

На правах рукописи

ПОЛЯКОВ
Дмитрий Степанович

**ФИБРИЛЛОГЕНЕЗ БЕТА2-МИКРОГЛОБУЛИНА
И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ
ГЕМОДИАЛИЗНОМ АМИЛОИДОЗЕ**

03.01.04 – Биохимия

14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург
2011 г.

Работа выполнена в Отделе молекулярной генетики учреждения Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины Северо-Западного отделения Российской академии медицинских наук и в Научно-методическом центре по молекулярной медицине Государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования "Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова" Росздрава.

Научные руководители:

Д.м.н., проф.

Михаил Михайлович Шавловский

Д.м.н., проф.

Арег Артемович Тоголян

Официальные оппоненты:

Академик РАМН, д.м.н., проф.

Олег Иванович Киселев

Д.м.н., проф.

Андрей Семенович Симбирцев

Ведущее научное учреждение:

Санкт-Петербургский государственный университет.

Защита состоится 26 мая 2011 года в 11 часов на заседании Диссертационного совета Д 001.022.03 по защите докторских и кандидатских диссертаций при НИИЭМ СЗО РАМН по адресу: Санкт-Петербург, 197376, Каменноостровский проспект, дом 69/71.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИЭМ СЗО РАМН по адресу: Санкт-Петербург, 197376, ул. Академика Павлова, 12.

Автореферат разослан «___» _____ 2011 года.

Ученый секретарь Диссертационного совета
Доктор биологических наук, проф.

Л.В. Пучкова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Терминальная стадия хронической почечной недостаточности - тяжелое, угрожающее жизни состояние, требующее замещения утраченной почечной функции. Актуальность проблемы замещения функции почек обусловлена значительным увеличением числа таких больных во всем мире.

Во второй половине 20 века в связи с разработкой новых технологий появилась возможность продления жизни больным, страдающим тяжелыми заболеваниями почек. Введение в практику процедур очистки крови при помощи диализа позволяет больным, которые прежде неизбежно погибали, относительно комфортно жить в течение десятилетий. Однако вскоре после введения в практику гемодиализного лечения было обнаружено, что у части больных развивается особая форма амилоидоза, так называемый гемодиализный амилоидоз, или β_2 -микроглобулиновый амилоидоз (А β_2 М). Он носит вторичный характер и его условием служит повышение концентрации в плазме крови особого белка – β_2 -микроглобулина (β_2 М). Нарушение почечного катаболизма β_2 М является причиной многократного возрастания содержания белка в плазме крови. Клинически А β_2 М сопровождается снижением качества жизни больных, и для купирования симптомов амилоидоза приходится прибегать даже к хирургическому лечению. Диагностика А β_2 М затруднена, терапия мало эффективна. До сих пор остаются недостаточно исследованными молекулярные основы патогенеза А β_2 М.

Гемодиализ – пример инвазивной терапии. Так как эта процедура проводится у больных с почечной недостаточностью, то необходимо четко представлять вклад основного заболевания и проводимых лечебных мероприятий в развитие ответных реакций в первую очередь со стороны иммунной системы.

Несмотря на многочисленные исследования, до сих пор не решены многие фундаментальные проблемы развития амилоидозов вообще и А β_2 М в частности. В основе патогенеза амилоидозов лежит аномальный фибриллогенез конкретного белка, который обусловлен действием совокупности внешних и внутренних факторов. Выяснение роли этих факторов и их относительного вклада позволит не только понять причины патологии, но и будет способствовать разработке эффективных способов лечения этих достаточно тяжелых заболеваний.

Цель исследования

Целью настоящего исследования являлось выяснение особенностей фибриллогенеза β_2 М и молекулярных основ гемодиализного амилоидоза, а также роли иммунных факторов в патогенезе этого заболевания

Задачи исследования

1. Получить в очищенном состоянии природный β_2 М человека и поликлональные антитела к этому белку.
2. Создать генетическую конструкцию для синтеза нативного рекомбинантного β_2 М человека в бактериальной системе.
3. Создать генетическую конструкцию для синтеза в бактериальной культуре рекомбинантного белка слияния, состоящего из β_2 М и зеленого флуоресцентного белка.

4. Создать генетические конструкции для синтеза укороченных рекомбинантных $\beta 2M$, накапливающихся в клетках в виде телец включения.
5. Получить в очищенном состоянии и изучить свойства, в том числе фибрилlogenность, рекомбинантных бета-2микроглобулинов и белка слияния.
6. Изучить иммуногенность фибрилл, образованных из $\beta 2M$ человека.
7. Определить содержание цитокинов в плазме крови больных, получающих процедуры гемодиализа на протяжении различных сроков.

Научная новизна полученных результатов

Предложен новый способ препаративного выделения $\beta 2M$ из диализата плазмы крови больных, получаемого во время лечебной процедуры гемодиализации.

Создана экспрессионная генетическая конструкция, содержащая ген полноразмерного $\beta 2M$ человека. Введенная в структуру гена полинуклеотидная последовательность, которая кодирует лидерный пептид, направляющий синтезируемый белок в периплазму, позволяет получать нативный $\beta 2M$ без образования телец включения. Таким образом, исключаются стадии денатурации и ренатурации, необходимые для извлечения белка из телец включения. Благодаря введенной последовательности из пяти гистидинов на С-конце, синтезируемый в *E.coli* $\beta 2M$ может быть эффективно и просто очищен на никель-хелатном-агарозном сорбенте. Впервые показано, что полученный таким образом белок способен образовывать амилоидные фибриллы, сходные с амилоидными фибриллами, полученными из природного $\beta 2M$.

Получены генетические конструкции, кодирующие укороченные с N-конца варианты $\beta 2M$. Показана фибрилlogenность и склонность к образованию олигомеров укороченных на 6 и 10 аминокислотных остатков рекомбинантных $\beta 2M$. Рекомбинантный вариант без 10 аминокислотных остатков получен и охарактеризован впервые.

Впервые создана экспрессионная генетическая конструкция для синтеза в *E.coli* белка слияния $\beta 2M$ человека с зеленым флуоресцентным белком. Показано, что получаемый белок слияния $\beta 2MSF$, с одной стороны, обладает зеленой флуоресценцией, свойственной нативному GFP, с другой стороны, $\beta 2MSF$ способен образовывать фибриллы, не теряя при этом своих флуоресцентных свойств.

Впервые продемонстрировано, что фибриллы $\beta 2M$, сформированные как при pH 2,0, так и при pH 7,4, прикрепляются к нитроцеллюлозному фильтру и не деполимеризуются во время стандартной процедуры Dot-BLOT (то есть при слабощелочных pH). При помощи таких фильтров показано, что IgG кролика неспецифически связываются с фибриллами $\beta 2M$.

Показано, что при гемодиализе у пациентов по мере увеличения сроков терапии возрастает содержание IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN- γ и TNF- α в плазме крови. В то же время содержание IL-10 на начальных этапах гемодиализа возрастает, и далее снижается, достигая нормальных значений.

Научно-практическое значение полученных результатов.

Результаты исследования имеют теоретическое значение, так как вносят

вклад в понимание молекулярных и иммунологических механизмов патогенеза гемодиализного амилоидоза, а также других амилоидозов.

Для изучения фибриллогенеза и поиска веществ, ингибирующих данный процесс или способствующих ему, необходимо иметь десятки миллиграммов очищенного $\beta 2M$. Созданные нами экспрессионные генетические конструкции синтезируют рекомбинантные $\beta 2M$ человека, как полноразмерный, так и его укороченные формы, встречающиеся у больных $A\beta 2M$. Благодаря введенным полигистидиновым последовательностям, созданные рекомбинантные $\beta 2M$ можно получить в необходимых количествах и относительно быстро и эффективно очищать. Для всех полученных белков показана способность к образованию амилоидных фибрилл, что позволяет предложить эти белки в качестве удобных моделей для изучения фибриллогенеза $\beta 2M$.

Обнаружение факта неспецифического связывания фибрилл $\beta 2M$ человека с IgG кролика, на наш взгляд, имеет научно-практическую значимость, так как этот эффект следует учитывать при дальнейшем изучении гуморального иммунного ответа на фибриллы $\beta 2M$. Если существует такое же связывание IgG человека с амилоидными фибриллами $\beta 2M$, то это может иметь важное значение в понимании патогенеза $A\beta 2M$, а также в подходах к малоинвазивной диагностике данного заболевания. Кроме того, данный факт следует иметь в виду и при разработке таких иммунологических методов диагностики $A\beta 2M$, в которых фибриллы $\beta 2M$ будут использоваться в качестве антигена.

Созданный нами рекомбинантный белок слияния $\beta 2M$ и зеленого флуоресцентного белка может быть использован для визуализации промежуточных стадий фибриллогенеза, а также для исследования внутриклеточной локализации как зрелых фибрилл, так и префибриллярных структур.

Результаты, полученные при изучении содержания цитокинов в плазме крови больных на хроническом гемодиализе, позволяют утверждать, что IL-10 и IL-6 могут служить маркерами клинического течения $\beta 2$ -микроглобулинового амилоидоза.

