

**БЕТА2-МИКРОГЛОБУЛИНОВЫЙ АМИЛОИДОЗ:  
ФИБРИЛЛОГЕНЕЗ ПРИРОДНОГО И РЕКОМБИНАНТНЫХ  
БЕТА2-МИКРОГЛОБУЛИНОВ ЧЕЛОВЕКА**

ПОЛЯКОВ Д. С.<sup>1,2</sup>, ГРУДИНИНА Н. А.<sup>1</sup>, СОЛОВЬЁВ К. В.<sup>1</sup>, ЕГОРОВ В. В.<sup>3,4</sup>,  
СИРОТКИН А. К.<sup>3</sup>, АЛЕЙНИКОВА Т. Д.<sup>1</sup>, академик РАМН ТОТОЛЯН А. А.<sup>5</sup>,  
ШАВЛОВСКИЙ М. М.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ГУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН»,  
Санкт-Петербург,

<sup>2</sup>ГОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет  
им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург,

<sup>3</sup>ГУ «Научно-исследовательский институт гриппа СЗО РАМН», Санкт-Петербург,

<sup>4</sup>Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова РАН,  
отделение молекулярной и радиационной биофизики, Гатчина,

<sup>5</sup>ФГУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии  
и микробиологии им. Пастера Роспотребнадзора»,  
Санкт-Петербург

**Поляков Д. С., Грудинина Н. А., Соловьёв К. В., Егоров В. В., Сироткин А. К., Алейникова Т. Д., Тотолян А. А., Шавловский М. М.** Бета2-микροглобулиновый амилоидоз: фибриллогенез природного и рекомбинантных бета2-микροглобулинов человека // Мед. акад. журн. 2010. Т. 10. № 2. С. 40–49. ГУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН», Санкт-Петербург, 197376, ул. Академика Павлова, 12; ГОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, 197122, ул. Л. Толстого, 6/8; ГУ «Научно-исследовательский институт гриппа СЗО РАМН», Санкт-Петербург, 197376, ул. Проф. Попова, 15/17; Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова РАН, отделение молекулярной и радиационной биофизики, Гатчина, 188300; ФГУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера Роспотребнадзора», Санкт-Петербург, 197101, ул. Мира, 14.

Бета2-микροглобулин (β2M) нековалентно связан с тяжелой цепью молекулы I класса главного комплекса гистосовместимости. Поступающий в плазму крови белок деградирует в клетках проксимальных почечных канальцев. У больных на длительном гемодиализе выведение β2M практически не происходит, и его концентрация в крови возрастает в десятки раз, что приводит к увеличению вероятности появления аномальных конформаций белка и образования амилоидных фибрилл. Бета-2-микροглобулиновый амилоидоз является серьезным осложнением гемодиализа. Механизм фибриллогенеза в физиологических условиях полностью не выяснен. Моделирование данного процесса *in vitro* необходимо для его детального изучения, а также для выяснения факторов, способствующих и препятствующих фибриллогенезу. С этой целью мы разработали способ препаративного выделения β2M из диализата больных на хроническом гемодиализе, создали генетическую конструкцию, позволяющую получить рекомбинантный β2M человека в культуре клеток *E.coli*, а затем довольно быстро и эффективно его очистить. Также был получен рекомбинантный белок слияния β2M с зеленым флуоресцентным белком. Полученные нами рекомбинантные белки не формируют телец включения и могут быть непосредственно экстрагированы из бактерий. При помощи электронной и атомно-силовой микроскопии показано, что полученные варианты β2M формируют фибриллы *in vitro*. Наличие амилоидных фибрилл подтверждено и данными анализа флуоресценции комплексов фибрилл с тιοфлавином T.

**Ключевые слова:** бета-2-микροглобулин, фибриллы, амилоидоз, гемодиализ, зеленый флуоресцентный белок, электронная микроскопия, атомно-силовая микроскопия.

**Polyakov D. S., Grudinina N. A., Solovyov K. V., Egorov V. V., Sirotkin A. K., Aleinikova T. D., Totolian Areg A., Shavlovskiy M. M.** Beta2-microglobuline amyloidosis: Fibrillogenesis of natural and recombinant human beta2-microglobulines // Med. Acad. Journ. 2010. Vol. 10. № 2. P. 40–49. Institute for Experimental Medicine Russian Academy of Medical Sciences, St. Petersburg, 197376; I. P. Pavlov State Medical University, 197022, St. Petersburg.; Influenza Institute NWB RAMS, St. Petersburg, 197376; B. P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute of the Russian Academy of Sciences, 188300; St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, 197101.

β2-Microglobulin (β2M) is noncovalently associated with alpha chain of the class I major histocompatibility complex. The protein is removed from blood by degradation in the proximal tubule of the kidney. β2M cannot be removed from the blood by the kidney or the dialysis membrane in patients undergoing haemodialysis. As a consequence of increased β2M concentrations, partial unfolding of β2M is believed to be prerequisite to its assembly into β2M amyloid fibrils. β2M amyloidosis is a common complication associated with long-term hemodialysis. Mechanism of fibril formation in physiological conditions is poorly

understood. Simulation in vitro is required for elucidation of its mechanism and for searching after factors that can induce or inhibit fibrillogenesis. For these purpose we have devised the method to obtain  $\beta$ 2M from dialysate of patients undergoing long-term hemodialysis. We have constructed expression plasmid for production of recombinant human  $\beta$ 2M in *E.coli* with subsequent fast and easy purification. Recombinant fusion protein of  $\beta$ 2M with green fluorescent protein was also produced. These recombinant proteins do not form inclusion bodies and can be extracted directly from the cell lysate. Electron microscopy and atomic force microscopy have shown presence of fibrils formed in vitro from the three  $\beta$ 2M variants. Using thioflavin-T binding we have determined that  $\beta$ 2M purified from dialysate and recombinant  $\beta$ 2M can form amyloid fibrils.

**Keywords:** amyloidosis; recombinant beta-2-microglobulin, fibrils, amyloidosis, hemodialysis, green fluorescent protein, electron microscopy, atomic force microscopy.

Для корреспонденции: Поляков Дмитрий Степанович, тел. раб. 234-33-56; e-mail: dipol@mail.org

## ВВЕДЕНИЕ

Бета-2-микроглобулин ( $\beta$ 2M) (11800 Да) синтезируется практически во всех клетках организма. Этот белок нековалентно связан с тяжелой цепью молекул класса I главного комплекса гистосовместимости, располагающихся на поверхности мембран. Исключительная важность белка подтверждается отсутствием полиморфизма кодирующей части соответствующего гена. Нарушения структуры белка выявляются только при злокачественном перерождении клеток, что связано с участием нормального  $\beta$ 2M в антигенной презентации [14].

