщает в XIX веке французский терапевт Сигизмунд Жакку: добавки препаратов железа в пищу не приводили к эффективному излечению хлороза. Физиолог и химик Базельского университета Густав Александрович Бунге высказывает предположение, что по каким-то причинам железо из препаратов не усваивается. В 1830 году появляется первое сообщение о наличии в крови меди (Sarzeau, 1830). В 1848 году знаменитый химик Огюст Николя Эжен Миллон, более известный разработанной им специфической реакцией на тирозин с нитратом ртути (реагент Миллона), обнаружил, что медь фиксируется вместе с железом в эритроцитах, и предположил, что хлороз связан с недостатком меди. В этом же году бельгийский химик Мельсенс публикует результаты определения меди в крови и опровергает выводы Миллона: используя 7 кг высушенной крови от 21 донора, он не обнаружил даже следов меди и подверг сомнению вывод, что хлороз связан с недостатком меди. Однако в середине XIX века входит в моду металлотерапия – использование металлов для лечения множества заболеваний, в том числе холеры и туберкулеза (Rademacher, 1848; Burq, 1853). Параллельно с этим появляются сообщения о действии меди на рабочих заводов. Французские естествоиспытатели Жорж Пехолье и Камилль Сент-Пьер исследуют влияние малых и больших доз зеленого пигмента вер-де-Гри (основной

ацетат меди) на собак и кроликов, а также сообщают о том, что работающие на фабриках по производству вер-де-Гри молодые женщины имеют «здоровый, свежий, тучный вид», в отличие от «худых, бледнолицых» женщин, работающих на других заводах региона Монпелье. Ученые отметили регулярный характер менструаций у работниц и то, что некоторые женщины успешно кормили посреди фабрики красивых младенцев, хотя их грудь могла быть забрызгана солями меди. Более того, работницы с симптомами хлороза восстанавливали свое здоровье через несколько месяцев после того, как начинали работать на производстве вер-де-Гри (Pécholier & Saintpierre, 1864).

В 1862 году итальянский врач Мендини сообщает об эффективном купировании симптомов хлороза с помощью пиллюль с сульфатом меди, в 1877 году Леви и Бардуззи подтверждают его результаты (Levi & Barduzzi, 1877). Первые экспериментальные доказательства влияния меди на обмен железа опубликовали в 1894 году Червелло и Барабини в университете Палермо. Используя количественный анализ гемоглобина, они показали, что у собак и куриц добавка сульфата меди нормализует концентрацию гемоглобина (Cervello & Barabini, 1894). Используя разработанную Густавом фон Бунге и Эмилем Абдерхальденом модель развития анемии у крыс на цельномолочной диете, 23 марта 1928 года Харт, Стинбук, Вадделль и Эльвенхайм из университета Висконсина опубликовали в *Journal of Biological Chemistry* классическую работу о влиянии меди на синтез гемоглобина у крыс: Iron in nutrition. VII. Copper as a supplement to iron for hemoglobin building in the rat (Hart *et al.* 1928). 19 мая 1928 года в этот же журнал пришла работа от группы МакХарга и сотрудников из Сельскохозяйственной экспериментальной станции в Кентукки: The relation of copper to the hemoglobin content of rat blood (McHargue *et al.* 1928), в которой они показали, что уровень гемоглобина у крыс с анемией

восстанавливает добавка в пищу золы печени коров, но не золы, лишенной меди после обработки щелочью. Две работы вызвали настоящий взрыв публикаций даже по нынешним меркам: так, на эту тему выходит еще 3 публикации в 1928 году, 6 – в 1929, 3 – в 1930 и 17 – в 1931! В общей сложности в течение следующих 10 лет выходит 60 публикаций, посвященных подтверждению связи обмена меди и железа, с использованием различных видов животных и способов добавления солей меди в их рацион. Лишь в 40-х годах прошлого века шведские ученые Карл Холмберг и Карл-Бертил Лаурелл из университета Люнда в Швеции выделяют из плазмы крови белок, содержащий 8 атомов меди на молекулу, и за ярко-голубой цвет называют его церулоплазмином – «небесно-голубой белок плазмы» (Holmberg, 1944; Holmberg & Laurell, 1948). Карл-Бертил Лаурелл более известен как создатель методов перекрестного и ракетного иммуноэлектрофореза. В это же время Артур Шейд и Леона Кэролин выделяют из плазмы крови железосвязывающий белок – трансферрин (Schade & Caroline, 1946). В 1952 году Бернард Кёхлин делает важное предположение, что для встраивания железа в трансферрин ионы Fe(II) должны быть окислены кислородом, и этот процесс катализируется находящимся в плазме фактором (Koechlin, 1952). И хотя фактически окисление закисного железа под действием церулоплазмина было открыто Кёрзоном и О'Райли в Национальном госпитале Лондона (Curzon & O'Reilly, 1960), физиологическая роль этого процесса была ими отвергнута. Открытие физиологического значения ферроксидазной активности церулоплазмина для встраивания железа в трансферрин опубликовано в классической статье Шегемазы Осаки, Дональда Джонсона и Эрла Фридена (Osaki *et al.* 1966). Практически в это же время из лаборатории биохимической генетики ИЭМ выходят первые работы, посвященные изучению роли церулоплазмина в патогенезе болезни