Представленные данные могут быть использованы для образовательных целей на кафедрах высших учебных заведений в курсах лекций по биохимии, молекулярной биологии и иммунологии.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Предложен эффективный способ препаративного выделения $\beta 2M$ из гемодильтрационного диализата плазмы крови больных, который позволяет получать очищенный $\beta 2M$ человека в нативном состоянии.
2. Показано, что созданные экспрессионные генетические конструкции для синтеза в бактериальной культуре позволяют получать нативный полноразмерный рекомбинантный $\beta 2M$ человека, рекомбинантный белок слияния (состоящий из $\beta 2M$ и зеленого флуоресцентного белка), а также укороченные варианты $\beta 2M$ (без шести и десяти N-концевых аминокислот).
3. Установлено, что все полученные рекомбинантные белки обладают способностью к фибриллогенезу. Для укороченных вариантов $\beta 2M$, кроме того, показана склонность к олигомеризации.

4. Показано, что белок слияния $\beta 2MSF$ обладает зеленой флуоресценцией, свойственной нативному GFP, но при этом способен образовывать фибриллы в условиях фибриллогенеза, описанных для $\beta 2M$.

4. Выявлено, что иммуноглобулины класса G кролика неспецифически связываются с фибриллами, сформированными из $\beta 2M$ человека.

5. Показано, что с увеличением срока, в течение которого больные подвергались процедуре хронического диализа, уровни IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, GM-CSF, IFN- γ и TNF- α в плазме крови увеличивались. При этом содержание IL-10 понижалось после трех лет диализа до уровня, статистически не различающегося с нормой.

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы были представлены на следующих конференциях: III международный молодежный медицинский конгресс «Санкт-Петербургские научные чтения - 2009», 13 международная Пущинская школа-конференция «Биология – наука 21 века» (28 сентября – 2 октября, 2009, Пущино), 14-я Пущинская международная школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 19 – 23 апреля 2010 года), 7 Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика — 2010», 15-я Пущинская международная школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 18 – 22 апреля 2011 года).

Внедрение результатов работы

Научные результаты и практические рекомендации могут быть внедрены в научный и учебный процессы отдела молекулярной генетики ГУ Научно-исследовательского института экспериментальной медицины РАМН (Россия, 197376, Санкт-Петербург, ул.Ак.Павлова, 12); кафедры медицинской биологии и генетики ГОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский Университет имени академика И.П.Павлова Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» (Россия, 197089, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6/8).

Личный вклад автора в проведение исследования

Лично соискателем были проведены: анализ литературы по теме исследования, планирование экспериментов, получение основной части результатов, написание статей и подготовка докладов на конференциях; создание и проверка экспрессионных генетических конструкций, выделение и очистка белков, используемых в работе, получение фибрилл; приготовление препаратов для флуоресцентного анализа, MALDI-TOF и ДНК-секвенирования также были выполнены соискателем. Кроме того, соискатель подготавливал образцы плазмы крови больных на гемодиализе и принимал участие в определении в них содержания цитокинов (совместно со старшим научным сотрудником НМЦММ на базе СПбГМУ им.акад.И.П.Павлова, к.м.н. К.А.Сысоевым), проводил статистическую обработку полученных результатов. Электронная микроскопия и исследование оптических свойств $\beta 2M$ и его производных, в частности фибриллярных форм, проводились совместно с сотрудниками Лаборатории структурной динамики, стабильности и фолдинга белков НИИ цитологии РАН.

Финансовая поддержка работы. Работа выполнена при финансовой

поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 09-04-00788), программы “Ведущие научные школы РФ” (НШ-1961.2008.4) и Минобрнауки (ГК от 09.03.2010 №_02_740_11_5141).

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 172 страницах машинописного текста, состоит из введения, четырех глав и списка литературы, в котором приведено 217 источника, в том числе 7 работ на русском языке и 210 на иностранных языках. Работа иллюстрирована 9 таблицами и 23 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение β 2М из ультрафильтраата плазмы больных, находящихся на хроническом гемодиализе. Концентрацию диализата осуществляли при помощи ультрафильтрации, используя мембраны с порами, проницаемыми для соединений с молекулярной массой <5 кДа (Hollow fiber cartridge, “Amicon”). Далее концентрат подвергали ультрафильтрации на мембране, проницаемой для белков с молекулярной массой <30 кДа. При необходимости, дальнейшую концентрацию с одновременной заменой буфера осуществляли на центрифужном фильтре с порами, проницаемыми для белков с молекулярной массой <5 кДа (Lot.: 2173558, “Sigma”).

Электрофоретическое разделение белков в полиакриламидном геле осуществляли в 12% полиакриламидном геле (ПААГ) (Laemmli et al. 1970) 9×9 см при градиенте напряжения 20 В/см.

Идентификация выделенного белка методом MALDI-TOF. Выделенный из диализата больного β 2М подвергали электрофорезу и исследовали методом MALDI-TOF. Идентификацию белков по «пептидному фингерпринту» осуществляли при помощи программы Mascot (www.matrixscience.com).

Получение поликлональных антител кролика к β 2М человека. Иммунизацию кроликов осуществляли фрагментом ПААГ, содержащим 100 мкг нативного β 2М, по стандартной схеме (Харбоу и др. 1977). Забор крови осуществляли на 10-ый день после последней иммунизации. Фракцию IgG получали методом высаливания сульфатом аммония (Брок и др. 1987). Аналогично проводили иммунизацию кроликов фибриллами β 2М, но вводили внутривенно не фрагмент ПААГ, а PBS, содержащий 100 мкг фибрилл β 2М.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) проводилась в реакционной смеси конечным объемом 30 мкл. В состав реакционной смеси входили праймеры (по 10 пМоль), буфер для Taq-полимеразы x1, 6 нМ dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 50 нМ MgCl₂, 1 единица Taq-полимеразы. ПЦР проводилась в пробирках объемом 0.6 мл на аппарате «Терцик» (Россия) с набором программ, определяющих температурный режим ПЦР. Температурный профиль ПЦР: 5 минут 95°C – 1 цикл; 1 минута 95°C, 1 минута 56°C, 1 минута 72°C – 30 циклов, 10 минут 72°C – 1 цикл.

Электрофоретическое разделение продуктов амплификации в 8% ПААГ, электрофоретическое разделение ДНК в агарозном геле, окрашивание ПААГ бромистым этидием, окрашивание ПААГ нитратом серебра проводились по стандартным методикам.

Выделение ДНК из агарозного геля осуществляли с помощью набора WizardSV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, США) согласно инструкции производителя.

Получение компетентных клеток E. coli. Бактерии E.coli выращивали в LB среде в стерильном флаконе, содержащем LB-среду, при 37°C при постоянном покачивании до OD₆₀₀=0.3–0.4. Клетки осаждали центрифугированием, и осадок ресуспендировали в 0,1 М CaCl₂, после чего инкубировали во льду в течение 20 минут. Полученные компетентные клетки E. coli использовали сразу или оставили на 1-3 дня во льду для дальнейшей

трансформации.

Лигирование. Вставка ПЦР-продуктов в плазмиды осуществлялась при помощи лигазной реакции. Для лигирования использовали лигазу фирмы «Fermentas» (Литва). Лигирование проводили в течение 1-16 часов при температуре +4°C. Количество ПЦР-продукта для лигирования определялось из формулы: ПЦР-продукт (нг) = $a*b*c/d$, где a – количество плазмиды (нг), b – размер ПЦР-продукта (п.н.), c – молярное соотношение плазмиды и ПЦР-продукта, d – размер плазмиды (п.н.). Молярное соотношение плазмиды и ПЦР-продукта брали 1/20. На 1 реакцию брали 40 нг плазмиды.

Для **трансформации компетентных клеток E. coli** штамма DH5(α) или BL21(DE3), к компетентным клеткам добавили лигазную смесь или плазмидную ДНК и инкубировали во льду 15 мин. Для осуществления теплового шока суспензию клеток инкубировали при 42°C 5 мин. и во льду 2 мин. Затем добавили среду LB и инкубировали 1 час при 37°C при постоянном покачивании, после чего высевали на чашки Петри, содержащие агаризованную LB-среду с ампицилином. Чашки инкубировали в течение ночи при 37°C. Трансформанты, устойчивые к ампициллину, отбирались для последующих исследований.

Выделение плазмидной ДНК из клеток E.coli. Культуру клеток E.coli культивировали ночь при 37°C в LB среде с ампициллином. Клетки осаждали центрифугированием, к осадку добавляли 50 мМ глюкозу, 25 мМ TrisHCl pH 8.0, 10 мМ EDTA pH 8.0, затем ресуспендировали. Добавляли 0.2N NaOH, 1% SDS, перемешивали в течение 5 минут. Добавляли 5M CH₃COOK, 11.5% CH₃COOH, несколько раз переворачивали пробирку. Затем инкубировали во льду 5 минут и центрифугировали. К супернатанту добавляли изопропиловый спирт, инкубировали при -20°C. После центрифугирования сливали спирт и растворяли осадок в воде. Добавляли РНКазу и инкубировали пробу на водяной бане при 37°C. Дальнейшее выделение ДНК представляло собой стандартную фенол-хлороформную экстракцию. Качество и примерную концентрацию выделенной плазмидной ДНК проверяли электрофоретическим разделением в 0.8% агарозном геле.