$\beta$ 2M синтезируется в количестве от 2 до 4 мг/кг в день, при этом период его полувыведения составляет 2,5 ч, а концентрация в плазме здоровых лиц – 1–3 мг/л. Так как элиминация  $\beta$ 2M на 95% обеспечивается путем клубочковой фильтрации (с последующей реабсорбцией и внутриклеточным протеолизом в проксимальных канальцах); его концентрация в плазме обратно пропорциональна скорости клубочковой фильтрации. Уровень  $\beta$ 2M у больных с хронической почечной недостаточностью многократно повышается, в зависимости от степени снижения функции почек, возрастая примерно в 60 раз вследствие значительного (в 10–15 раз) увеличения периода полувыведения данного белка [4]. Большие количества  $\beta$ 2M обнаруживаются в моче нефротических больных. Такая моча обычно служит источником получения природного белка человека [8].

Проблема бета-2-микроглобулинового амилоидоза ( $A\beta$ 2M) связана с введением гемодиализа в медицинскую практику. При длительной гемодиализной терапии концентрация  $\beta$ 2M в плазме крови больных постоянно существенно превышает норму. Длительная персистенция высоких концентраций  $\beta$ 2M считается основной причиной появления молекул белка в аномальной конформации и образования амилоидных фибрилл [20]. У некоторых из этих больных развивается осложнение гемодиализа, получившее название гемодиализного амилоидоза или  $A\beta$ 2M.

Клинически  $A\beta$ 2M проявляется главным образом симптомами поражения соединительнотканых образований, где по невыясненным до настоящего времени причинам происходит накопление амилоидных отложений. Наиболее часто отмечается синдром карпального канала, скапулофemorальный периартроз, деструктивная спондилоартропатия, протекающая в ряде случаев с миелокомпрессией, атлантаксиальная артропатия, бурситы, костные кисты, патологические переломы и др. [27, 29]. С развитием болезни системное отложение может встречаться также в стенке желудка и в сердце [9, 13].

В отличие от других амилоидозов,  $A\beta$ 2M редко сам по себе является причиной летального исхода. В то же время  $A\beta$ 2M служит основной причиной выраженного снижения качества жизни, что проявляется болями в суставах и сокращением объема движений у больных, находящихся на длительном диализе [5]. В большинстве публикаций сообщается о начале проявления  $A\beta$ 2M у больных спустя несколько лет после начала гемодиализа. В редких случаях данный амилоидоз наблюдается у больных после непродолжительной гемодиализной терапии или даже до ее начала [29, 7, 11, 22]. Клинические проявления  $A\beta$ 2M появляются постепенно через 2–10 лет после начала диализа у значительной части больных. В большом проспективном посмертном исследовании [15] выявлены значимые отличия клинических проявлений  $A\beta$ 2M, определяемых по частоте развития синдрома карпального канала (2% больных) от рентгенологических изменений в костях (4% больных) и от гистологического обнаружения амилоидных отложений в аутопсийном материале (в среднем у 48% пациентов). В этом исследовании частота выявления депозитов  $\beta$ 2M варьировала от 28% у больных в первые 2 года гемодиализа до 100% у пациентов, находящихся на хроническом диализе более 13 лет. В исследовании Ohashi и соавт. [23] 90% больных через 5 лет имели гистологически обнаруживаемые проявления  $A\beta$ 2M.

Однако у многих больных видимые клинические проявления часто отсутствуют. Кроме того, клини-

ческие симптомы обычно неспецифичны и легко принимаются за суставные нарушения другой этиологии. «Золотым стандартом» диагностики является биопсия с положительным окрашиванием тканей Конго красным и наличие  $\beta 2M$  при иммуногистохимическом исследовании [5].

Применение различных мембран при гемодиализе может оказывать влияние на развитие  $A\beta 2M$ . Использование полисульфона и других синтетических мембран обеспечивает более эффективное по сравнению с купрофаном удаление  $\beta 2M$  из организма, но не предотвращает развитие амилоидоза. Это же справедливо в отношении различной диализной техники: гемофильтрации, гемодиализации, постоянной артерио-венозной гемофильтрации [2]. До сих пор не выявлены ключевые факторы формирования амилоидных отложений *in vivo* и причины дегенеративных явлений в тканях. Для всех амилоидозов характерной особенностью является длительный латентный период. Для наследственных амилоидозов, которые относятся к заболеваниям с доминантным наследованием, свойственно сравнительно позднее клиническое проявление и низкая пенетрантность. Все это свидетельствует о наличии определенных факторов, способствующих началу фибриллогенеза и развитию амилоидоза. Поэтому изучение начальных условий фибриллогенеза и влияния различных соединений на этот процесс может пролить свет на закономерности молекулярных основ патогенеза данного вида заболеваний. Знание патогенеза, в свою очередь, является предпосылкой для эффективной терапии и предотвращения формирования аномальных фибрилл.

Особое значение имеет выяснение механизмов клеточной дегенерации в ходе формирования амилоидных отложений. Высказывается мнение, что не сами фибриллы, а префибрилярные формы, возникающие в начальной фазе изменения пространственной организации амилоидогенных белков, играют ключевую токсическую роль в отношении окружающих клеток [17]. Апоптоз этих клеток приводит к нарушению функции органов. В то же время объемный процесс, который сопровождает отложение амилоидных структур, также не может полностью игнорироваться.

Приступая к изучению механизмов развития гемодиализного амилоидоза и выяснению основных факторов, способствующих и препятствующих фибриллогенезу  $\beta 2M$ , в настоящем сообщении мы представляем разработанные нами способы получения очищенных препаратов природного и рекомбинантного  $\beta 2M$ , в том числе и рекомбинантного белка слияния  $\beta 2M$  с зеленым флуоресцентным белком ( $\beta 2MSF$ )

Очищенные белки необходимы для моделирования фибриллогенеза *in vitro* и для анализа факторов и условий, способствующих и препятствующих фибриллогенезу, а также для установления структурных особенностей  $\beta 2M$  плазмы крови больных на хроническом гемодиализе. Теоретический аспект исследования, частью которого является настоящая работа, включает также выяснение общих закономерностей фибриллогенеза белков и пептидов на примере модельного белка  $\beta 2M$  человека.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Получение поликлональных антител кролика к  $\beta 2M$  человека.** В качестве источника получения природного  $\beta 2M$  использовали диализат плазмы крови больных на хроническом гемодиализе. Первые десять литров диализата концентрировали с помощью ультрафильтрации на мембране с порами, проницаемыми для белков с молекулярной массой более 5 кДа. Далее концентрат подвергали ультрафильтрации на мембране, проницаемой для белков с молекулярной массой более 30 кДа.  $\beta 2M$ , содержащийся в ультрафильтрате, очищали методом гель-фильтрационной хроматографии.