Вильсона-Коновалова, или гепатолентикулярной дегенерации, строению активного центра церулоплазмина (Машков, 1967, Шапошников и соавт., 1967, Shaposhnikov *et al.* 1969, Vasiletz *et al.* 1972). Прошло уже более 50 лет с начала исследований строения и функций церулоплазмина в ИЭМе, и, к счастью, живы многие сотрудники, посвятившие множество лет работы этому белку: Михаил Михайлович Шавловский, Елена Тихоновна Захарова, Вадим Борисович Васильев, Александр Михайлович Шапошников, Людмила Валентиновна Пучкова, Надежда Васильевна Цымбаленко.

В 2000 году была опубликована первая работа об обнаружении взаимодействия церулоплазмина с гомологом трансферрина, лактоферрином (Zakharova *et al.* 2000). В это же время я, будучи еще 11-классником, получил возможность присоединиться к исследованиям и наблюдать, как в течение многих лет Елена Тихоновна Захарова заражала энтузиазмом сотрудников Отдела, в том числе и меня. Я уверен, что работы, которые начались с изучения церулоплазмина в экзокринных секретах – молозиве, слезной жидкости (Соколов и соавт., 2006), в итоге привели к открытию новой и, может быть, самой важной функции его партнера, лактоферрина. Здесь следует упомянуть о таком качестве сотрудников ИЭМа, как готовность бескорыстно прийти на помощь коллегам. Много лет сотрудники Отдела общей патологии и патологической физиологии Галина Матвеевна Алешина и профессор Владимир Николаевич Кокряков занимались исследованиями пептидных и белковых факторов врожденного иммунитета, в том числе и лактоферрином, и с их помощью довольно быстро удалось идентифицировать его в качестве специфического партнера церулоплазмина. Пытаясь обнаружить функциональную значимость взаимодействия церулоплазмина и лактоферрина, мы показали, что

лактоферрин усиливает ферроксидазную активность церулоплазмينا (Sokolov *et al.* 2009), а также получили трехмерную модель комплекса этих белков, которая была независимо подтверждена за рубежом (Sabatucci *et al.* 2007, White *et al.* 2012). Параллельно с итальянской группой Пьеры Валенти (Paesano *et al.* 2006) мы получили данные о противоанемическом действии лактоферрина, но, к нашему изумлению, эффективным при железодефицитной анемии был только не насыщенный ионами железа апо-лактоферрин (Пулина и соавт., 2010). Тщательная проверка этого наблюдения заняла не один год работы, и в итоге привела к открытию новой функции лактоферрина, связывающей его с обменом железа.

Попытки осмыслить роль лактоферрина в обмене железа приводили к довольно безрадостным выводам. Во-первых, среди всех млекопитающих лишь у человека лактоферрин является мажорным белком молока, а лабораторные животные – мыши, крысы, морские свинки, кролики, собаки – либо секретируют в десятки и сотни раз меньшие количества лактоферрина в молоко, либо он вовсе заменен на трансферрин (Teng, 2002). Во-вторых, чрезвычайно прочное связывание лактоферрином ионов железа (III) – константа ассоциации около 10^{20} л/моль, а также данные об анемическом действии молока коров на крыс приводили к выводу, что основная роль лактоферрина при молочном вскармливании заключается в маскировке железа и своеобразном толчке, вынуждающем к добавлению прикорма к молочному питанию новорожденного (Fransson & Lonnerdal, 1980; Baker *et al.* 1987). Наконец, тот факт, что хроническое воспаление сопровождается гипоферемическим состоянием и секрецией нейтрофилами апо-формы лактоферрина (Sawatzki, 1987), осложнял интерпретацию данных о выраженном действии апо-лактоферрина у людей и при моделировании анемии у крыс. Однако потребовалось дополнить картину новыми участниками, и все встало на свои места.