При **создании экспрессионной генетической конструкции pETb2m6.8** использовались праймеры 5' **ctgtggccatccagcgtactccaa**3', 5' **gtcaagcttatcagtgatggtga tggatcatgtctcgatcccactt**3'; эндонуклеазы рестрикции MscI, HindIII; плаزمида pET22b(+) (Novagen). РНК человека из лейкоцитов здорового добровольца выделяли с помощью TRIzol® Reagent по прилагающимся инструкциям фирмы «Invitrogen» (США). Реакцию обратной транскрипции осуществляли с помощью MLV-обратной транскриптазы «АмплиСенс» (Россия) по прилагающимся протоколам. Реакцию рестрикции проводили по стандартной методике с использованием эндонуклеаз рестрикции и по прилагающимся инструкциям фирмы «Fermentas» (Литва).

При **создании экспрессионных генетических конструкций pETb2m1.1, pETb2m2.1.** в качестве матрицы для ПЦР использовалась плазмида pETb2m6.8. В случае pETb2m1.1, прямой праймер 5' **catatgattcaggttactcacgt** 3' во фланкирующей части (выделена жирным шрифтом) содержал сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции NdeI (подчеркнут). Для вектора pETb2m2.1 прямой праймер имел следующее строение: 5' **ctgcatatg**tcacgtcatccagcaga 3'.

При **создании экспрессионной генетической конструкции pTRCb2msf** были подобраны праймеры 5'-**cagggtaccatccagcgtactccaa**-3', 5'-**cagggatccatgtctcgatcccac**-3' и эндонуклеазы рестрикции KpnI, BamHI.

Выделение и очистка рекомбинантных β 2М осуществлялась из клеток *E.coli* штамма BL21(DE3), трансформированных соответствующими экспрессионными конструкциями. Клетки *E.coli* росли в среде LB, содержащей ампициллин, синтез β 2М индуцировали добавлением изопропил- β -D-1-тиогаляктопиранозида (IPTG). Периплазматическую фракцию получали методом «осмотического шока» (Ausubel 1989). Для получения растворимой и нерастворимой внутриклеточной фракции бактериальные клетки отделяли от

среды культивирования путем центрифугирования, к отмытому клеточному осадку добавляли PBS, 1 mM PMSF, 10 mM имидазол и 5 mM β 2-меркаптоэтанол. Клетки разрушали ультразвуком, затем суспензию центрифугировали и супернатант отделяли от осадка. Супернатант содержал растворимую внутриклеточную фракцию белков, а осадок – нерастворимую, в том числе тельца включения.

β 2M были аффинно очищены на металл-хелатном никель-агарозном сорбенте (Invitrogen) (объем колонки 1.5 мл). Для этого к полученному содержимому бактерий добавляли фенолметилсульфонилфторид и имидазол (конечная концентрация 1 mM и 10 mM соответственно). (В случае выделения β 2M из телец включения, они растворялись в 8 M мочеvine.) Раствор фильтровали через металл-хелатный сорбент. Балластные белки отмывали, а целевой белок элюировали раствором, содержащим 200 mM имидазол. Содержащие β 2M фракции анализировали при помощи электрофоретического разделения в 12 % ПААГ. Концентрацию β 2M определяли спектрофотометрически, используя для полноразмерного β 2M значение коэффициента экстинкции $\epsilon_{280} = 1,63 \text{ мл} \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Формирование фибрилл β 2M. Для получения фибрилл природный и рекомбинантные β 2M с конечной концентрацией 30 μ M инкубировали в 150 или 200 mM глицин-HCl буфере (pH=2,0) в течение 7 или 14 суток при 37°C при постоянном перемешивании (500 rpm) на термошейкере TS-100 (Biosan). Для получения фибрилл в физиологическом pH, был применен модифицированный метод Кихара и соавторов (Kihara et al., 2005). В качестве «затравки» фибриллогенеза добавляли 1/100 объема готовых фибрилл той же концентрации, выращенных при pH=2,0 и стабилизированных 0,5 mM SDS. Кроме того, фибриллы из β 2M Δ 6 в физиологическом pH получали без стабилизации 0,5 mM SDS.

Измерение флуоресценции комплексов тиофлавина T с фибриллами проводили по модифицированному методу (LeVine et al., 1993): 10 мкл раствора фибрилл добавляли к 310 мкл буфера, содержащего 0,15 M NaCl, 25 mM Na-фосфат, 6 μ M Тиофлавин T (ThT), pH=7,4. Пробу тщательно перемешивали, затем инкубировали 5 минут при комнатной температуре и переносили в кювету. Регистрацию спектров флуоресценции проводили с помощью спектрофлуориметра AVANTES AvaSpec-2048 (Источник света AvaLight-LED, 460 nm). Для исключения сигнала, поступающего на регистрирующее устройство спектрофлуориметра вследствие рассеяния излучения, применяли фильтр, отсекающий часть спектра с длиной волны менее 460 nm. В качестве нулевой пробы использовали мономер β 2M в той же концентрации.

Полусухой **Western-BLOT** белков проводили по стандартной методике (Anderson et al., 1982). «Перенос» осуществлялся 1 час при постоянном токе 100 mA. «Окраску» нитроцеллюлозного фильтра (НЦФ) или PVDF-мембраны осуществляли кроличьими поликлональными антителами к GFP, β 2M или фибриллам β 2M. Вторыми антителами являлись конъюгированные с пероксидазой хрена IgG козы против IgG кролика («ICN», США).

Dot-BLOT. На НЦФ наносили по 1 мкл антигена. «Окраску» НЦФ осуществляли как при Western-BLOT.

Исследование содержания цитокинов в плазме крови больных на хроническом гемодиализе. В исследование было включено 86 пациентов с терминальной стадией ХПН, получающих постоянное лечение в отделении диализа ГОУДПО СПбМАПО. Все больные получали гемодиализ или гемодиализацию на высокопоточных либо высокоэффективных диализаторах с синтетической мембраной полисульфон. Процедура диализа осуществлялась трижды в неделю (два раза через день и один раз через два дня). Образцы венозной крови брали у всех больных не ранее, чем через двое суток после последней процедуры гемодиализа. Взятие крови осуществлялось в стерильную пробирку с K₃-EDTA, центрифугировали 10 минут при 5000 g, полученную плазму хранили при -20°C до проведения анализов. Контрольную группу составили практически здоровые лица

(n=13). Во всех образцах определяли IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α при помощи X-MAP-технологии методом мультиплексного анализа белков на анализаторе BioPlex-100 (Bio-Rad, США) с использованием коммерческой тест-системы. Статистическое исследование проводили методами непараметрической статистики с помощью критерия Манна-Уитни для независимых признаков (сравнение групп между собой) и критерия Спирмана для выявления корреляции между различными признаками с применением компьютерных программ Statistica и MS Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение β 2М из диализата больных на хроническом гемодиализе.

Для моделирования фибриллогенеза необходимы значительные количества очищенного β 2М. Поэтому нами разработан способ препаративного получения β 2М из диализата плазмы крови больных, получаемого во время процедуры on-line гемодиализации. В плазме крови таких больных концентрация β 2М существенно выше нормы. При фильтрации крови через гемодиализные мембраны некоторые количества β 2М поступают в фильтрат. В фильтрате содержание балластных белков гораздо меньше, чем в плазме крови, поэтому диализат может служить источником получения β 2М. Для получения β 2М диализная жидкость подвергалась ультрафильтрации через мембрану, проницаемую для веществ с молекулярной массой ≤ 5 кДа. При этом убирался большой объем воды и низкомолекулярные примеси. По данным электрофореза в 12% ПААГ с SDS в растворе после концентрирования присутствуют белки с молекулярной массой β 2М, а также более крупные белки, в частности, альбумин (см. рис. 1А). Для идентификации зоны, соответствующей по молекулярной массе β 2М, был осуществлен анализ методом MALDI-TOF. В результате было показано, что эта зона состоит из β 2М. Стрелкой на рисунке 1А обозначен участок геля, вырезанный для анализа методом MALDI-TOF. Идентификацию белков по «пептидному фингерпринту» осуществляли при помощи программы Mascot (www.matrixscience.com). Аминокислотная последовательность β 2М человека:

**IQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSD
LSFSKDWSFYLLYYTEFTPTTEKDEYACRVNHVTL SQPKIVKWDRDM**

Жирным шрифтом выделены пептиды, идентифицированные при помощи масс-спектрометрии в препаратах белка, подвергнутых трипсинолизу: K-IQVYSR-H, K-SNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLK-N, R.IEKVEHSDLSFSK.D, K.VEHSDLSFSK.D, R.VNHVTL SQPK.I, K.IVKWDR.D, K.IVKWDRDM., K.WDRDM, SNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLK + DEYACR. Кроме того, нами было высчитано «в ручную» соответствие пика с молекулярной массой 3250.4207Да двум пептидам: NFLNCYVSGFHPSDIEVDLLK (2496.1922Да) и DEYACR (755.2908Да). В нативном β 2М имеется дисульфидная связь между остатками цистеина 25 и 80. Мы предположили, что данная дисульфидная связь останется стабильной после трипсинолиза. Для определения ожидаемой массы этих двух пептидов, объединенных дисульфидной связью, мы от суммы масс пептидов вычли массу двух атомов водорода. Полученная таким образом масса 3249.4903Да соответствует одному из пиков пептидного фингерпринта β 2М.

Таким образом, масс-спектрометрический анализ показал, что быстро

мигрирующий компонент с кажущейся молекулярной массой около 12 кДа представляет собой β 2М. Для дополнительной очистки концентрат после первой ультрафильтрации дополнительно фильтровали через мембрану, проницаемую для белков с молекулярной массой ≤ 30 кДа. На электрофореграмме (рисунок 1А) видно, что полученный β 2М мигрирует в виде одной зоны (12 кДа). Выход белка зависит от исходного содержания в диализате, в среднем из 1 литра диализной жидкости можно получить до 1 мг β 2М. Так как в ходе выделения каких-либо денатурирующих воздействий не применялось, мы предположили, что нами получен β 2М в той конформации, в которой он присутствовал в плазме крови пациентов во время диализа.