**Электрофорез в ПААГ.** Электрофорез белка осуществляли в блоках 12% ПААГ (10×10 см) при градиенте напряжения 20 В/см в присутствии SDS.

**Идентификация  $\beta 2M$  методом MALDI-TOF.** Выделенный из диализата большого предполагаемый  $\beta 2M$  подвергали препаративному электрофорезу в ПААГ в денатурирующих условиях. Анализ электрофоретической зоны, соответствующей по мол. м.  $\beta 2M$ , был осуществлен в НИИ физико-химической медицины РАМН. Идентификацию белков по «пептидному фингерпринту» осуществляли с помощью программы Mascot ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)). Поиск проводился в базе данных NCBI среди белков всех организмов с учетом возможного окисления метионина кислородом воздуха и возможной модификации цистеинов акриламидом.

**Получение поликлональных антител кролика к  $\beta 2M$  человека.** Иммунизацию кроликов осуществляли фрагментом ПААГ, содержащим 100 мкг  $\beta 2M$ . Фрагмент гомогенизировали, смешивали с адьювантом Фрейнда (Sigma) и вводили кролику внутривенно по стандартной схеме [3]. Забор крови осуществляли на 10-й день после последней иммунизации. Фракцию IgG получали методом высаливания сульфатом аммония [1].

**Получение экспрессионной генетической конструкции pETb2m6.8.** Из лейкоцитов венозной крови здорового донора стандартным методом была выделена тотальная РНК и проведена обратная транскрипция, затем проведена полимеразная цепная реакция (ПЦР) с использованием специфичес-

ких праймеров. В состав праймеров для получения ПЦР-продукта кодирующей части  $\beta 2M$  человека во фланкирующие участки были внесены нуклеотидные последовательности, содержащие сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции и позволяющие провести вставку в последовательность плазмиды pET22b(+) (Novagen, Madison, WI, Cat. No. 69744-3). Таким образом был получен ПЦР-продукт, содержащий сайт рестрикции MscI на 5' конце, последовательность, кодирующую  $\beta 2M$  человека, полигистидиновую последовательность (5xHis), два стоп-кодона и сайт рестрикции HindIII на 3' конце. Полученный ПЦР-продукт был обработан рестриктазами MscI и HindIII (Fermentas) и вставлен в плазмиду pET22b(+), обработанную теми же рестриктазами, с помощью лигазы T4 DNA ligase (Fermentas). Компетентные клетки штамма *Escherichia coli* DH5(alpha) были трансформированы полученной лигазной смесью и нанесены на селективную агарозную среду. Плазмидная ДНК отобранных клонов была просеквенирована в АТГ сервис ген, Санкт-Петербург. Был обнаружен клон, несущий плазмиду, содержащую в рамке считывания RelB «лидерный пептид», полностью идентичную  $\beta 2M$  последовательность, а также внесенную полигистидиновую последовательность и два стоп-кодона.

**Получение экспрессионной генетической конструкции pTRCb2msf.** С помощью ПЦР был получен фрагмент ДНК, кодирующий  $\beta 2M$  без его сигнального пептида. В качестве матрицы при амплификации была использована полученная нами ранее плаزمида pETb2m6.8. Некомплементарная часть прямого праймера содержала сайт рестрикции для KpnI, некомплементарная часть обратного праймера содержала сайт рестрикции для BamHI. Продукт ПЦР после обработки соответствующими рестриктазами вставлен в плазмиду pTRC99a-P7 (Amersham Pharmacia), обработанную теми же эндонуклеазами рестрикции с помощью лигирования. Плазмиды pTRC99a-P7 создана для экспрессии белков в бактериальной системе *E. coli* и содержит ген superfolder GFP [24]. Указанные сайты рестрикции были подобраны таким образом, чтобы в полученном векторе pTRC99a-B2MSF после АТГ (старт-кодона) исходной плазмиды в той же рамке считывания находилась последовательность ДНК, кодирующая  $\beta 2M$ , затем последовательность superfolder GFP, затем His-tag из шести остатков гистидина, а затем стоп-кодон. Компетентные клетки штамма *Escherichia coli* DH5(alpha) были трансформированы полученной лигазной смесью и нанесены на селективную агарозную среду. Плазмидная ДНК выросших ампициллин-резистентных колоний была подвергнута ПЦР-анализу, по результатам которого были отобраны клоны, содержащие ген  $\beta 2M$ . Компетентные клетки *Escherichia coli* BL21(DE3) были

трансформированы плазмидами отобранных клонов и нанесены на агарозную среду, содержащую 100 мкг/мл ампициллина и 240 мкг/мл изопропил- $\beta$ -D-1-тиогаалактопиранозид (IPTG). После культивирования (16 ч при +37 °С) наличие экспрессии белка слияния  $\beta 2M$  с superfolder GFP ( $\beta 2MSF$ ) было показано с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии.

**Выделение и очистка рекомбинантного  $\beta 2M$ .** Рекомбинантный  $\beta 2M$  получали из клеток *Escherichia coli* BL21(DE3), трансформированных экспрессионной конструкцией pETb2m6.8. *Escherichia coli* выращивали в течение ночи в 10 мл среды Luria-Bertani (LB) с ампициллином (100 мкг/мл) при 37 °С. Ночная культура была инокулирована в 500 мл свежей среды и культивировалась в условиях аэрации при 37 °С до достижения оптической плотности  $A_{600} = 0,8-1$ . Синтез  $\beta 2M$  индуцировали добавлением IPTG до конечной концентрации 1 мМ, и культивирование продолжали в течение ночи при 26 °С в условиях аэрации. После отделения бактериальных клеток путем центрифугирования в течение 15 мин при 10 000 g, периплазматическую фракцию получали методом «осмотического шока» [6]. К периплазматической фракции добавляли ингибитор протеаз (PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride) до конечной концентрации 1 мМ и имидазол до конечной концентрации 10 мМ. Белок сорбировали на металл-хелатном сорбенте. Балластные белки последовательно отмывали 0,5 м раствором NaCl на 0,1 М К-фосфатном буфере, pH 8,0, содержащем 20–30–40 мМ имидазола. Далее белок элюировали 0,14 М NaCl, pH 8,0, содержащем 200 мМ имидазола.