Только на рубеже XX и XXI веков было открыто три участника обмена железа: клеточный экспортер ионов железа (II) – ферропортин 1, IREG1 или MTP-1 (Abboud & Haile, 2000); ассоциированный с ним гомолог церулоплазмина – гепестин (Vulpe *et al.* 1999, Levy *et al.* 2000, Frazer *et al.* 2001); пептидный гормон гепцидин, синтезируемый гепатоцитами в ответ на повышение концентрации железа либо провоспалительные стимулы, например, бактериальные липополисахариды, интерлейкин-6 (Krause *et al.* 2000, Park *et al.* 2001, Pigeon *et al.* 2001). Оказалось, что стабильность ферропортина 1, единственного канала для экскреции железа в закисной форме (Fe^{2+}) из энтероцитов и макрофагов, зависит от феррооксидазной активности гепестина либо церулоплазмина. В случае воспаления или избыточного поступления железа появление в циркуляции гепцидина приводит к индукции деградации ферропортина 1 (De Dominicis *et al.* 2007, 2009). Таким образом, ответом организма на воспаление и/или избыток железа является блокирование всасывания железа из пищи и его рециркуляции из макрофагов селезенки. Оказалось, что лактоферрин не причастен к развитию воспалительной гипоферемии. Напротив, недавно было показано, что лактоферрин препятствует индуцированной гепцидином деградации ферропортина 1 (Bonaccorsi di Patti *et al.* 2018). Также на рубеже XX и XXI веков было показано, что синтез церулоплазмина усиливается в ответ на дефицит железа либо гипоксию за счет гипоксия-индуцибельного фактора – HIF-1 (Mukhopadhyay *et al.* 1998, 2000).

Анализ приведенной выше информации привел нас к выполнению довольно простых и вместе с тем трудоемких опытов. Лабораторные мыши были предварительно отсортированы по устойчивости к гипоксии, и той части мышей, которая характеризовалась низкой устойчивостью к гипоксии, вводили апо-форму лактоферрина, его насыщенную железом

форму, эквивалентную дозу альбумина либо физиологического раствора. Оказалось, что только апо-форма лактоферрина, введенная за сутки, но не за 1 час до тестирования, вызывала увеличение устойчивости животных к гипоксии. Таким же действием обладают синтетические хелаторы железа, например, десферал. На молекулярном уровне устойчивость клеток к гипоксии и дефициту железа являются взаимосвязанными процессами: на относительно постоянном уровне в клетках транслируется альфа-субъединица HIF-1, которая при нормоксии и наличии пула лабильного железа внутри клетки подвергается гидроксигированию по остаткам пролина и аспарагина ферментами, активность которых зависит от кислорода и ионов железа. Гидроксигирование HIF-1 α приводит к его деградации (Semenza, 2010). Напротив, снижение концентрации кислорода и/или железа нарушает процесс гидроксигирования, и HIF-1 α транспортируется в ядро клетки, где в комплексе с HIF-1 β запускает транскрипцию генов, белковые продукты которых отвечают за транспорт железа (церулоплазмин, рецептор трансферрина), эритропоэз (эритропоэтин, гемоксигеназа-1) и устойчивость клеток к гипоксическому стрессу (карбоновая ангидраза, глицеральдегидфосфатдегидрогеназа, транспортер глюкозы). В наших экспериментах введение мышам апо-формы лактоферрина, но не насыщенного железом белка, приводило к временному снижению концентрации железа, нормоксической стабилизации HIF-1 α в органах и увеличению концентрации эритропоэтина в образцах сыворотки крови, полученных от животных (Zakharova *et al.* 2012). Обнаруженная антигипоксическая функция апо-формы лактоферрина была подтверждена уже через два года в опытах на поросятах (Nguyen *et al.* 2014). В том же году при исследовании культуры нейробластомы была подтверждена гипотеза об ингибировании лактоферрином гидроксигирования HIF-1 α (Park *et al.* 2014).

