

ЧОВЕШКИ ЕРИТРОЦИТИ СВЪРЗВАТ СПЕЦИФИЧНО ГОВЕЖДИ ⁵⁹FE-ЛАКТОФЕРИН

Ана Манева * , Борислава Талева , Лилия Манева-Радичева****

**Department of Biochemistry, Pharmaceutical Faculty, Medical University of Plovdiv, 15 A Vasil Aprilov Str., 4002 Plovdiv, Bulgaria, a_maneva@gbg.bg*

***Department of Biochemistry, Medical Faculty, Medical University of Sofia, Zdrave 2 Str., 1431 Sofia, Bulgaria*

HUMAN ERYTHROCYTES SPECIFICALLY BIND BOVINE ⁵⁹FE-LACTOFERRIN

Ana Maneva * , Borislava Taleva ** Lilia Maneva-Radicheva **

** Department of Biochemistry, Pharmaceutical Faculty, Medical University of Plovdiv, 15 A Vasil Aprilov Str., 4002 Plovdiv, Bulgaria, a_maneva@gbg.bg*

*** Department of Biochemistry, Medical Faculty, Medical University of Sofia, Zdrave 2 Str., 1431 Sofia, Bulgaria*

ABSTRACT

Lactoferrin (LF) has many biological functions that are mediated by binding to membrane receptors. Molecule of bovine LF (bLf) shares about 70% amino acid sequence homology with human LF, and in many cases shows stronger biological effects. The purpose of this study is to presents the kinetics of specific binding of bovine ⁵⁹FeLf with human erythrocytes. The binding of bovine ⁵⁹FeLf with human erythrocytes is a specific process, which reaches 31% of total binding. Scatchard analysis showed the presence of two classes of binding sites for bLf. Class I has $Kd_1 = 2.245 \times 10^9 M^{-1}$ and 216 binding sites. Class II has $Kd_2 = 0.965 \times 10^9 M^{-1}$ and 926 binding sites.

Key words: erythrocytes, receptors, bovine lactoferrin

Лактоферинът (Лф) притежава множество биологични функции. Той има антиоксидантна, имуномодулираща, противовъзпалителна, противотуморна, антивирусна, антиалергична и антиатерогенна активност. Лф е растежен фактор и стимулира клетъчната диференциация (Lonnerdal, 2003; Manev и съавт. 1998). Тези негови свойства правят перспективно производството и използването му за профилактика и терапия на различни заболявания (Манева и Манев, 2006).

mRNA за говеждия Лф (гЛф) има 2351 бази и кодира белтък с 708 аминокиселини с един сигнален пептид от 19 аминокиселини, непосредствено предшестваш аминокиселинна секвенция, отговаряща на 40-те аминокиселини от N-края. гЛф има висока хомоложност с други трансферини от семейството. Молекулата на гЛф притежава около 70% хомоложност в аминокиселинната последователност с човешкия Лф. В редица случаи гЛф проявява по-силен биологичен ефект от човешкия Лф (Goodman и Schanbacher, 1991).

Биологичните ефекти на Лф са опосредствани от предварително свързване с мембранни рецептори. В наши експерименти за първи път са установени рецептори за човешки Лф върху човешки полиморфонуклеарни клетки, тромбоцити, еритроцити и клетки от коластра, 80% от които са фагоцитиращи клетки (Манева и съавт. 1982, 1983, 1993, 1999).

Целта на настоящото проучване е да представи резултатите от изследванията върху специфичното свързване на говежди ⁵⁹FeЛф с човешки еритроцити.

МЕТОДИ И РЕАГЕНТИ

Изолиране на еритроцити. От хепаринизирана кръв на здрави дарители се отделяха еритроцити по метода на Cohen и съавт. (1976). Хепаринизирана кръв от здрави дарители се

центрофугираше при 2000 g, 5 min, 4°C и утаените клетки ресуспендираха в 4 обема PBS, pH=7.4. След три последователни центрофугирания при 1800, 1500 1300 g, еритроцитите се изолираха според плътността си. Еритроцитната фракция се ресуспендираше в PBS pH=7.4 за да се получи клетъчна концентрация 2×10^7 /ml чрез преброяване в камера на Бюркер и използване на стандартен KF2 микроскоп (Carl Zeiss, Jena, Germany). Суспензията не съдържаеше други видове кръвни клетки.