**Выделение и очистка рекомбинантного белка слияния  $\beta 2MSF$ .**  $\beta 2MSF$  получали из клеток *E. coli* BL21(DE3), трансформированных экспрессионной конструкцией pTRCb2msf. Отдельную колонию клеток, выросшую на селективной агарозной среде засеивали в 500 мл среды LB с ампициллином (100 мкг/мл). Культивирование проводили в условиях аэрации при 37 °С до достижения оптической плотности  $A_{600} = 0,8-1$ . Синтез  $\beta 2M$  индуцировали добавлением IPTG до конечной концентрации 250 мкМ, и культивирование продолжали в течение ночи при 26 °С в условиях аэрации. Бактериальные клетки отделяли от среды культивирования путем центрифугирования в течение 15 мин при 10 000 g и однократно отмывали физиологическим раствором с последующим осаждением при 10 000 g. Клеточную массу ресуспендировали в растворе, содержащем 0,15 М NaCl, 25 мМ Na-фосфат, pH 7,4, 1 мМ PMSF, 10 мМ имидазол и 5 мМ меркаптоэтанол. Клетки разрушали с помощью соникации в условиях охлаждения. Для более полного разрушения к суспензии добавляли 1/10 объема стеклянных гранул. После разрушения

бактериальных клеток суспензию центрифугировали в течение 15 мин при 30 000 g, и супернатант отделяли от осадка. Очистку белка на металл-хелатном никель-агарозном сорбенте осуществляли, как описано в предыдущем разделе.

**Формирование фибрилл природного и рекомбинантного  $\beta$ 2M.** Для получения фибрилл природный или рекомбинантные  $\beta$ 2M с конечной концентрацией 30  $\mu$ M инкубировали в 200 mM глицин-HCl буфере (pH 2,0) в течение 7 сут при 37 °C при постоянном перемешивании (500 rpm) на термошейкере TS-100 (Biosan). Для получения фибрилл в физиологическом pH, был использован метод, описанный ранее Sasahara с соавт. [25, 26]. Использовался  $\beta$ 2M с конечной концентрацией 30  $\mu$ M. Кроме того, для получения фибрилл в физиологическом pH, был применен метод Kihara и соавт. [18]. В качестве «затравки» фибриллогенеза добавляли 1/100 объема готовых фибрилл той же концентрации, выращенных при pH 2,0 и стабилизированных 0,5 mM SDS.

Измерение флуоресценции комплексов тиофлавина T с фибриллами проводили по модифицированному методу [19]: 10 мкл раствора фибрилл добавляли к 300 мкл PBS-буфера, содержащего 6 мкM тиофлавина T. Пробу тщательно перемешивали, затем инкубировали 5 мин при комнатной температуре и переносили в кювету. Регистрацию спектров флуоресценции проводили с помощью спектрофлуориметра AVANTES AvaSpec-2048 (Источник света AvaLight-LED, 460 нм). Для исключения сигнала, поступающего на регистрирующее устройство спектрофлуориметра вследствие рассеяния излучения, применяли фильтр, отсекающий часть спектра с длиной волны менее 460 нм. В качестве нулевой пробы использовали  $\beta$ 2M в мономерной форме в той же концентрации.

**Электронная микроскопия.** Электронная микроскопия. Электронную микроскопию осуществляли на просвечивающем микроскопе JEM 1011 (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 80 kV. Препараты готовили с использованием метода негативного контрастирования. В качестве контрастирующего вещества применяли калийную соль фосфовольфрамовой кислоты (pH 7.2).

**Атомно-силовая микроскопия.** Для исследования с помощью атомной силовой микроскопии 5 мкл фибрилл помещали на влажную поверхность слайда, покрытого гидрогелем (HydroGel, Perkin Elmer, USA), предварительно инкубировавшегося в деионизованной воде в течение 30 мин. Далее образец подсушивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Атомно-силовая микроскопия проводилась с помощью сканирующего зондового микроскопа NT-MDT Solver Bio (NT-MDT, Россия) в полуконтактном режиме с использованием кантилевера NSG03

Ultra Sharp (NT-MDT, Россия). Обработка данных проводилась в программе GWYDDION (<http://gwyddion.net>).

**Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия.** Для детального анализа агрегатов и надфибрилярных структур, образованных белком слияния  $\beta$ 2MSF *in vitro*, использовали конфокальный лазерный сканирующий микроскоп «Carl Zeiss LSM 510» (Германия). Для возбуждения флуоресценции  $\beta$ 2MSF и superfolder GFP использовали лазер с длиной волны 488 нм, для детекции флуоресценции использовали фильтр 505–550 нм. Получение и обработку изображений осуществляли при помощи прилагаемого к микроскопу программного обеспечения «LSM 510».

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На начальном этапе работы был получен очищенный препарат  $\beta$ 2M человека из диализата. Описанные в литературе способы выделения  $\beta$ 2M из мочи нефротических больных [8] не всегда пригодны для проведения исследования, так как исходный материал не всегда доступен и, кроме того,  $\beta$ 2M в образцах мочи может частично деградировать. В настоящее время широко применяется гемодиализ, позволяющий предотвратить гибель больных с хронической почечной недостаточностью. В плазме крови таких больных концентрация  $\beta$ 2M существенно выше нормы. Фильтрация  $\beta$ 2M через гемодиализные мембраны приводит к частичному очищению плазмы крови от этого белка и его появлению в оттекающей из аппарата жидкости. Общий объем диализата составляет десятки литров, поэтому диализат может служить удобным источником получения  $\beta$ 2M. В диализной жидкости содержится гораздо меньше балластных белков, чем в плазме крови. Единственной трудностью в получении  $\beta$ 2M из диализата являются большие объемы исходного материала. Мы использовали для получения  $\beta$ 2M только первые десять литров диализата, в которых наблюдается наибольшая концентрация целевого белка. На первом этапе выделения  $\beta$ 2M диализная жидкость подвергалась ультрафильтрации на фильтре с размерами пор, проницаемых для низкомолекулярных соединений с молекулярной массой не выше 5 кДа. Анализ концентрата с помощью электрофореза в ПААГ показал наличие компонентов, соответствующих по молекулярной массе  $\beta$ 2M. Кроме того, в концентрате присутствовали белки с более высокой молекулярной массой, в частности альбумин (рис. 1). Масс-спектрометрический анализ белкового компонента, соответствующего  $\beta$ 2M по электрофоретической подвижности, подтвердил, что данная белковая зона содержит только полноразмерный  $\beta$ 2M человека. Последующая очистка белка включала дополнительную ультрафильтрацию

через мембрану с размерами пор, проницаемыми для  $\beta$ 2M, но не для более высокомолекулярных компонентов. Окончательную очистку производили при помощи гель-фильтрации. На электрофореграмме, представленной на рис. 1, видно, что выделенный белок мигрирует в денатурирующих условиях в виде одной зоны с молекулярной массой 12 кДа.