В этом году нами была опубликована работа, суммировавшая многолетние исследования протективного действия апо-формы лактоферрина при моделировании таких нейродегенеративных заболеваний у грызунов, как экспериментальный аллергический энцефаломиелит, ротеноновая модель болезни Паркинсона и экспериментальный инсульт (Zakharova *et al.* 2018). Без сотрудничества с Ириной Николаевной Абдурасуловой и Виктором Матвеевичем Клименко (Отдел физиологии им. Павлова), Ольгой Викторовной Кирик и Дмитрием Эдуардовичем Коржевским (Отдел морфологии) это исследование было бы невозможно. Оказалось, что через опосредованную лактоферрином экспрессию эритропоэтина активируется и другой защитный путь, связанный со стабилизацией транскрипционного фактора Nrf2, вызывающего экспрессию генов антиоксидантной защиты клеток, что было показано при сотрудничестве с Еленой Брониславовной Меньшиковой, автором лучшей русскоязычной монографии об окислительном стрессе. Феномен активации Nrf2-зависимых генов под действием лактоферрина недавно был описан самым известным исследователем биохимии молока Бу Лённердалем (Jiang & Lönnerdal, 2016).

Для более детального изучения антигипоксической активности лактоферрина мы использовали крыс, содержащихся на диете с хлоридом серебра (Kostevich *et al.* 2016). Данная модель была разработана как способ снижения активности церулоплазмينا у животных (Prybyl *et al.* 1980, 1982). С её помощью Михаилом Михайловичем Шавловским и сотрудниками Отдела было показано значение антиоксидантной активности церулоплазмينا для нормального течения беременности и эмбриогенеза у крыс (Shavlovski *et al.* 1995). Планируя исследование, мы рассчитывали продемонстрировать роль активности церулоплазмينا в

купировании постгеморрагической железодефицитной анемии у крыс. Ранее на мышах, нокаутированных по гену церулоплазмина, было показано, что после нескольких кровопотерь животные не способны восстановить нормальный уровень эритроцитов и гемоглобина без инъекции церулоплазмина (Cherukuri *et al.* 2005). При анализе влияния диеты с AgCl на ферроксидазную активность церулоплазмина мы убедились, что ни очищенный фермент, ни сыворотка крови, полученные от так называемых Ag-крыс, не способны ускорять окисление ионов закисного железа. Проверив состояние Ag-крыс и животных контрольной группы после кровопотерь, а также влияние введения апо-формы лактоферрина и его комбинации с активным церулоплазмином, мы получили несколько интересных фактов (Kostevich *et al.* 2016).

Во-первых, Ag-крысы не отличались от крыс из контрольной группы по динамике нормализации концентрации гемоглобина и железа в крови после кровопотери. Во-вторых, введение апо-формы лактоферрина привело к заметному ускорению нормализации состояния Ag-крыс. В-третьих, этот эффект совпал с более выраженным увеличением концентрации эритропоэтина и пролонгированной стабилизацией HIF-1 α и его гомолога HIF-2 α в органах Ag-крыс. Наконец, одновременное введение с лактоферрином активного церулоплазмина, полученного из крови интактных крыс, заблокировало более выраженный эффект лактоферрина у Ag-крыс, продемонстрировав при этом способность самого церулоплазмина к антигипоксическому действию на уровне стабилизации HIF-1 α . Одновременно с нами такой эффект церулоплазмина был описан на модели колоректального рака у мышей (Dai *et al.* 2016). Суммируя полученные данные, мы показали функциональную связь между антигипоксическим эффектом лактоферрина и способностью церулоплазмина встраивать в него ионы

железа, которая функционирует по механизму отрицательной обратной связи. Выключив ферроксидазную активность церулоплазмينا, мы добились более выраженного эффекта лактоферрина, который не успевал насытиться ионами железа. Интересными следствиями этой работы были два наблюдения:

1) тщательный анализ церулоплазмينا Ag-крыс показал, что как минимум два иона меди из шести не замещались ионами серебра;

2) косвенно было показано наличие у крыс ферроксидазы, активность которой не блокируется при диете с AgCl, поскольку такие животные не испытывали трудностей с выходом из анемического состояния.