Приготвяне на говежди ^{59}Fe Лф за рецепторни проучвания

гЛф е продукт на US Biochemical Corporation, Cleveland, Ohio, U.S.A Говежди апо-Лф се получаваше чрез диализа на 0.013 mM говежди Лф срещу 0.2M цитратен буфер (pH 4) при стайна температура, последвано от двукратна смяна на буфера с бидестилирана вода. 0.5 ml разтвор на апо-Лф се добавяха към 0.5 ml 0.1M натриев цитрат/натриево-бикарбонатен буфер (pH 7.4) и 2.5 ml ^{59}Fe - аскорбинат. За маркиране се използваше ^{59}Fe -аскорбинат (Laboratorie Saxoniae GmbH, Hamburg, Germany) съдържащ 6.8×10^{-7} g. ^{59}Fe , с тотална радиоактивност 2.5 MBq. Сместа с pH 7.4 се разклащаше при 37°C за 24 часа.. Накрая несвързаното желязо се отстраняваше чрез диализа срещу 20 mM NaHCO₃ (pH 7.4) при стайна температура за 2 часа. След белязането материалът показваше на PAGE само един пик радиоактивност.

Експерименти за определяне на специфичното свързване на говежди ^{59}Fe Лф с еритроцити

В тези експерименти беше изследвана зависимостта на специфичното свързване на говежди ^{59}Fe Лф в зависимост от нарастващи концентрации на белязания Лф. Успоредно са изследвани хомоложна система (човешки Лф/човешки еритроцити) и хетероложна (говежди Лф/човешки еритроцит).

Пробите за определяне на специфичното и неспецифично свързване се приготвяха в 4 повторения. Епруветките за определяне на неспецифичното свързване съдържаха: 0.01-0.1 ml ($0.13-1.3 \times 10^{-11}$ moles) говежди ^{59}Fe Лф, 0.05 ml еритроцитна клетъчна суспензия (1×10^6 еритроцити), 1.3×10^{-9} moles (100 пъти повече) говежди небелязан FeЛф и PBS (pH 7.4) до краен обем 0.4 ml. Тоталното свързване беше определено в отсъствие на небелязан гЛф, обемът на който беше заместен със същия обем PBS. Свързващите експерименти се провеждаха при 37°C. След 30 min инкубация реакцията се спираше с 1 ml леден PBS и клетките събираха чрез центрофугиране при 6000 g, 4°C за 10 min. Специфичното свързване ($\text{g } ^{59}\text{Fe} \text{ Лф} \times 10^{-9}$) се определяше като разлика между тоталното (без конкурент небелязан гЛф) и неспецифичното (в присъствие на конкурент).

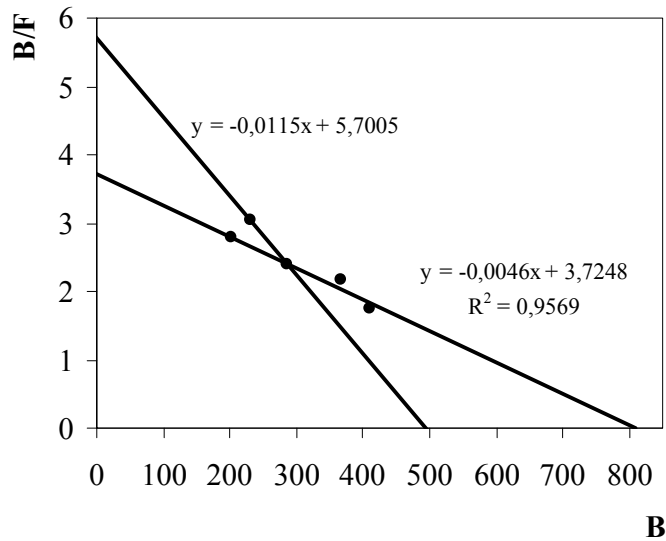
Свързаната радиоактивност към седиментиралите еритроцити се изчисляваше като разлика между тоталното и неспецифично свързване.

Статистически анализ – използван е методът на Scatchard, 1949, вариационен, корелационен и регресионен анализ.

РЕЗУЛТАТИ

Човешките еритроцити свързват говежди Лф. Свързването е специфичен процес, който достига до 31 % от тоталното свързване с избраните концентрации на добавения в средата белязан белтък (от 0.5 – 4 µg) (Табл.1)

Скетчартов анализ на зависимостта на свързване на говежди ^{59}Fe Лф с човешки еритроцити от нарастващи концентрации на белязания гЛф показва наличие на рецептори за гЛф, които са от два класа: I клас имат $Kd_1 = 2.245 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ и 216 свързващи места; II клас - $Kd_2 = 0.965 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ и 926 свързващи места. Зависимостта на свързването се представя с две прави с уравнения: $y_1 = 5.57 - 0.011 \cdot x$, $n=2$, $r=1$, $p<0.001$ и $y_2 = 3.86 - 0.005 \cdot x$, $n=3$, $r=0.997$, $p<0.001$ (Фиг.1).