Для получения поликлональных моноспецифических антител кроликов иммунизировали гомогенизированными фрагментами полиакриламидного геля, содержащими  $\beta$ 2M после электрофоретической очистки. Полученные антитела обладают достаточным титром и могут быть использованы для обнаружения  $\beta$ 2M в сыворотке человека и к культуре *E.coli* (рис. 1).

В связи с ограниченностью количества природного  $\beta$ 2M для изучения фибриллогенеза было решено получить рекомбинантный белок. Из литературы известно, что созданные ранее другими группами рекомбинантные  $\beta$ 2M в бактериальных культурах име-

ют дополнительный метионин на N-конце и аккумулируются внутри бактерий в телец включения [12, 21, 16, 10]. Как известно, получение белка из телец включения чаще всего является достаточно сложной задачей, особенно, если белок плохо ренатурирует. Обычно извлечение белка из телец включения требует их растворения в сильных детергентах (мочевина, гуанидинхлорид и т.д.), после чего требуется стадия рефолдинга. Однако ренатурация происходит не всегда, и не может быть полной уверенности, что в дальнейшей работе используется белок, идентичный по всем параметрам природному [28]. Для некоторых белков ренатурация неосуществима. Поэтому получение растворимых, не образующих телец включения белков представляется весьма актуальной задачей.

Для достижения поставленной цели мы использовали два подхода. Первый подход заключался в конструировании вектора, несущего ген целевого белка, содержащий дополнительные последовательности, которые направляют синтезируемый белок в периплазму. Второй подход состоял в получении вектора, содержащего нуклеотидную последовательность белка слияния  $\beta$ 2M и superfolder green fluorescent protein (SFGFP). Суперфолдер (искусственно полученный мутантный GFP) обладает способностью восстанавливать исходную третичную структуру после полной денатурации, и, кроме того, он способствует правильному фолдингу синтезируемых вместе с ним в бактериальной клетке белков слияния [24]. Поэтому мы предположили, что наличие в составе белка слияния superfolder GFP будет способствовать формированию нативной структуры  $\beta$ 2M и препятствовать образованию телец включения.

Рекомбинантный  $\beta$ 2M получали из клеток *Escherichia coli* штамма BL21(DE3), трансформированных созданной нами плазмидой pETb2m6.8. Вектор сконструирован так, что белок синтезируется вместе с бактериальным PelB «лидерным пептидом», транспортирующим его в периплазматическое пространство бактерии, и впоследствии отщепляющимся под воздействием бактериальной протеазы. Это позволяет получить белок, 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, который не образовывал телец включения. Такая процедура позволяет уже на стадиях экстракции отделить целевой белок от большинства бактериальных примесей. Включение в  $\beta$ 2M полигистидиновой последовательности на C-конце дает возможность аффинно очистить белок на металл-хелатном никель-агарозном сорбенте. В результате процедура очистки становится весьма эффективной и быстрой. Уже экстракция периплазматической фракции сопровождается извлечением обо-

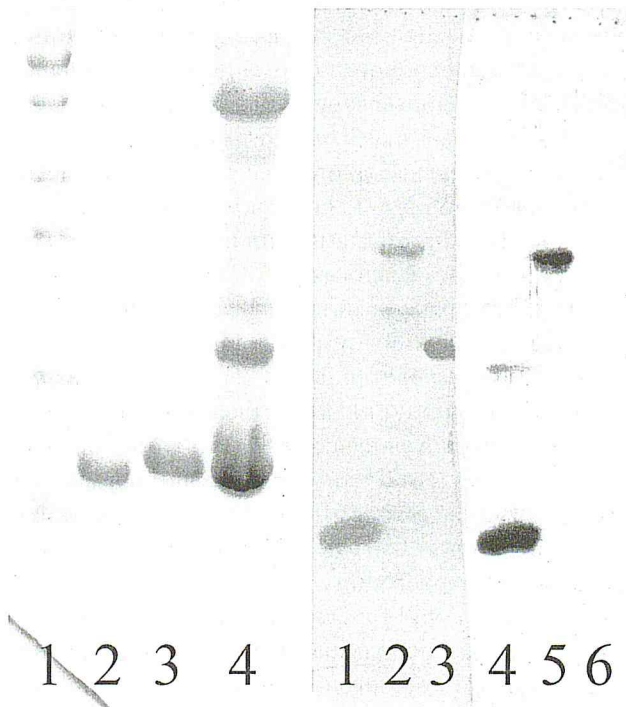


Рис. 1. Результаты электрофоретического разделения белков в 12% ПААГ.

Рисунок слева: окраска Coomassie brilliant blue R250. 1 – маркер молекулярного веса (Fermentas). Снизу вверх: 11 кДа, 17 кДа, 28 кДа, 36 кДа, 55 кДа, 72 кДа, 95 кДа; 2 –  $\beta$ 2M, выделенный из диализата больных на гемодиализе; 3 – рекомбинантный  $\beta$ 2M; 4 – концентрат диализата больного, длительное время находящегося на гемодиализе.

Рисунок справа: после WESTERN-BLOT нитроцеллюлозный фильтр разрезан на 2 части. Дорожки 1, 2, 3 окрашены амидо-шварц. Дорожки 4, 5, 6 обработаны кроличьими антителами к  $\beta$ 2M и окрашены с помощью меченных пероксидазой антител козы против IgG кролика (Sigma). 1, 4 – рекомбинантный  $\beta$ 2M; 2, 5 – белок слияния  $\beta$ 2MSF; 3, 6 – зеленый флуоресцентный белок

гашенного  $\beta 2M$ . Аффинная хроматография приводит к полной очистке  $\beta 2M$  в одну стадию (рис. 1).