Полноразмерный β 2М сам по себе не образует фибрилл в водном растворе при физиологических рН. Было показано, что β 2М при рН=7,0 даже в концентрациях, превышающих сывороточное содержание β 2М у диализных пациентов в тысячи раз (McParland et al., 2000), не образует фибрилл. При закислении среды можно добиться спонтанного (т.е. без затравки) фибриллогенеза. Благодаря удобству и воспроизводимости, этот метод применяется наиболее часто для получения амилоидных фибрилл *in vitro* (McParland et al., 2000, Radford et al., 2005, Stoppini et al., 2005). Для формирования фибрилл необходимо появление ненативных конформеров β 2М (Radford et al., 2005).

На рисунке 2А представлены данные электронной микроскопии фибрилл из полученного нами β 2М. Видны характерные фибриллярные структуры. Наличие фибрилл в таких препаратах подтверждается и данными анализа флуоресценции ThT в комплексе с β 2М. ThT применяется для количественной и качественной детекции амилоидных фибрилл (LeVine et al., 1993, McParland et al., 2000, Radford et al., 2005). В образцах, содержащих фибриллы, мы наблюдали резкое возрастание флуоресценции по сравнению с контролем – раствором мономера β 2М, содержащего ту же концентрацию ThT (рисунок 4). Природный β 2М использовался для получения антител, для изучения фибриллогенеза, а также в качестве реперного белка при создании генетических конструкций для синтеза рекомбинантных β 2М.

Получение рекомбинантного полноразмерного β 2М человека.

Получение достаточных количеств природного β 2М требует много времени. Работа с биологическими жидкостями сопряжена с возможностью инфицирования персонала. Поэтому для дальнейшей работы было решено создать экспрессионную генетическую конструкцию для получения рекомбинантного β 2М человека. Рекомбинантные аналоги природных белков могут быть получены в больших количествах. Кроме того, генная инженерия позволяет вносить любые модификации в целевой белок с последующим анализом влияния этих модификаций на его свойства. Мы получили кДНК β 2М человека, и на основе кДНК создали серию плазмид с различными модификациями кДНК.

Рекомбинантные β 2М обычно формируют тела включения (Chiba et al., 2003, Esposito et al., 2000, Kihara et al., 2005, McParland et al., 2000). Извлечение белка из телец включения требует применения сильных детергентов и последующей стадии рефолдинга. Однако ренатурация происходит не всегда, и не

может быть уверенности, что в дальнейшей работе используется белок в нативной конформации (Ventura et al., 2006).

Для получения растворимого рекомбинантного полноразмерного $\beta 2M$ нами была создана конструкция pETb2m6.8 на основе коммерческой плазмиды pET22b(+). кДНК $\beta 2M$ человека получали из тотальной РНК лейкоцитов при помощи обратной транскрипции. Далее осуществляли ПЦР с праймерами, позволяющими встроить продукт ПЦР в соответствующую плазмиду. Таким образом, был получен ПЦР-продукт, содержащий сайт рестрикции MscI на 5' конце, последовательность, кодирующую полноразмерный $\beta 2M$ человека, а также полигистидиновую последовательность, стоп-кодон и сайт рестрикции HindIII на 3' конце. Полученный ПЦР-продукт был вставлен в плазмиду. Плазмидная ДНК отобранных клонов была просеквенирована. Одна из плазмид содержала последовательность, кодирующую PelB «лидерный пептид», последовательность $\beta 2M$, а также полигистидиновую последовательность. Все указанные последовательности находились в одной рамке считывания. Эту плазмиду мы обозначили как «pETb2m6.8».

Рекомбинантный $\beta 2M$ получали из клеток E.coli штамма BL21(DE3), трансформированных созданной нами плазмидой pETb2m6.8. Мы сконструировали вектор таким образом, чтобы $\beta 2M$ синтезировался вместе с бактериальным PelB «лидерным пептидом», транспортирующим белок в периплазматическое пространство бактерии, и впоследствии отщепляющимся под воздействием бактериальной протеазы. Это позволяет получить $\beta 2M$, не содержащий дополнительного метионина на N-конце и начинающийся сразу с изолейцина, первой аминокислоты $\beta 2M$ человека. Как и ожидалось, в периплазме был обнаружен растворимый $\beta 2M$. Включение в вектор полигистидиновой последовательности на C-конце дает возможность весьма эффективно и быстро очистить белок на никель-агарозном сорбенте. Экстракция периплазматической фракции позволяет получить раствор, содержащий целевой белок и до 30% балластных белковых примесей. Аффинная хроматография приводит к полной очистке $\beta 2M$ (Рис. 1Б).

По данным электронной микроскопии, рекомбинантный $\beta 2M$ в соответствующих условиях (см. материалы и методы) образует фибриллярные структуры. Наличие амилоидных фибрилл подтверждается и данными анализа флуоресценции ThT в комплексе с $\beta 2M$ (рисунок 4).

Создание генетических конструкций для синтеза укороченных $\beta 2M$.

В литературе разными группами авторов описано, что в амилоидных отложениях всех исследованных больных $A\beta 2M$ встречаются укороченные на первые 6 и 10 аминокислотных остатков варианты $\beta 2M$. Авторы оценивают процентное содержание интактного $\beta 2M$ примерно в 70%, а содержание $\beta 2M$ с усеченным N-концом - в 30%. У здоровых людей, а также в биологических жидкостях больных $A\beta 2M$ укороченных форм $\beta 2M$ не встречается. Это может свидетельствовать о возможном вовлечении данных вариантов $\beta 2M$ в патогенез $A\beta 2M$. Поэтому для дальнейшего моделирования фибриллогенеза мы решили использовать не только полноразмерный $\beta 2M$, но и $\beta 2M$ без первых шести и десяти аминокислотных остатков. С этой целью мы создали соответствующие

экспрессионные генетические конструкции: рЕТb2m1.1 для получения рекомбинантного β 2М человека без первых шести аминокислот (β 2М Δ 6-1) и рЕТb2m2.1 для получения рекомбинантного β 2М человека без первых десяти аминокислот (β 2М Δ 10-2).

Перед нуклеотидной последовательностью, кодирующей β 2М Δ 6, в плазмиде рЕТb2m1.1 нами был вставлен не бактериальный PelB лидерный пептид, а старт-кодон ATG. В результате белок, синтезируемый полученной экспрессионной генетической конструкцией, имел дополнительный метионин на N-конце. В обоих случаях синтезируемый белок формировал тельца включения. В растворимой фракции β 2М не обнаруживался.

Очищенные белки в обоих случаях получали из телец включения, которые растворялись 8М мочевиной в присутствии β -меркаптоэтанола, и подвергались хроматографической очистке на металл-хелатном никелевом сорбенте. Выход белка составлял 30-40 мг из 1 л бактериальной культуры. По данным электрофореза образцы содержали мономеры (11 кДа), димеры (23 кДа) и тримеры (34 кДа) β 2М Δ 6. Кроме того, наблюдалась дополнительная зона, соответствующая молекулярной массе около 25 кДа. Димеры и тримеры образованы из мономеров за счет S-S связей. Комплекс, соответствующий дополнительной зоне, устойчив к восстановлению S-S связей при помощи β -меркаптоэтанола (рисунок 1В, 1Г). Это может свидетельствовать о наличии не дисульфидных ковалентных взаимодействий, участвующих в образовании данного комплекса.

Как и полноразмерные β 2М, полученные укороченные β 2М Δ 6-1 и β 2М Δ 10-2 в тех же условиях фибриллогенеза образуют амилоидные фибриллы. Наличие амилоидных фибрилл подтверждается и данными анализа флуоресценции ThT (рисунок 4). В образцах, содержащих амилоидные фибриллы, мы наблюдали возрастание флуоресценции по сравнению с контролем.

Оптические свойства исходных мономера β 2М и фибриллярных форм белка.

Спектры поглощения растворов природного и рекомбинантного β 2М, а также их фибрилл характеризуется максимумом при 278 нм и не различаются по форме.

Фибриллы, сформированные из полноразмерных β 2М, обладают наименьшей интенсивностью собственной триптофановой флуоресценции, фибриллы, сформированные из β 2М Δ 6-1, — наивысшей. Спектры флуоресценции фибрилл полноразмерных β 2М имеют максимумы при 337 нм (как и мономерный β 2М). Спектры флуоресценции фибрилл, сформированных из β 2М Δ 6-1 β 2М Δ 10-2, — при 342 и 348 нм соответственно. Эти отличия объясняются в первую очередь конформационными особенностями упаковки белка в фибриллах, а также аминокислотными отличиями. В любом случае можно говорить о некоторых отличиях вторичной структуры фибрилл, образующихся из рекомбинантных производных β 2М.