Фигура 1 Скетчартов анализ на свързването на говежди ⁵⁹Fe Лф с еритроцити. Абсциса: Свързан с мембраната ⁵⁹Fe Лф в $g \times 10^{-9}$ (B). Ордината – съотношение на свързания (B) към свободния (F) белязан Лф.

Таблица 1. Свързване на ⁵⁹Fe говежди Лф с еритроцити в зависимост от нарастващи концентрации на белязания белтък

Свързан ⁵⁹ Fe говежди Лф в отсъствие на конкурент(T) $g \times 10^{-6}$ ($x \pm SD$)	Свързан ⁵⁹ Fe говежди Лф в присъствие на конкурент(B) $g \times 10^{-6}$ ($x \pm SD$)	%*
274.25 ± 30.25	201.61 ± 21.06	75
306.89 ± 55,43	231.0 ± 28.14	75
408.62 ± 43.16	287.0 ± 15.83	70
531.44 ± 61,15	366.50 ± 38.19	69

* Свързването на ⁵⁹Fe говежди Лф в присъствие на конкурент (B) в % от тоталното (T). Специфичното свързване е разликата между (T) и (B)

ДИСКУСИЯ

Резултатите показват, че гЛф се свързва с по-висок афинитет с еритроцитите в сравнение с полиморфонуклеарните клетки (PMN), (Манева и съавт.1993). гЛф има около 2 пъти по-голям афинитет за високо-афинитетните места (K_{a1}) и около 3 пъти по-голям афинитет за ниско-афинитетните места на свързване (K_2) с еритроцитите в сравнение с PMN (Табл.2). Човешкият Лф, обаче, се свързва с около 50 пъти по-висок афинитет (K_{a1}) с еритроцитите в сравнение с говеждия белтък (Табл.1-3).

Таблица 2. Параметри на специфично свързване на говежди ^{59}Fe Лф с неутрофили и еритроцити

Клетки	Kd_1	Kd_2
Неутрофили*	$1.27 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 1800 рецептори/клетка	$0.37 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 4030 рецептори/клетка
Еритроцити	$2.245 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 216 рецептори/клетка	$0.965 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 926 рецептори/клетка

Данни от Maneva и съавт.(1983).

Таблица 3. Афинитет на свързване на човешки и говежди Лф с еритроцити

Вид Лф	Афинитет на свързване
Човешки Лф*	$Kd_1 = 106.24 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ $Kd_2 = 11.73 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$
Говежди Лф	$Kd_1 = 2.819 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ $Kd_2 = 0.433 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$

Би могло да се предположи, че Лф има специфична протективна функция по отношение на еритроцита. Прави впечатление голямата разлика в афинитета на свързване на човешки и говежди Лф. Вероятно тук се проявява видова специфичност, защото човешки Лф се свързва в хомоложна система с човешки еритроцити, а говеждия в хетероложна, присъща на друг вид (Табл.3).

Установено е, че Лф блокира свързването на еритроцитния белтък band 3 към моноцитите. Моноцитите „разпознават“ променените вследствие остаряване или окислителни нарушения еритроцити, което инициира еритрофагоцитоза. Лф притежава рецептори върху моноцитите и е способен да „измества“ band 3 като конкурент за същите свързващи места върху моноцитите (Eda и съавт. 1997). Може да се предположи, че Лф и band 3, поради сходство във въглехидратната компонента на техните молекули, могат да се свързват към едни и същи места върху мембраната на моноцитите, и това място е рецепторът за Лф. При физиологични условия като естествен лиганд Лф се свързва с предпочитане с рецептора и пречи на разрушаването на еритроцитите чрез фагоцитоза. Намерено е, че основната част (около 70%) от анти - band 3 IgG разпознава сиализираната поли-N-ацетилгалактозаминава въглехидратна верига от молекулите на band 3 и Лф (Верри и съавт.1996). Също така е установено, че band 3 се превръща в променен антиген, разпознаван от моноцитите и фагоцитиран при блокиране на тиолови групи в еритроцитните мембранни белтъци (Верри и съавт. 2000). Лф като антиоксидант може да бъде естествен протектор на еритроцита срещу окислителни промени в band 3 (Maneva и съавт. 2003) и тези негови ефекти са опосредствани от предварително свързване с мембранни рецептори (Taleva и Maneva, 2009).