Весьма интересным является белок слияния  $\beta 2MSF$ , который также легко выделяется из бактериальной культуры благодаря полигистидиновой последовательности на С-конце SFGFP. По данным электрофоретического разделения с последующим вестерн-блоттингом,  $\beta 2MSF$  обладал антигенными детерминантами  $\beta 2M$  (рис. 1). При возбуждении светом с длиной волны 460 нм  $\beta 2MSF$  флуоресцировал зеленым светом. Белок слияния в условиях фибриллогенеза образовывал структуры, видимые с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии (рис. 2). Следует отметить, что при pH 2,0  $\beta 2MSF$  обесцвечивается из-за изменения конформации GFP, но увеличение pH раствора до 5,0 и выше возвращает белку зеленую флуоресценцию. К сожалению, разрешающая способность микроскопа такого типа не позволяет различать сами фибриллы, поэтому видимые при конфокальной микроскопии образования можно интерпретировать или как надфибриллярные структуры, или как не содержащие фибриллы агрегаты.

Наличие фибрилл подтверждается и данными анализа флуоресценции тиофлавина Т в комплексе с  $\beta 2M$ . Этот метод количественного обнаружения фибрилл является общепринятым [19, 25, 26, 18, 10, 12, 16, 21]. В образцах, содержащих фибриллы, мы наблюдали возрастание флуоресценции по сравнению с контролем – раствором мономера  $\beta 2M$  (30 мкмоль), содержащим ту же концентрацию тиофлавина Т (рис. 2). К сожалению, фибриллы белка слияния исследовать с помощью тиофлавина не представляется возможным из-за собственной флуоресценции зеленого флуоресцентного белка.

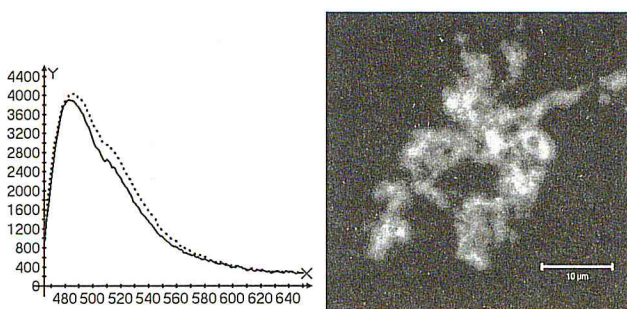


Рис. 2. Спектр флуоресценции комплекса тиофлавина Т с фибриллами (слева). Возбуждение – 460 нм.

По оси абсцисс – длина волны флуоресценции в нанометрах, по оси ординат – относительные единицы флуоресценции. Показаны графики флуоресценции амилоидных фибрилл рекомбинантного  $\beta 2M$  (сплошная линия) и  $\beta 2M$ , выделенного из диализата больных на гемодиализе (прерывистая линия). В качестве нулевой пробы использовали мономер  $\beta 2M$  в той же концентрации.

Рисунок справа: конфокальная микроскопия белка слияния  $\beta 2MSF$ . Масштабная шкала в правом нижнем углу соответствует 10 мкм

На рис. 3 и 4 представлены результаты электронной и атомно-силовой микроскопии образцов  $\beta 2M$ , подвергнутых фибриллогенезу. Видно, что как рекомбинантный  $\beta 2M$ , являющийся полноразмерным  $\beta 2M$  человека, так и рекомбинантный белок слияния образуют характерные фибриллярные структуры.

Гемодиализный амилоидоз ( $A\beta 2M$ ) относится к вторичным амилоидозам. Основным условием его развития считается увеличение концентрации  $\beta 2M$ , обусловленное угнетением выведения белка поврежденными почками. Несмотря на то, что гемодиализный амилоидоз относится к заболеваниям с нефатальными последствиями, это осложнение основного заболевания приводит к резкому ухудшению качества жизни пациентов. Поэтому изучение патогенеза  $A\beta 2M$  на молекулярном уровне является актуальным и, по нашему мнению, позволит не только разработать раннюю диагностику, но и найти подходы для терапии. Кроме того, выяснение закономерностей фибриллогенеза  $\beta 2M$ , лежащего в основе патогенеза данного амилоидоза, представляется самостоятельной фундаментальной задачей белковой химии, так как выявляет взаимосвязи фолдинга белков и их способности формировать аномальные мультимолекулярные структуры. Для решения поставленных задач необходимо иметь достаточное количество белка, сходного по своим характеристикам природного  $\beta 2M$  и способного в определенных условиях формировать амилоидные фибриллы. Как следует из представленных результатов, нам удалось получить как природный, так и рекомбинантные аналоги  $\beta 2M$ , которые по всем свойствам удовлетворяют поставленным требованиям. В настоящее время мы можем в достаточном количестве и с минимальными временными и финансовыми затратами получать варианты  $\beta 2M$ . Эти белки, как показано, формируют амилоидные фибриллы. Фибриллогенез белка слияния  $\beta 2MSF$  может быть исследован с помощью конфокальной микроскопии.

Природный  $\beta 2M$  и его рекомбинантные формы предполагается использовать для изучения закономерностей фибриллогенеза *in vitro*. В частности, планируется изучить влияние некоторых фармакологических препаратов на способность  $\beta 2M$  формировать фибриллы. В настоящее время проводятся исследования особенностей связывания фибрилл разных белков, в том числе и  $\beta 2M$ , с красителями. Фибриллы  $\beta 2M$  используются для получения специфических антител, которые взаимодействуют именно с аномальными конформерами белка и с фибриллярными формами. Для этих же целей используется и белок слияния, фибриллогенез которого можно исследовать *in vivo*. Фибриллярные формы  $\beta 2M$  предполагается также использовать для изучения взаимодействия с другими белками плазмы крови и