Эти предположения подтверждаются результатами анализа при помощи КД-спектроскопии в области поглощения пептидных связей. Как и следует из литературных данных, мономерный β 2М не содержит альфа-спиралей, бета-структурированные участки составляют 40%. В то же время в препаратах

фибрилл четко прослеживается изменение соотношения бета-структур и альфа-спиральности (рис. 2). В отличие от исходного белка фибриллы содержат от 12 до 35% альфа-спиральных участков. Фибриллы, сформированные из $\beta 2M\Delta 6-1$ и $\beta 2M\Delta 10-2$, а также фибриллы, сформированные из $\beta 2M$, выделенного из плазмы крови больных, содержат ~20% β -структуры. Фибриллы, сформированные из рекомбинантного полноразмерного $\beta 2M$, содержат ~13% β -структуры. Эти результаты, прежде всего, указывают на частичное преобразование бета-структур в альфа-спирали. Мы, к сожалению, не можем утверждать, что все молекулы $\beta 2M$ и его производных участвуют в образовании фибрилл. Однако изменение вторичной структуры в препаратах указывает на то, что, по крайней мере, олигомерные формы в условиях фибриллогенеза содержат ощутимые количества альфа-спиралей.

Связывание ThT с фибриллами, сформированными разными белками, сопровождается резким возрастанием квантового выхода флуоресценции (Levine 1993). При связывании ThT с фибриллами регистрировался сдвиг максимума с 412 нм (свободный ThT) до 430 нм (связавшийся краситель) и возрастал коэффициент молярной экстинкции. Полученные результаты указывают на существенные изменения конформации красителя при его включении с структуру фибрилл. В то же время по уровню возрастания флуоресценции ThT фибриллы $\beta 2M$ сходны с таковыми транстирета. В обоих случаях возрастание флуоресценции при связывании красителя не превышает 13 - 30 раз по сравнению с мономерными формами белков (для фибрилл инсулина эта величина составляет 670 раз). Для исследования причин относительно слабого эффекта возрастания флуоресценции красителя при связывании с фибриллами этих белков были получены спектры возбуждения и спектры эмиссии для разных препаратов $\beta 2M$ и их фибриллярных форм.

Встраивание ThT в фибриллы сопровождается небольшим сдвигом спектра флуоресценции в длинноволновую область. Наиболее длинноволновым является спектр раствора ThT + фибриллы, сформированные из рекомбинантного полноразмерного $\beta 2M$ ($\lambda_{max}=485$ нм). Полученные спектры флуоресценции существенно различаются по интенсивности. Оказалось, что интенсивность флуоресценции раствора ThT + $\beta 2M$ ~ в 20 раз превышает интенсивность флуоресценции свободного красителя в буферном растворе. Можно предположить, что это связывание происходит благодаря высокому содержанию в молекуле $\beta 2M$ β -структур (~40%). Интенсивность флуоресценции ThT + фибриллы, сформированные из $\beta 2M \Delta 6-1$ (наиболее интенсивно флуоресцирующего раствора) ~ в 150 раз превышает интенсивность флуоресценции свободного красителя в буферном растворе.

Таким образом, наши исследования подтверждают относительно слабое возрастание флуоресценции при связывании красителя с фибриллами. При этом видно, что укороченные формы различаются по способности фиксировать ThT в структуре фибрилл с усилением его флуоресцентных свойств. Не исключено, что это каким-то образом связано с равновесием между фибриллами и низкомолекулярными формами производных $\beta 2M$.

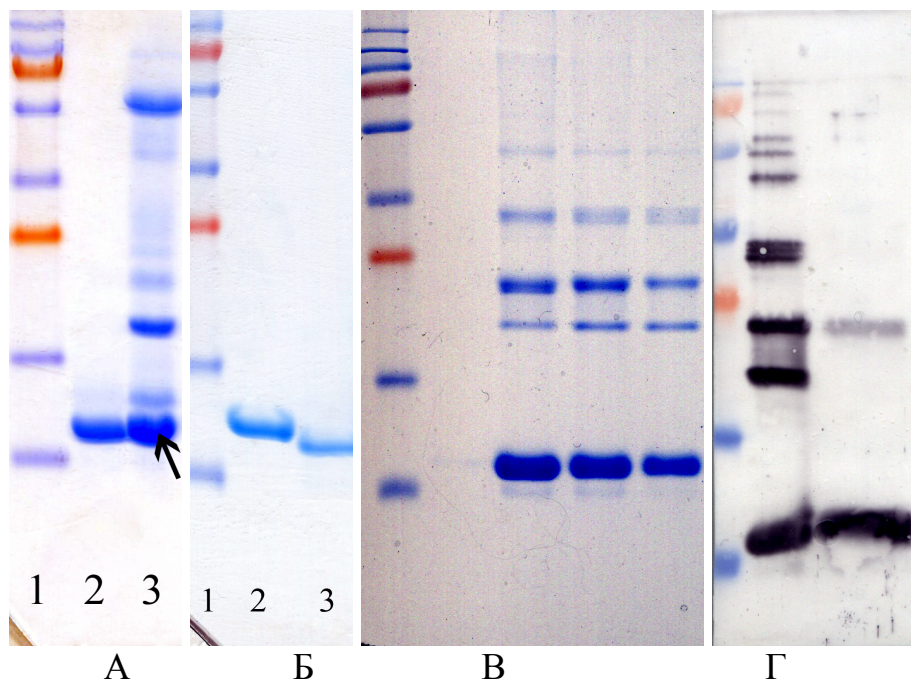


Рисунок 1. Электрофоретическое разделение белков в 12% ПААГ. А, Б, В - окраска Кумасси R-250. 1 – маркер молекулярного веса (Fermentas). Снизу вверх: 11 кДа, 17 кДа, 28 кДа, 36 кДа, 55 кДа, 72 кДа, 95 кДа, 130 кДа. А: 2 – β 2М, выделенный из диализата больных на гемодиализе. 3-концентрат диализата больного, длительное время находящегося на гемодиализе. Б: 2 – рекомбинантный β 2М. 3 – β 2М выделенный из ультра-фильтрата плазмы больных на гемодиализе. В: β 2М Δ 6-1 после очистки на никель-агарозной колонке. Г: «перенос» на НЦФ методом Western-BLOT. Дорожка 3: β 2М Δ 6-1 после прогревания в додецилсульфате, не содержащем β -меркаптоэтанола. Дорожка 3: β 2М Δ 6-1 после прогревания в SDS, содержащем 2% β -меркаптоэтанола.

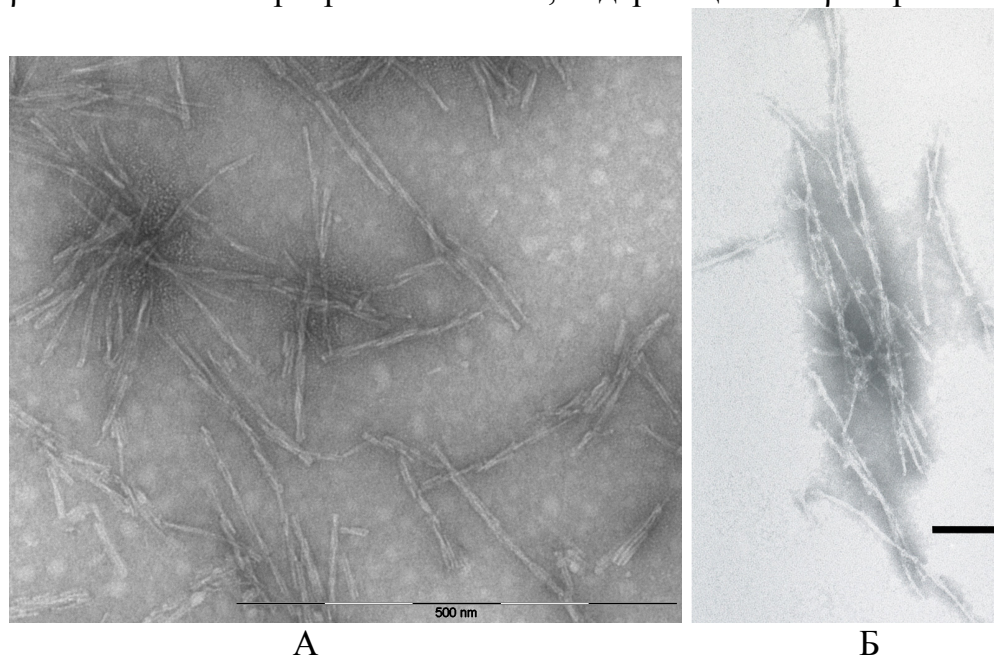


Рисунок 2. А: электронная микроскопия фибрилл β 2М. Б: электронная микроскопия фибрилл β 2MSF. Шкала в правом нижнем углу = 100 нм.

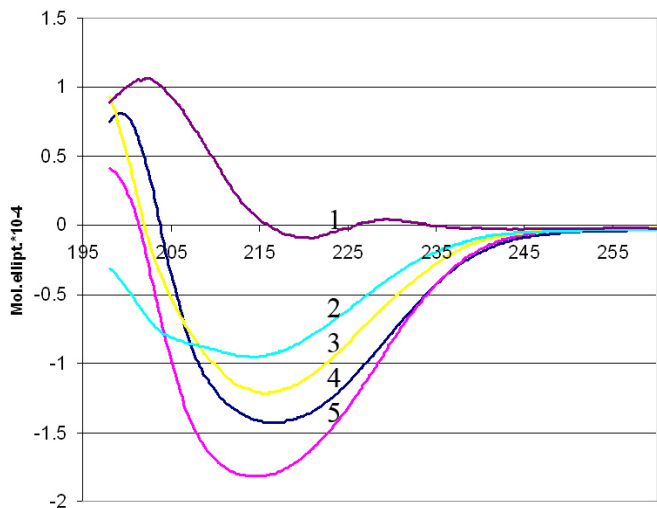


Рисунок 3. Спектры кругового дихроизма в дальнем УФ (на 1 а.к. остаток). На оси абсцисс длина волны в нм.