Церулоплазмин, полученный от контрольных крыс, был кристаллизован и исследован с помощью метода рентгеноструктурного анализа Валерией Ролановной Самыгиной из Института Кристаллографии РАН. Здесь мне бы хотелось отметить, что первый рентгеноструктурный анализ церулоплазмينا человека был осуществлен с использованием препарата, полученного Михаилом Михайловичем Шавловским, а его имя незаслуженно не указано в одной из самых цитируемых статей, аффилированных с ИЭМом (*Zaitseva et al.* 1996 – 340 цитирований на декабрь 2018 года). Сравнение структуры церулоплазмينا человека и крысы, несмотря на высокую степень гомологии этих белков, добавило веса идиоме: дьявол кроется в деталях. Оказалось, что церулоплазмин крысы содержит новый центр связывания для иона меди, названный нами – LS3 (*Samygina et al.* 2017). В церулоплазмине человека, как и в церулоплазмине крысы, есть сайты LS1 и LS2, основная функция которых состоит в передаче электронов от ионов железа (II) и других субстратов церулоплазмينا на его трехъядерный активный центр. Не менее удивительным оказалось то, что аминокислотные остатки, формирующие

LS3 в церулоплазмине крысы, гомологичны N-концевому сайту связывания для иона меди в альбумине и в тех же позициях присутствуют еще лишь в церулоплазмине трех позвоночных. Профессор Вадим Борисович Васильев подробно исследовал механизмы дисмутирования супероксидного радикала церулоплазмином человека (Васильев и соавт., 1988). Оказалось, что наличие иона меди в LS3 увеличивает супероксиддисмутазную активность церулоплазмينا крыс.

Важность лабильных сайтов связывания ионов меди была неожиданно обнаружена при исследовании взаимодействия церулоплазмина с провоспалительным цитокином, фактором, ингибирующим миграцию макрофагов (MIF). Введение антител против MIF блокирует экспериментальный септический шок у животных (Roger *et al.* 2003). В 2006 году вышла публикация об обнаружении в моче пациентов с воспалительными патологиями мочеполового тракта комплексов MIF с церулоплазмином, альбумином и $\alpha 2$ -макроглобулином (Meyer-Siegler *et al.* 2006). Следует отметить, что все три партнера MIF способны связывать и транспортировать ионы меди *in vivo*. Благодаря Анатолию Петровичу Суслову и Олегу Юрьевичу Третьякову из НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи, которые много лет исследовали MIF, мы получили препараты данного цитокина. К сожалению, первые опыты по изучению связывания церулоплазмина и MIF не привели к успеху: белки не взаимодействовали и не подавляли активности друг друга. MIF является уникальным цитокином, проявляющим ферментативную активность таутомеразы. Роль её до сих пор не ясна, но низкомолекулярные вещества, для которых *in vitro* показано ингибирующее действие на активность MIF, как правило, проявляют и противовоспалительную активность *in vivo*.

Важную роль в обнаружении молекулярного механизма взаимодействия церулоплазмينا и MIF сыграло трудолюбие моей сотрудницы Валерии Александровны Костевич, которая протестировала практически все имевшиеся в Отделе молекулярной генетики препараты церулоплазмينا на способность ингибировать активность MIF. Следует отметить чрезвычайную бережливость сотрудников ИЭМа: в холодильниках мы нашли партию ампул с препаратом церулоплазмينا, которая была выпущена в год моего рождения – 1983. Это довольно странное чувство, когда вскрываешь ампулу с раствором соломенного цвета, и за время, которое требуется на переливание раствора для уточнения концентрации белка, он приобретает ярко-синюю окраску, как будто этот церулоплазмин только вчера был выделен из плазмы крови. Оказалось, что среди всех испытанных препаратов именно «мой ровесник» эффективно подавил активность MIF в «наномолярном» диапазоне концентраций – константа ингибирования составила 37 нМ (Kostevich *et al.* 2015). На тот момент мы наконец-то завершили отработку протокола получения недеградированного протеиназами церулоплазмينا, и к нашему удивлению интактный белок не ингибировал MIF, а практически разрушенный при 30-летнем хранении белок сработал. Попытки ингибировать MIF добавлением неорганических солей меди не привели к успеху. Ингибировали MIF либо практически разрушенные при хранении препараты церулоплазмينا, либо выделенные из сыворотки и плазмы крови без стабилизации хелаторами металлов. Добавки хелаторов мы обычно использовали, чтобы гарантированно подавить возможность активации свертывания крови, которая нередко происходила при очистке церулоплазмينا и, как оказалось, она связана с его взаимодействием с тромбином (Sokolov *et al.* 2015). Для ингибирования активности MIF необходимо его взаимодействие с церулоплазмином, у которого заполнены

ионами меди лабильные сайты (LS1 и LS2). Их заполнение происходит при разрушении церулоплазмينا протеиназами.