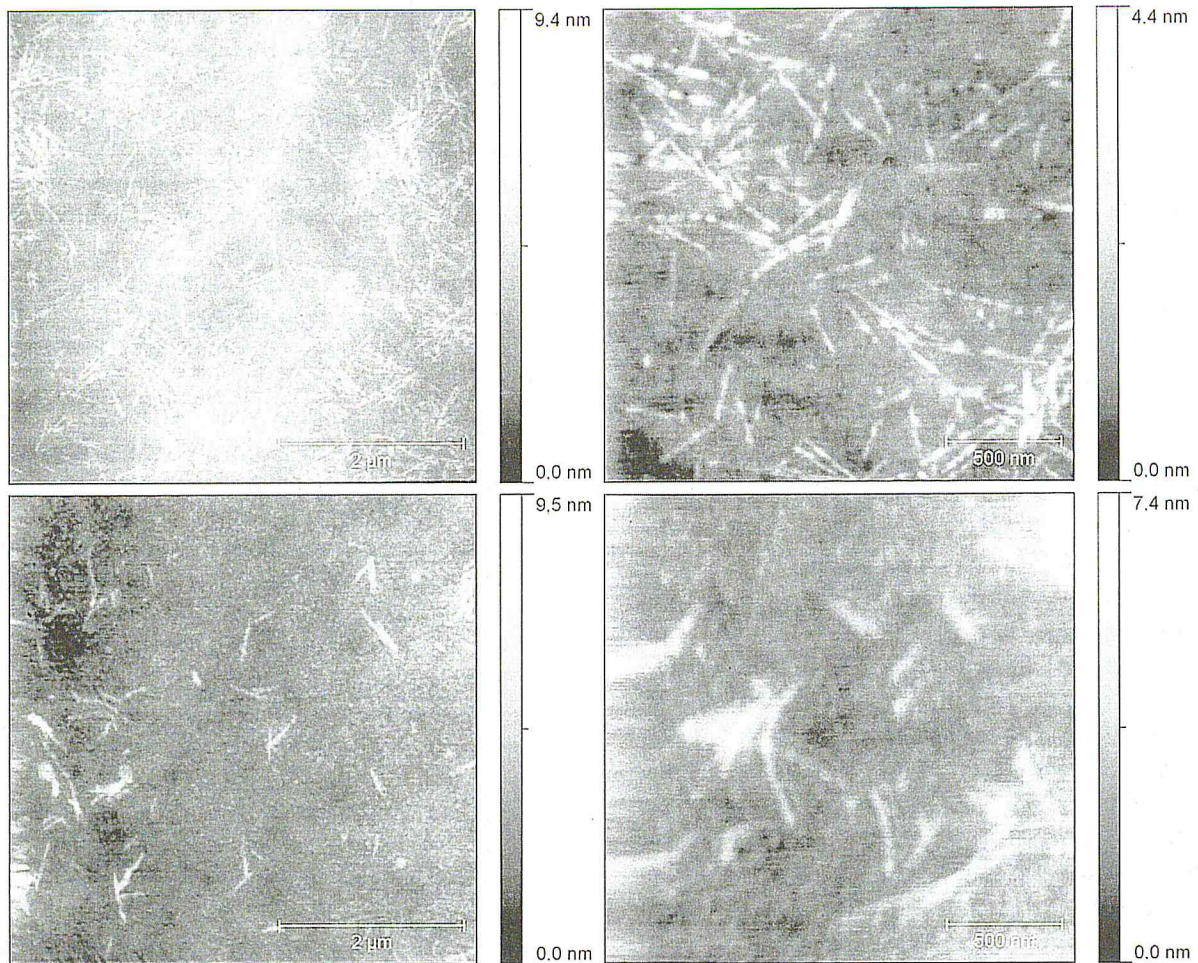


Рис. 3. Атомно-силовая микроскопия фибрилл рекомбинантного  $\beta 2M$  (сверху) и белка слияния  $\beta 2MSF$  (снизу)

с белками соединительной ткани, а также с компонентами соединительной ткани, которые постоянно присутствуют в зрелом амилоиде различного проис-

хождения. Сравнительный анализ фибрилlogenеза  $\beta 2M$  и других амилоидогенных белков позволит выявить отличительные свойства разных амилоидов и их тропность к определенным тканям.

Как показывают клинические исследования, амилоидозы представляют собой довольно распространенную патологию, которая в настоящее время плохо диагностируется и практически не поддается обычным видам терапии. Наиболее часто амилоидозы проявляются как заболевания нервной системы и повреждения сердечной мышцы (кардиомиопатии). В последнем случае больные страдают тяжелыми формами сердечной недостаточности с поздней постановкой правильного диагноза. В настоящее время единственным достоверным критерием амилоидоза являются гистохимическое исследование биоптатов с последующим уточнением природы амилоидоза (иммуногистохимия) и в ряде случаев (наследственные амилоидозы) с привлечением методов молекулярной генетики. Мы надеемся, что исследование фибрилlogenеза  $\beta 2M$  позволит сделать шаг вперед по направлению к ранней диагностике и разработке эффективных способов терапии как гемодиализного, так и других амилоидозов.

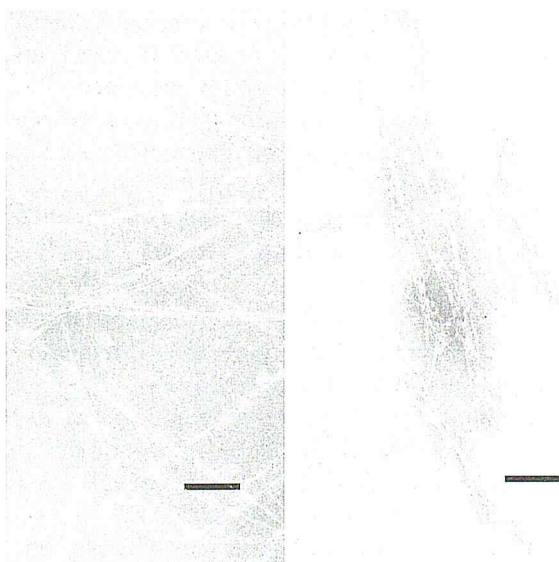


Рис. 4. Электронная микроскопия фибрилл рекомбинантного  $\beta 2M$  (слева) и белка слияния  $\beta 2MSF$  (справа). Масштабная шкала в правом нижнем углу соответствует 100 нм



## ВЫВОДЫ

1. Разработан простой и эффективный способ получения нативного природного  $\beta$ 2М без примесей из диализата больных на хроническом гемодиализе.
2. Получена экспрессионная генетическая конструкция, позволяющая синтезировать  $\beta$ 2М человека в бактериальной системе с аккумуляцией белка в периплазме.
3. Получена экспрессионная генетическая конструкция для получения белка слияния  $\beta$ 2М и зеленого флуоресцентного белка.
4. Показано, что полученные конструкции позволяют экспрессировать целевые гены в бактериальных клетках с синтезом нативных белков, которые не образуют тел включения.
5. Разработаны простые и эффективные методы получения рекомбинантных  $\beta$ 2М.
6. Показано, что природный и рекомбинантные  $\beta$ 2М формируют амилоидные фибриллы, которые могут быть использованы для изучения механизмов фибриллогенеза и путей его предотвращения.
7. Полученный белок слияния  $\beta$ 2MSF может быть использован для изучения фибриллогенеза с помощью конфокальной микроскопии, так как он, с одной стороны, образует фибриллы, а с другой – флуоресцирует в зеленом диапазоне.