1 – мономер $\beta 2M$;
 2 – фибриллы из $\beta 2M \Delta 10-2$;
 3 – фибриллы из $\beta 2M \Delta 6-1$;
 4 – фибриллы из $\beta 2M$, выделенного из плазмы крови больных на хроническом гемодиализе;
 5 – фибриллы рекомбинантного полноразмерного $\beta 2M$.

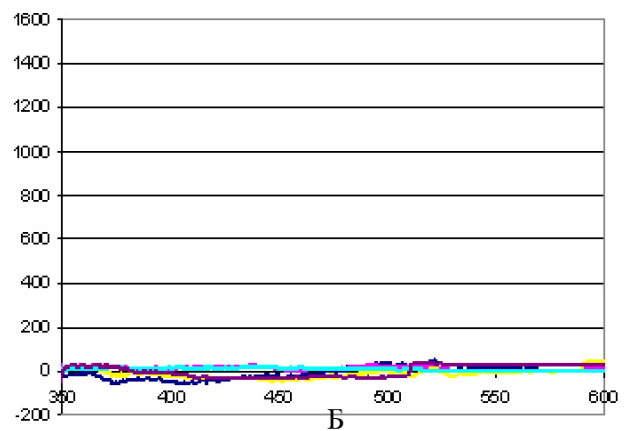
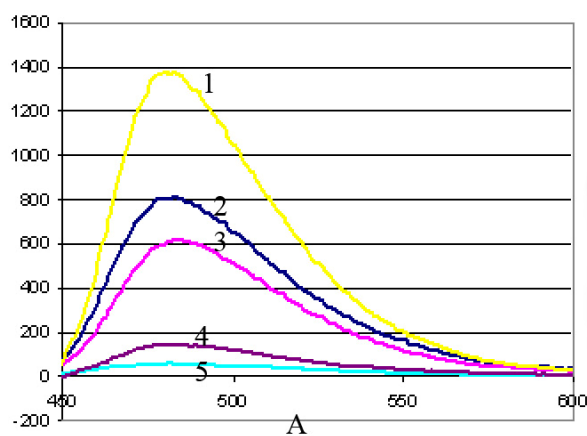


Рисунок 4. Спектры эмиссии комплексов тиофлавина Т с препаратами $\beta 2M$.

Возбуждение при двух длинах волн: А – 435 нм, Б – 340 нм. На оси абсцисс длина волны в нм, на оси ординат относительная флуоресценция. 1 – фибриллы из $\beta 2M \Delta 6-1$; 2 – фибриллы из $\beta 2M$, выделенного из плазмы крови больных на хроническом гемодиализе; 3 – фибриллы из рекомбинантного полноразмерного $\beta 2M$; 4 – фибриллы $\beta 2M \Delta 10-2$; 5 – мономер $\beta 2M$.

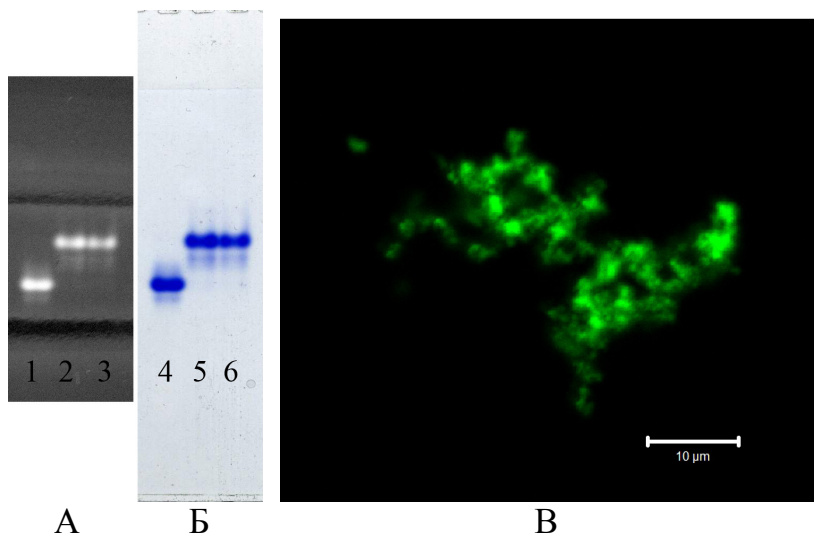


Рисунок 5. А, Б: электрофорез в неденатурирующих условиях. А: ПААГ без

окраски. Б: Окраска Кумасси R-250. 2, 3, 5, 6 – белок слияния β 2MSF. 1, 4 – контрольный белок sfGFP. В: конфокальная лазерная сканирующая микроскопия препарата β 2MSF, содержащего фибриллярные структуры.

Цитокины	Содержание цитокинов в плазме крови: медиана (первый квартиль – третий квартиль)		Достоверность различий больных и контрольной группы (p)
	Больные на хроническом гемодиализе, n=86	Контрольная группа (практически здоровые), n=13	
IL-2, pg/mL	3,075 (2,4-3,6)	0 (0-0)	0,000 *
IL-4, pg/mL	0,46 (0,4-0,48)	0,04 (0-0,28)	0,001 *
IL-6, pg/mL	0,26 (1-1,9)	0 (0-0)	0,002 *
IL-8, pg/mL	1,98 (1,11-3,82)	1,003 (0,146-1,35)	0,001 *
IL-10, pg/mL	0,19 (0,06-0,39)	0,013 (0-0,207)	0,034 *
GM-CSF, pg/mL	9,39 (8,04-10,385)	0 (0-0)	0,000 *
IFN- γ pg/mL	20,52 (18,24-23,94)	0 (0-0)	0,000 *
TNF- α pg/mL	9,9 (8,8-11,55)	0,09 (0-0,3)	0,000 *

* достоверность различий между сравниваемыми группами $p < 0,05$

Таблица 1. Сравнение содержания цитокинов в плазме крови больных, получавших процедуру хронического гемодиализа, и практически здоровых.

Цитокины	Содержание цитокинов в плазме крови: медиана (первый квартиль – третий квартиль)		Достоверность различий больных и контрольной группы (p)
	Больные на стандартном гемодиализе (n=31)	Больные на гемодиализации (n=49)	
IL-2, pg/mL	2,775 (2,175-3,3)	3,075 (2,475-3,6)	0,153
IL-4, pg/mL	0,44 (0,4-0,48)	0,46 (0,44-0,48)	0,159
IL-6, pg/mL	0,34 (0-1,905)	0,11 (0-1,15)	0,335
IL-8, pg/mL	1,98 (1,16-3,715)	1,88 (0,84-3,82)	0,659
IL-10, pg/mL	0,21 (0,05-0,375)	0,17 (0,08-0,39)	0,953
GM-CSF, pg/mL	9,045 (7,37-9,548)	10,05 (8,04-11,39)	0,039 *
IFN- γ pg/mL	20,52 (18,24-22,8)	20,52 (18,24-23,94)	0,420
TNF- α pg/mL	9,9 (8,8-11,275)	9,9 (8,8-11,55)	0,977

* достоверность различий между сравниваемыми группами $p < 0,05$

Таблица 2. Сравнение содержания цитокинов в плазме крови больных, получавших процедуру стандартного гемодиализа и гемодиализации.

цитокины	Spearman R	t(N-2)	p
L-2	-0,011115	-0,09817	0,922050
IL-4	-0,068657	-0,60779	0,545089
IL-6	-0,176199	-1,58088	0,117951
IL-8	-0,112412	-0,99913	0,320823
IL-10	-0,263575	-2,41316	0,01816*
GM-CSF	-0,088059	-0,78075	0,437313
IFN- γ	-0,060920	-0,53903	0,591400
TNF- α	0,093940	0,83334	0,407196

* достоверность $p < 0,05$

Таблица 3. Корреляции между содержанием цитокинов в плазме крови и длительностью хронического гемодиализа.

цитокины	Spearman R	T (N-2)	p
IL-2	-0,070724	-0,48608	0,629169
IL-4	-0,207708	-1,45572	0,152117
IL-6	-0,350419	-2,56499	0,013571*
IL-8	-0,058819	-0,40394	0,688087
IL-10	-0,250010	-1,77020	0,083180
GM-CSF	-0,104820	-0,72259	0,473511
IFN- γ	-0,086459	-0,59496	0,554723
TNF- α	0,070909	0,48735	0,628274

* достоверность $p < 0,05$

Таблица 4. Корреляции между содержанием цитокинов в плазме крови и длительностью хронического диализа у больных, получающих процедуру гемодиализации.

Получение рекомбинантного белка слияния β 2MSF.

Для изучения фибриллогенеза в основном применяются такие биофизические методы как флуоресцентная спектроскопия (взаимодействие фибрилл с различными флуоресцентными красителями), динамическое светорассеяние, электронная и атомно-силовая микроскопия. Эти методы позволяют детально охарактеризовать строение фибрилл, сорбированных на «подложках», или детектировать наличие и определять размер фибрилл в растворе, однако они трудноприменимы для изучения кинетики реакции фибриллогенеза (образование промежуточных префибриллярных форм) и процесса формирования фибрилл *in vivo*. Поэтому в дополнение к вышеперечисленным методам представляется актуальным использовать конфокальную микроскопию для визуализации промежуточных стадий фибриллогенеза, а также для исследования внутриклеточной локализации как зрелых фибрилл, так и префибриллярных структур. Для этих целей могут быть использованы белки слияния исследуемого белка с superfolder GFP. В частности, нам представляется, что созданный нами модельный белок слияния β 2MSF

позволит в перспективе более детально изучить процесс фибриллогенеза.