В нашей недавней работе мы сравнили комплексообразование насыщенного ионами меди церулоплазмينا с MIF, у которого вместо субстрата в активном центре был суицидный ингибитор, фенилизотиоцианат либо флуоресцеинизотиоцианат, каждый из которых атакует N-концевой остаток пролина MIF. Только MIF с фенилизотиоцианатом образовал комплекс с церулоплазмином, а второй ингибитор создавал стерические препятствия для контакта белков (Соколов и соавт., 2018). При работе с моделью септического шока у мышей оказалось, что насыщенный ионами меди церулоплазмин повышал смертность животных, и этот эффект полностью блокировался полученными нами антителами против MIF (Kostevich *et al.* 2015). Эти данные свидетельствуют в пользу патологической роли церулоплазмينا при воспалении и хорошо согласуются с данными об обнаружении деградированного церулоплазмينا при хроническом воспалении и нейродегенеративных заболеваниях (Squitti *et al.* 2008; Sokolov *et al.* 2015), а также выраженном противовоспалительном действии хелаторов меди – пенициллина и тетрамолибдата (Suarez-Almazor *et al.* 2000; Brewer, 2014).

Следуя примеру прекрасного лектора, профессора Александра Витальевича Полевщикова, я бы хотел немного отвлечься от металлопротеидов, чтобы приступить к заключительной части повествования. Александр Витальевич рассказал мне историю о встрече двух великих мыслителей: Льва Николаевича Толстого и Ильи Ильича Мечникова. В книгах Симона Элевича Шноля я прочитал такую же историю – после их встречи граф записал в своем дневнике: «Был тут Илья Ильич... столько всего наговорил. Рассказывал, в крови нашли

какие-то лейкоциты. Какая гадость!». Именно с выделения «этой гадости» и началось мое знакомство с Александром Витальевичем, которое произвело на меня неизгладимое впечатление. В попытках поиска других белков нейтрофилов (кроме лактоферрина), участвующих во взаимодействии с церулоплазмином, руководители направили меня учиться выделению нейтрофилов к Александру Витальевичу. Он быстро продиктовал мне список того, что нужно подготовить для работы, отдал подробный протокол. На следующий же день он продемонстрировал, как готовить раствор фикола-урографина, сопровождая это смехом и историческими анекдотами, подобными описанному выше. Когда настало время брать кровь, то профессор посмотрел на мои худые руки, вздохнул, засучил рукав и ловко взял свою кровь для работы. Я был поражен и особенно счастлив, когда спустя несколько часов наблюдал выделенные живые нейтрофилы в окуляре микроскопа.

Все же я не могу не согласиться со Львом Николаевичем – работа с лейкоцитами, и особенно нейтрофилами, не из приятных: она требует чрезвычайной аккуратности и скорости, ведь время полужизни этих клеток составляет лишь около 6 часов и при любой возможности они готовы разразиться дыхательным взрывом, либо выстрелить нейтрофильными ловушками, либо вовсе уйти в апоптоз. Хотя мы привыкли, что лейкоциты, исходя из их названия, должны быть белыми, но преобладающая популяция лейкоцитов, нейтрофилы, окрашена в зеленый цвет из-за высокого содержания гем-содержащего фермента миелопероксидазы. Оказалось, что она является еще одним партнером церулоплазмينا (Segelmark *et al.* 1997). В самом начале работы после теоретических подсчетов стало ясно, что для выделения существенных количеств миелопероксидазы нужно было бы переработать несколько литров свежей донорской крови. Здесь на помощь вновь пришел

профессор Владимир Николаевич Кокряков, который просто отдал для работы несколько десятков граммов замороженной лейкоцитарной массы, которая уже после размораживания выделила раствор ярко-зеленого цвета с ферментом. Мне дважды довелось побывать на конференциях, посвященных гем-содержащим пероксидазам (Peroxidase Meeting): в 2013 году в Сиднее и в 2015 году в Кёльне. Каждый раз, когда я демонстрировал слайды с колонками, окрашенными в темно-зеленый (почти черный от насыщенности) цвет, аудитория замирала – практически никто из зарубежных ученых никогда не держал в руках такого чудовищного количества миелопероксидазы.