*Авторы выражают благодарность к.ф.-м.н. Исаяву-Иванову В. В. за помощь в проведении экспериментов по атомной силовой микроскопии. Работа поддержана грантом РФФИ № 09-04-00788.*

## Литература

1. Брок Й. Получение препаратов иммуноглобулинов // Иммунологические методы / Г. Фримель. М.: Медицина, 1987. С. 390.
2. Ермоленко В.М. Хроническая почечная недостаточность // Нефрология: Руководство для врачей / Под ред. И.Е. Тареевой. М.: Медицина, 2000. С. 633–634.
3. Харбоу Н., Ингильд А. Иммунизация, выделение иммуноглобулинов, определение титра антител // Руководство по клиническому электрофорезу. М.: Мир, 1977. С. 200–205.
4. Шилов В., Денисов А. Позднее осложнение программного гемодиализа: бета-2-микροглобулиновый амилоидоз // Врач : Ежемесячный научно-практический и публицистический журнал. 2002. № 6. С. 7–12.
5. Guideline 10.  $\beta$ 2-microglobulin amyloidosis // Clinical Practice Guidelines for Bone Metabolism and Disease in Chronic Kidney Disease / Massry S.G., Coburn J.W. // Am. J. Kidney Dis. 2003. Vol. 42 (Suppl. 3). P. 1–202.
6. Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E. et al. // Current Protocols in Molecular Biology. 1989. John Wiley & Sons, New York.
7. Benz R.L., Siegfried J.W., Teehan B.P. Carpal tunnel syndrome in dialysis patients: Comparison between continuous ambulatory peritoneal dialysis and hemodialysis populations // Am. J. Kidney Dis. 1988. № 11. P. 473–476.
8. Berggard I., Beam A.G.. Isolation and properties of a low molecular weight B2-globulin occurring in human biological fluids // J. Biol. Chem. 1968. № 243. P. 4095–4103.
9. Campistol J.M., Sole M., Munoz-Gomez J., Lopez-Pedret J., Revert L. Systemic involvement of dialysis-amyloidosis // Am. J. Nephrol. 1990. № 10. P. 389–396.
10. Chiba T., Hagihara Y., Higurashi T., Hasegawa K., Naito H., Goto Y. Amyloid fibril formation in the context of full-length protein. Effects of proline mutations on the amyloid fibril formation of B2-microglobulin // J. Biol. Chem. 2003. № 278. P. 47016–47024.
11. Cornelis F., Bardin T., Faller B. et al. Rheumatic syndromes and beta 2-microglobulin amyloidosis in patients receiving long-term peritoneal dialysis // Arthritis Rheum. 1989. № 32. P. 785–788.
12. Esposito G., Michelutti R., Verdone G. et al. Removal of the N-terminal hexapeptide from human b2-microglobulin facilitates protein aggregation and fibril formation // Protein Sci. 2000. № 9. P. 831–845.
13. Gal R., Korzets A., Schwartz A., Rath-Wolfson L., Gafter U. Systemic distribution of beta 2-microglobulin-derived amyloidosis in patients who undergo long-term hemodialysis. Report of seven cases and review of the literature // Arch. Pathol. Lab. Med. 1994. № 118. P. 718–721.
14. Goldsby R.A., Kindt T.J., Osborne B.A. Major histocompatibility complex // Kuby Immunology / Freeman W.H. 2007. P. 166–178.
15. Jadoul M., Garbar C., Noël H., Sennesael J., Vanholder R., Bernaert P., Rorive G., Hanique G., van Ypersele, de Strihou C. Histological prevalence of beta 2-microglobulin amyloidosis in hemodialysis: a prospective post-mortem study // Kidney Int. 1997 (Jun). Vol. 51 (6). P. 1928–1932.
16. Kad N.M., Thomson N.H., Smith D.P., Smith D.A., Radford S.E. // J. Mol. Biol. 2001. № 313. P. 559–571.
17. Kaye R.K., Glabe C.G. Conformation-Dependent Anti-Amyloid Oligomer Antibodies // Methods in enzymology. 2006. Vol. 413. P. 326–344.
18. Kihara M., Chatani E., Sakai M., Hasegawa K., Naito H., Goto Y. Seeding-dependent maturation of  $\beta$ 2-microglobulin amyloid fibrils at neutral pH // J. Biol. Chem. 2005. № 280. P. 12012–12018.
19. LeVine H. Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease b-amyloid peptides: detection amyloid aggregation in solution // Prot. Sci. 1993. № 2. P. 404–410.

20. Maruyama H., Gejyo F., Arakawa M. Clinical studies of destructive spondyloarthritis in long-term hemodialysis patients // *Nephron*. 1992. № 61. P. 37–44.
21. McParland V.J., Kad N.M., Kalverda A.P., Brown A., Kirwin-Jones P., Hunter M. G., Sunde M., Radford S.E. // *Biochemistry*. 2000. № 39. P. 8735–8746.
22. Moriniere P., Marie A., el Esper N., Fardellone P., Deramond H., Remond A., Sebert J.L., Fournier A. Destructive spondyloarthritis with beta 2-microglobulin amyloid deposits in a uremic patient before chronic hemodialysis // *Nephron*. 1991. № 59. P. 654–657.
23. Ohashi K., Hara M., Kawai R., Ogura Y., Honda K., Nihei H., Mimura N. Cervical discs are most susceptible to beta 2-microglobulin amyloid deposition in the vertebral column // *Kidney Int*. 1992. № 41. P. 1646–1652.
24. Pedelacq J.D., Cabantous S., Tran T., Terwilliger T.C., Waldo G.S. Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein // *Nat. Biotechnol*. 2006. Vol. 24. № 1. P. 79–88.
25. Sasahara K., Yagi H., Naiki H., Goto, Y. Heat-triggered conversion of protofibrils into mature amyloid fibrils of  $\beta$ 2-microglobulin // *Biochemistry*. 2007. № 46. P. 3286–3293.
26. Sasahara K., Yagi H., Naiki H., Goto Y. Heat-induced conversion of  $\beta$ 2-microglobulin and hen egg-white lysozyme into amyloid fibrils // *J. Mol. Biol*. 2007. № 372. P. 981–991.
27. Sprague S.M., Moe S.M. Clinical manifestations and pathogenesis of dialysis-related amyloidosis // *Semin. Dial*. 1996. № 9. P. 360–369.
28. Ventura S., Villaverde A. Protein quality in bacterial inclusion bodies // *Trends Biotechnol*. 2006. № 24. P. 179–185.
29. Zingraff J.J., Noel L.H., Bardin T., Atienza C., Zins B., Druke T.B., Kuntz D. Beta 2-microglobulin amyloidosis in chronic renal failure // *N. Engl. J. Med*. 1990. № 323. P. 1070–1071.