Мы использовали плазмиду pTRC-99a, содержащую ген sfGFP, в качестве исходной, и осуществили вставку гена β 2M между промотором и нуклеотидной последовательностью гена superfolder GFP. В результате нами была получена генетическая конструкция на основе плазмиды pTRC99a_P7, содержащая кДНК белка слияния β 2MSF с гистидиновым «хвостом» (6-His-tag) из шести гистидинов.

Для этого нами были подобраны праймеры: прямой 5' - **cagggtaccatccagcgtactccaa** - 3' включающий «кламп» - несколько нуклеотидов для препятствования образованию праймерами димеров и лучшего «залипания» (cag), и начало последовательности β 2M, содержащая сайт рестрикции KpnI (подчеркнут). Обратный праймер 5'- **cagggatccc**atgtctcgatccac - 3' включающий «кламп» (cag), сайт для эндонуклеазы рестрикции BamHI **ggatcc** (подчеркнут) и конец последовательности β 2M. Сайты выбирались с учетом рамки считывания плазмиды.

Продукт ПЦР был вставлен в плазмиду pTRC99a-P7 содержащую кДНК sfGFP. Компетентные клетки *E.coli* BL21(DE3) были трансформированы целевой плазмидой и нанесены на агарозную среду, содержащую ампициллин и IPTG. Таким образом после культивирования мы добились индукции синтеза белка слияния прямо на чашках Петри. Для определения колоний (т.е. клонов), синтезирующих белок слияния β 2MSF, мы наносили выращенные этим способом клетки на предметное стекло и с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии определяли в них флуоресценцию, свойственную GFP.

На рисунке 5А представлены результаты нативного электрофореза в β 2MSF. Также как и контрольный белок sfGFP, и флуоресцирующий в проходящем УФ свете, белок β 2MSF обладает флуоресцентными свойствами. По данным SDS-электрофореза, полученный белок слияния β 2MSF (после восстановления меркаптоэтанолом и прогрева на кипящей водяной бане) имеет молекулярную массу около 40 кДа. При помощи Western-BLOT иммунологически показано наличие как β 2M так и sfGFP в составе белка слияния β 2MSF, и тем самым доказана правильность экспрессии гена и синтеза белка слияния в бактериальной системе.

Для получения фибриллярных структур белка слияния β 2MSF был использован метод, описанный в работе (Kihara et al., 2005), с некоторыми модификациями. К раствору белка слияния β 2MSF в исходной концентрации 2 мг/мл (рН 7.0, 150мМ Na-фосфатный буферный раствор), в качестве «затравки» реакции фибриллогенеза, была добавлена 1/100 часть объема заранее приготовленных зрелых фибрилл рекомбинантного β 2M. В результате этого эксперимента в растворе методом атомно-силовой и электронной микроскопии были зарегистрированы фибриллярные структуры (Рис. 2Б).

Для экспериментов с применением конфокальной микроскопии использовали те же препараты фибрилл β 2MSF, что и для экспериментов по атомно-силовой микроскопии. Нами было замечено, что в растворах с значением рН меньше 5.0 sfGFP и белки слияния созданные на его основе теряют способность флуоресцировать. Поэтому фибриллярные структуры β 2MSF мы

получали при pH 7.0, с использованием «затравки» (необходимое условие фибрилlogenеза $\beta 2M$ в таких условиях). При помощи лазерной сканирующей микроскопии нами были зарегистрированы флуоресцирующие структуры, представленные на рисунке 5Б. Разрешающей способности лазерной сканирующей микроскопии, по-видимому, не достаточно для регистрации отдельных фибрилл, поэтому, на наш взгляд, приведённые на микрофотографиях сетевидные флуоресцирующие структуры, это скопления фибрилл (и, возможно, агрегатов), так называемые «надфибриллярные» структуры.

Введение в белок слияния superfolder GFP позволяет, как указано в других исследованиях, исключить формирование телец включения и получать целевые белки в нативной конформации. В отделе молекулярной генетики НИИЭМ СЗО РАМН ранее проводились эксперименты по получению рекомбинантного белка слияния транстиретина и EGFP. Такая экспрессионная генетическая конструкция позволяла получить белок слияния транстиретина и EGFP, который полностью локализовался в тельцах включения и не обладал флуоресцентными свойствами, по-видимому, из-за нарушений фолдинга. В литературе (Pedelacq et al., 2006) описано получение белков слияния с superfolder GFP, причем отмечается, что, из-за повышенной скорости сворачивания и улучшенных характеристик фолдинга superfolder GFP белки слияния, полученные на его основе, как правило, при синтезе в бактериальной системе не образуют телец включения. При этом аналогичные белки слияния с EGFP образуют нерастворимые тельца включения. Мы предполагали, что superfolder GFP будет препятствовать формированию телец включения белка слияния.

Таким образом, продемонстрирована возможность получения фибрилlogenного белка слияния $\beta 2MSF$. Белок синтезируется внутриклеточно в бактериальной системе, выделяется в растворимом виде и не образует телец включения. $\beta 2MSF$, с одной стороны, обладает флуоресцентными свойствами, как и нативный superfolder GFP. С другой стороны, $\beta 2MSF$ способен образовывать фибриллы (по крайней мере, в описанных для $\beta 2M$ условиях фибрилlogenеза при нейтральном pH), не теряя при этом своих флуоресцентных свойств.

Гуморальный иммунный ответ на фибриллы $\beta 2M$.

Мы иммунизировали кроликов фибриллами, полученными из рекомбинантного $\beta 2M$ человека. Нас интересовал вопрос, содержат ли фибриллы $\beta 2M$ антигенные детерминанты, не свойственные мономерному $\beta 2M$. Способ малоинвазивной лабораторной диагностики $A\beta 2M$, основанный на детекции таких антител, быть востребован. Кроме того, с фундаментальной точки зрения, не до конца ясна роль иммунных реакций в патогенезе как $A\beta 2M$, так и других амилоидозов.

Из сыворотки крови иммунизированных кроликов были выделены иммуноглобулины G. Фракция иммуноглобулинов была аффинно очищена от антител к мономерному $\beta 2M$. Оставшиеся антитела использовались в дальнейших экспериментах, в частности, была проверена их аффинность к фибриллам $\beta 2M$. Как и ожидалось, полученные иммуноглобулины специфически реагировали с фибриллами $\beta 2M$, но не реагировали с мономерным $\beta 2M$. Для решения вопроса об аффинности полученных нами анти- $\beta 2M$ антител к фибриллам,

сформированными из других белков или пептидов, мы провели следующий эксперимент. На один НЦФ наносили одинаковое количество (по массе) фибрилл, сформированных из $\beta 2M$ при кислом и физиологическом pH, фибрилл другого происхождения, мономера $\beta 2M$, мономера лизоцима, а также пятикратный избыток мономера $\beta 2M$. Затем осуществляли стандартную процедуру Dot-BLOT с использованием очищенных анти- $\beta 2M$ антител. В результате окрасились только те зоны НЦФ, на которые были нанесены фибриллы, сформированные из $\beta 2M$ при кислом и физиологическом pH. Это свидетельствует об отсутствии специфического реагирования с фибриллами другого происхождения. А тот факт, что места нанесения мономера $\beta 2M$ и его пятикратного избытка не окрасились, свидетельствует о достаточно полной «очистке» исходной кроличьей сыворотки от антител к нативному $\beta 2M$.

Аналогично подготовленный НЦФ обрабатывали антителами к мономеру $\beta 2M$. В результате окрасились те зоны НЦФ, на которые были нанесены фибриллы, сформированные из $\beta 2M$ при кислом и физиологическом pH, а также сам мономер $\beta 2M$. К нашему удивлению, фибриллы $\beta 2M$ окрашивались заметно интенсивнее мономера той же концентрации и примерно с одинаковой интенсивностью с пятикратным избытком мономера. Такой результат повторялся и при кратных разведениях обоих антигенов.

Мы сочли нужным провести контрольный эксперимент для оценки возможности неспецифического взаимодействия фибрилл $\beta 2M$ с иммуноглобулинами класса G. На НЦФ нанесли различные разведения фибрилл рекомбинантного $\beta 2M$ и мономеров $\beta 2M$, лизоцима, альбумина. Провели Dot-BLOT. В качестве первых антител использовались разведения сывороток кроликов, не иммунизированных $\beta 2M$ или фибриллами. В результате окрасились области НЦФ, на которые были нанесены фибриллы $\beta 2M$. Эти результаты воспроизводились в нашей лаборатории неоднократно. Скорее всего, их можно объяснить неспецифическим связыванием кроличьих IgG с амилоидными фибриллами $\beta 2M$. То же явление наблюдалось, если использовались в качестве первых антител IgG неиммунизированных кроликов или очищенные IgG против лактоферрина человека.