Миелопероксидаза – это странный случай доктора Джекилла и мистера Хайда. С одной стороны, синтез миелопероксидазой хлорноватистой кислоты (НОСl) важен для эффективной антимикробной защиты и нормального разрешения воспаления. Люди с наследственными дефектами в гене миелопероксидазы страдают от кандидозов, а нокаутированные по гену миелопероксидазы мыши тяжело переносят модели воспаления. С другой стороны, продуцируемые окислители способны вызывать биodeградацию даже таких устойчивых материалов, как углеродные нанотрубки (Vlasova *et al.* 2016) и фуллерены (Литасова и соавт., 2016). Ирина Ивановна Власова из НИИ Физико-химической медицины ФМБА назвала фермент «королевой пероксидаз». Так, чрезмерная продукция НОСl приводит к повреждению биополимеров и антиоксидантов, т.е. галогенирующему стрессу, который отягощает развитие атеросклероза. Интересно, что пациенты с дефицитом миелопероксидазы никогда не страдают от атеросклеротических поражений. Термин «галогенирующий стресс» предложен профессором Олегом Михайловичем Панасенко (НИИ Физико-химической медицины ФМБА) и подробно описан в нашем обзоре (Панасенко и соавт., 2013).

Анализируя работу Сегельмарка и сотрудников, мы обратили внимание, что по мере очистки церулоплазмина из плазмы крови и при его хранении ингибирующая активность в отношении миелопероксидазы снижалась (Segelmark *et al.* 1997). Тот, кто потратил несколько лет на безуспешные попытки выделить недеградированный препарат церулоплазмина, поймет, что ингибировал миелопероксидазу только интактный белок, а по мере очистки и хранения он подвергался атаке протеиназами и терял активность. Мы подтвердили это предположение сначала методами энзимологии (Sokolov *et al.* 2008), а затем упомянутая ранее Валерия Ролановна Самыгина успешно вырастила кристаллы комплекса церулоплазмина и миелопероксидазы и с помощью рентгеноструктурного анализа получила трехмерную модель комплекса (Samygina *et al.* 2013). Я помню искреннее восхищение Кристины Винтерборн, работами которой я зачитывался, будучи студентом, и с которой я беседовал о полученной модели на конференции в Сиднее. Она сравнивала эту структуру с прекрасной бабочкой: с двух сторон от симметричной молекулы миелопероксидазы располагалось две молекулы церулоплазмина, и та самая петля, которую обычно разрезают при воспалении протеиназы, входила в каждый из гемовых карманов димера. В такие моменты нельзя не согласиться с высказыванием профессора Евгения Петровича Троицкого: «Занавес, скрывающий от нас интимную сторону биопроцессов, пока еще не поднят, но он уже колышется при помощи микроэлементов!». Несколькими годами позже был обнаружен структурный аналог изученного комплекса: оказалось, что золотистый стафилококк избегает гибели в фаголизосоме нейтрофила, секретировав пептидный ингибитор, который, как и петля церулоплазмина, закрывает вход в гемовый карман миелопероксидазы и препятствует проявлению ее антимикробной активности (De Jong *et al.* 2017).

В 2013 году были изучены и более сложные макромолекулярные ансамбли, поскольку и миелопероксидаза, и лактоферрин могут одновременно взаимодействовать с церулоплазмином, а такие комплексы ранее были обнаружены нами при воспалении в плазме крови и экссудатах пациентов (Соколов и соавт., 2007). Нами также были впервые обнаружены комплексы церулоплазмينا с миелопероксидазой и апоВ-100-содержащими липопротеинами, роль которых в реакциях развития атеросклероза еще предстоит прояснить (Sokolov *et al.* 2010, 2014).

Следует отметить, что церулоплазмин не во всех случаях выступает как эффективный ингибитор миелопероксидазы. Так, при ревматоидном артрите из-за активации протромбина происходит частичный протеолиз церулоплазмينا, и степень выраженности этого процесса коррелирует с тяжестью заболевания, активностью тромбина и активностью миелопероксидазы (Sokolov *et al.* 2015). Использование гирудина препятствует активности тромбина и снижает тяжесть симптомов, однако, учитывая возможность перераспределения ионов меди в церулоплазмине при протеолизе, нельзя исключить, что определенную роль в усугублении артрита играет и активация MIF, поскольку так называемая «диализуемая медь» обнаруживается в синовиальной жидкости пациентов.