Нашите предишни проучвания доказаха, че човешкият Лф е протектор на еритроцитната мембрана срещу окислителен стрес (Maneva и съавт. 2003), а също така и

стимулатор на еритроцитната гликолиза (Maneva и съавт. 2003) и АТФ-азна активност (Maneva и съавт. 2008). За тези ефекти човешкият Лф използва еритроцитни сигнали (Maneva и съавт. 2007, 2009). Би могло да се предположи, че говеждият Лф също така би проявявал същите стимулиращи и протективни свойства върху човешките еритроцити.

ЛИТЕРАТУРА

1. Манева, А., В. Манев, 2006. Механизми на противотуморната активност на лактоферина. В Сб. „Проблеми на имунологичното здраве през XXI век”, София, ноември 146-184
2. Beppu M., S. Eda, M Fujimaki., E. Hishiyama and K Kikugawa, 1996. Recognition of poly-N-acetyllactosaminyl saccharide chains on iron-oxidized erythrocytes by human monocytic leukemia cell line THP-1 differentiated into macrophages. Biol Pharm Bull., 19,188-194
3. Beppu M., K. Ando, M. Saeki, N.Yokoyama and K. Kikugawa, 2000. Binding of oxidized Jurkat cells to THP-1 macrophages and antiband 3 IgG through sialylated poly-N-acetyllactosaminyl sugar chains. Arch Biochem Biophys., 384, 368-374.
4. Eda S., K. Kikugawa and M. Beppu, 1997. Characterization of lactoferrin-binding proteins of human macrophage membrane: multiple species of lactoferrin-binding proteins with polylactosamine-binding ability. Biol Pharm Bull., 20,127-133
5. Goodman R.E. and F. L. Schanbacher, 1991. Bovine lactoferrin mRNA: sequence, analysis, and expression in the mammary gland. Biochem. Biophys. Res. Commun., 180, 75-84
6. Lonnerdal B., 2003. Nutrition and physiologic significance of human milk proteins. Am. J. Clin. Nutr., 77: 1537S–1543S
7. Maneva, A., P. Angelova-Gateva, B.Taleva, L.Maneva-Radicheva, 2007. Lactoferrin stimulates erythrocyte Na⁺/K⁺ Adenosine Triphosphatase: Effect of some modulators of membrane phosphorylation. Z.Naturforsch., 62c, 897-905
8. Manev, V., A. Maneva. L. Sirakov, 1998. Effect of lactoferrin of phagocytic activity of polymorphonuclear cells isolated from blood of patients with autoimmune diseases and *Staphylococcus aureus* allergy. Adv. Exp. Med. Biol., 443, 321-330
9. Maneva, A. B. Taleva, 2008. Effect of Some Flavonic Compounds and Ascorbic Acid on the Lactoferrin Stimulation of the Erythrocyte Glycolysis and Na⁺/K⁺-ATPase Activity . Z.Naturforsch., 63c, 773-779
10. Maneva, A., B.Taleva, L Maneva, 2003. Lactoferrin-Protector against oxidative stress and regulation of glycolysis in human erythrocytes. Z. Naturforsch., 58c, 256-262
11. Maneva, A., B. Taleva, V. Manev, L. Sirakov. 1993. Lactoferrin binding to human platelets. Int J. Biochem., 25, 707 - 712
12. Maneva, A., L. Sirakov, V. Manev, 1983. Lactoferrin binding to human polymorphonuclear cells. Int J. Biochem., 15, 981 – 984
13. Maneva. A., L Sirakov, 1982. Lactoferrin binding to cells isolated from human colostrum. Studia biophysica, 92, 35-43
14. Scatchard G., 1949. The attraction of protein for small molecules and ions. Ann.N.Y.Acad.Sci., 51, 660-675
15. Taleva, B A. Maneva, L. Sirakov, 1999. Essential metal ions alter the lactoferrin binding to the erythrocyte plasma membrane receptors. Biological Trace Element Research, 68, 12-23
16. Taleva B. and A. Maneva. 2009. Interference of some modulators of protein phosphorylation and ion transport with lactoferrin stimulatory effect on erythrocyte glycolysis. BIOTECHNOL. & BIOTECHNOL. EQ., 23/SE, 498-501