Таким образом мы обнаружили и, как нам кажется, доказали факт неспецифического связывания фибрилл $\beta 2M$ человека с IgG кролика. Это следует учитывать при дальнейшем изучении гуморального иммунного ответа на фибриллы $\beta 2M$. К сожалению, нами к настоящему времени не исследован вопрос, есть ли аналогичный эффект с IgG человека. Если существует такое же связывание IgG человека с амилоидными фибриллами $\beta 2M$, то это может иметь важное значение в понимании патогенеза $A\beta 2M$, а также в подходах к малоинвазивной диагностике данного заболевания. Кроме того, данный факт следует иметь в виду и при разработке таких иммунологических методов диагностики $A\beta 2M$, в которых фибриллы $\beta 2M$ будут использоваться в качестве антигена.

Содержание цитокинов в плазме крови больных, находящихся на хроническом гемодиализе.

Так как диагностировать $A\beta 2M$ достаточно сложно, способ малоинвазивной

лабораторной диагностики этого заболевания может быть весьма востребован. Одним из направлений нашей работы по поиску такого способа является попытка обнаружить цитокиновые маркеры Аβ2М. Кроме того, теоретически не до конца ясна роль иммунных реакций в патогенезе как Аβ2М, так и других амилоидозов. Поэтому было решено определить содержания цитокинов в плазме крови пациентов на различных сроках хронического гемодиализа.

Содержание всех исследованных цитокинов в плазме крови больных находившихся на хроническом гемодиализе было достоверно повышено по сравнению с контрольной группой ($p < 0,03$ для IL-10 и $p < 0,01$ для IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α) (Таблица 1).

Первоначально мы оценили корреляции между уровнем IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α и длительностью хронического гемодиализа. В результате была обнаружена статистически значимая ($p < 0,03$) обратная корреляция между уровнем IL-10 и продолжительностью диализа. При этом для остальных цитокинов подобной зависимости выявлено не было.

На следующем этапе мы разделили больных на группы в зависимости от длительности диализа. При разделении больных на группы «до 3 лет диализа» и «более 3 лет диализа», было обнаружено статистически значимое различие этих групп по уровню IL-10 в крови ($p = 0,04$). По содержанию всех исследованных цитокинов группа «до 3 лет диализа» статистически значимо отличалась от контрольной группы ($p < 0,03$ для IL-10 и $p < 0,01$ для IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α). Аналогичная ситуация наблюдалась при сравнении группы «более 3 лет диализа» и группы здоровых доноров для всех исследованных цитокинов, кроме IL-10. Достоверных различий по IL-10 в последних двух группах не обнаружено: $p > 0,14$.

Таким образом, у обследованных больных на гемодиализе уровень цитокинов существенно превышал норму. При этом с увеличением срока, в течение которого больные подвергались процедуре хронического диализа, уровень IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α увеличивался. Содержание же IL-10 снижалось после трех лет диализа до уровня, статистически не различающегося с нормой

Среди обследованных пациентов около половины получает гемодиализ, а остальные – процедуру гемодиафильтрации. Мы решили выяснить, существуют ли различия между этими группами по уровню исследованных цитокинов. Группа больных на гемодиализе отличалась от группы на гемодиафильтрации только по уровню GM-CSF ($p < 0,04$) (таблица 2). По всем остальным цитокинам статистически значимых различий между группами не было выявлено. Кроме того, не выявлено различий и по такому параметру, как длительность диализа. Эти результаты сами по себе интересны, так как исследования по сравнению цитокинового статуса у больных на гемодиализе и гемодиафильтрации малочисленны.

При дальнейшем разделении больных, получающих процедуру гемодиафильтрации, на группы «до 3 лет диализа» ($n = 23$) и «более 3 лет диализа» ($n = 25$), было обнаружено различие между этими группами по уровню IL-6 в плазме крови ($p = 0,02$). По содержанию всех исследованных цитокинов группа «до

3 лет гемодиализации» статистически значимо отличалось от контрольной группы ($p=0,05$ для IL-10 и $p<0,005$ для IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α). Группа «после 3 лет гемодиализации» значимо отличалась от группы практически здоровых по содержанию в плазме крови IL-2, IL-4, IL-8, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α ($p<0,005$). При этом статистически достоверно эти две группы не различались по IL-6 ($p=0,3$) и IL-10 ($p=0,16$).

Заболеваемость А β 2М коррелирует с длительностью хронического диализа (от единичных случаев на первом году гемодиализа до 90-100% через 5-13 лет хронического диализа). Нами обнаружены корреляции между содержанием IL-10 в плазме крови и длительностью диализа у больных, как на гемодиализе, так и на гемодиализации. Обнаружена корреляция между содержанием IL-6 в плазме крови и длительностью диализа у больных на гемодиализации. Показано, что при разделении пациентов на группы «до 3 лет диализа» и «более 3 лет диализа», такие группы будут различаться по содержанию IL-10 и IL-6 в плазме крови. Эти результаты, на наш взгляд, позволяют предложить IL-10 и IL-6 (но IL-6 только у больных на гемодиализации) для дальнейших исследований в качестве потенциальных маркеров-кандидатов А β 2М.

ВЫВОДЫ

1. Разработан эффективный способ получения очищенного β 2М человека.
2. Создана генетическая конструкция для синтеза полноразмерного β 2М человека с полигистидиновым фрагментом и пептидом, направляющим белок в периплазматическое пространство бактерий, что исключает формирование телец включения. Получен рекомбинантный нативный β 2М с исключением стадий денатурации и ренатурации.
3. Созданы экспрессионные генетические конструкции, позволяющие получать в очищенном состоянии укороченные варианты β 2М человека.
4. Показано, что исходный природный β 2М, рекомбинантный β 2М и укороченные производные обладают фибриллогенной активностью.
5. По спектральным характеристикам фибриллы разных вариантов β 2М имеют некоторые различия, указывающие на их различную способность связывать тиофлавин Т. Выявлено, что фибриллогенез β 2М и его производных происходит с возрастанием количества альфа-спиральных структур.
6. С целью визуализации стадий фибриллогенеза на клеточных культурах получена генетическая конструкция и рекомбинантный белок слияния β 2М – зеленый флуоресцентный белок. Показано, что очищенный рекомбинантный белок слияния формирует видимые в микроскоп фибриллярные структуры.
7. Обнаружено, что фибриллы β 2М обладают способностью неспецифически сорбировать иммуноглобулины G кролика.
8. Показано, что в плазме крови больных, получающих процедуру хронического гемодиализа, повышена концентрация IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α .
9. Установлено, что содержание IL-10 в плазме крови больных на хроническом гемодиализе возрастает в первые 3 года терапии и далее снижается до нормальных значений.

ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Поляков Д.С., Грудина Н.А., Соловьёв К.В., Егоров В.В., Сироткин А.К., Алейникова Т.Д., Тотолян Арег А., Шавловский М.М. Бета-2-микροглобулиновый амилоидоз: фибриллогенез природного и рекомбинантных бета-2-микροглобулинов человека // Медицинский академический журнал. – 2010. – Том 10. – № 2. – С. 40-49.
2. Поляков Д.С., Тотолян Арег А., Шавловский М.М. Получение природного бета2-микροглобулина человека // Молекулярная медицина. – 2010. – № 6. – С. 39-43.
3. Поляков Д.С., Грудина Н.А., Соловьёв К.В., Егоров В.В., Сироткин А.К., Алейникова Т.Д., Тотолян Арег А., Шавловский М.М. Получение рекомбинантного β 2-микροглобулина человека и его фибриллогенез при низких и нейтральных значениях рН // Молекулярная медицина. – 2011. - №2. – С. 36-39.
4. Поляков Д.С., Домашенко О.М., Белобородов П.В., Сысоев К.А., Шавловский М.М., Тотолян Арег А. Содержание цитокинов в плазме крови больных, находящихся на хроническом гемодиализе // медицинская иммунология. – 2011, - №2-3, С.211-218.

Тезисы докладов:

1. Поляков Д.С., Алейникова Т.Д., Шавловский М.М. Гуморальный ответ на фибриллы бета2-микροглобулина человека. Биология — наука XXI века: 14-я Пущинская международная школа-конференция молодых ученых (Пущино, 19 - 23 апреля 2010 года). Сборник тезисов // 2010, Том 2, 166-167.
2. Поляков Д.С., Алейникова Т.Д., Шавловский М.М. Получение и свойства кроличьих антител к фибриллам бета2-микροглобулина человека. Биология — наука XXI века: 14-я Пущинская международная школа-конференция молодых ученых (Пущино, 19 - 23 апреля 2010 года). Сборник тезисов //2010, Том 2, 172-173.
3. Поляков Д.С., Соловьёв К.В., Грудина Н.А. «Получение белка слияния бета-2-микροглобулина с зеленым флуоресцентным белком», тезисы 3 международного молодежного медицинского конгресса “Санкт-петербургские научные чтения-2009”, Санкт-Петербург, 2009, стр 116.
4. Поляков Д.С., Грудина Н.А., Соловьёв К.В., Шавловский М.М. «Создание экспрессионной генетической конструкции для получения бета-2-микροглобулина человека в бактериальной системе», тезисы 13 международной Пущинской школы-конференции «Биология – наука 21 века» 28 сентября - 2 октября, 2009, Пущино, стр. 37.
5. Поляков Д.С., Шавловский М.М. Взаимодействие амилоидных фибрилл бета2-микροглобулина с иммуноглобулинами в условиях иммугоблоттинга. 7 Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика — 2010». Сборник трудов // 2010, Том 4, 341- 344.