Исследование супероксиддисмутазной активности церулоплазмينا привело нас к еще одному интересному свойству этого белка – подавлению активности нейтрофилов. При сотрудничестве с Галиной Федоровной Судьиной и коллегами из НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ было показано, что церулоплазмин взаимодействует с 5-липоксигеназой – ключевым ферментом синтеза лейкотриенов – и снижает синтез нейтрофилами этих мощных медиаторов воспаления (Соколов и соавт., 2010). Примерно в это же время Елена Юрьевна Варфоломеева и Михаил Валентинович Филатов

из Петербургского института ядерной физики им. Б.П. Константинова, НИЦ «Курчатовский институт», обнаружили, что при попытке активировать нейтрофилы провоспалительным стимулом в составе цельной крови клетки практически не активируются в крови, полученной от беременных женщин. И хотя довольно давно известно, что по мере увеличения срока беременности в плазме крови возрастает концентрация церулоплазмينا, фракционирование компонентов крови и иммунопреципитация церулоплазмينا убедительно доказали, что именно этот белок значительно подавляет дыхательный взрыв нейтрофилов (Varfolomeeva *et al.* 2016). Мы предполагаем, что одной из функций церулоплазмينا может быть снижение риска иммунного конфликта при беременности, что согласуется с упомянутыми ранее опытами на беременных Ag-крысах (Shavlovski *et al.* 1995).

В английском языке есть пословица: *you can't teach an old dog new tricks* (нельзя научить старую собаку новым трюкам). В случае церулоплазмينا она абсолютно неверна, я продемонстрировал, что «эта старая собака» не перестает удивлять исследователей новыми трюками – многообразием функций, ряд из которых был открыт с помощью подходов интерактомики. Итогом многих лет работы в Отделе молекулярной генетики ФГБНУ «ИЭМ» является существенное разрастание интерактомной сети вокруг основных объектов наших исследований: церулоплазмينا, лактоферрина и миелопероксидазы. В самом начале XXI века мы еще использовали стрелочные спектрофотометры и рН-метры, профили элюции при хроматографии фиксировали ленточные самописцы, на рабочих компьютерах не было доступа к интернету, а статьи мы получали с помощью зарубежных коллег с отставанием в годы. Сейчас, когда мы получаем статьи в день их публикации на сайтах журналов, измеряем в мельчайших каплях спектры белковых растворов, полученных

при автоматизированной хроматографии, изучаем молекулярные взаимодействия с помощью чипов, основанных на эффекте плазмонного резонанса – трудно себе представить, как можно было работать в тех условиях. В настоящее время в Отделе сформирован практически полный комплекс интерактивных подходов, позволяющий идентифицировать новые взаимодействия, получить партнеры в очищенном состоянии, охарактеризовать их сродство, и, наконец, приблизиться к самому главному – пониманию специфичности и функции конкретного взаимодействия. Следует отметить, что существенную роль в установлении интерактивных связей сыграли научные связи как внутри Института Экспериментальной Медицины, так и за его пределами.

Мне хочется надеяться, что мы находимся не в начале пути или достигли некоего финала, но движемся где-то посередине, и данная речь является отражением промежуточных итогов. Продолжаются исследования функций металлопротеидов в норме и при патологиях, изучение потенциала данных белков и их партнеров по интерактому для диагностики. Безусловным преимуществом интерактивных работ является определенная свобода выбора направления исследований. Я выражаю глубокую признательность всем сотрудникам Отдела молекулярной генетики и других подразделений ИЭМа, а также многочисленным коллегам за счастье заниматься интересным и любимым делом на протяжении 18 лет. И верю, что уже в недалеком будущем мои повзрослевшие ученики смогут поделиться с Ученым советом, коллегами и гостями новыми интересными результатами и своим видением решения научных проблем.

© А.В. Соколов.

Соколов А.В.

Интерактомия металлопротеидов. Санкт-Петербург, 2018. 24 с.

Тираж 120 экз.

В оформлении обложки использована литография

М. К. Эшера «Магическое зеркало».