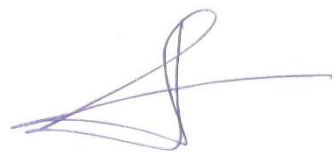


МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА



На правах рукописи

Конев Алексей Александрович

**Исследование иммунохимических и биохимических свойств
белка IGFBP-4 и его фрагментов,
образующихся под действием протеазы RAPP-A**

Специальность 03.01.04 – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва

2020

Работа выполнена на кафедре биохимии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Научный руководитель: **Катруха Алексей Генрихович**, доктор биологических наук, профессор.

Официальные оппоненты: **Муронец Владимир Израилевич**, доктор биологических наук, профессор, заведующий отделом биохимии животной клетки факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М.В. Ломоносова.

Левицкий Дмитрий Иванович, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией структурной биохимии белка, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН.

Воротников Александр Вячеславович, кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник НИИ экспериментальной кардиологии ФГБУ НМИЦ Кардиологии Минздрава России.

Защита состоится 14 декабря 2020 года в 11 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.03.12 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, МГУ, д. 1, стр. 12, аудитория М1.

E-mail: dkiselevs@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27). Со сведениями о регистрации участия в защите в удаленном интерактивном режиме и с диссертацией в электронном виде также можно ознакомиться на сайте ИАС «ИСТИНА»:

<https://istina.msu.ru/dissertations/323238566/>

Автореферат разослан «___» _____ 2020 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Киселевский Д.Б.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы и предмет исследования. Атеросклероз является одной из главных причин ишемической болезни сердца (ИБС). ИБС во многих случаях может приводить к острому коронарному синдрому (ОКС): нестабильной стенокардии и острому инфаркту миокарда. В связи с распространенностью данных заболеваний и высокой смертностью от них, большое внимание сегодня уделяется поиску и исследованию новых прогностических биохимических маркеров риска осложнений сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ).

Недавно было показано, что в качестве прогностических биомаркеров развития осложнений ССЗ можно использовать протеолитические фрагменты белка IGFBP-4 (белок, связывающий инсулиноподобный фактор роста; insulin-like growth factor binding protein-4). Гидролиз IGFBP-4 с участием протеазы PAPP-A (pregnancy-associated plasma protein-A) происходит между а.к.о. 135 и 136 с образованием двух фрагментов: N-концевого (NT-IGFBP-4¹⁻¹³⁵) и C-концевого (СТ-IGFBP-4¹³⁶⁻²³⁷), которые и было предложено использовать в качестве прогностических биомаркеров¹.

Прогностическая ценность NT-IGFBP-4 и СТ-IGFBP-4 в оценке риска осложнений ССЗ была показана в нескольких исследованиях, проведенных в различных лабораториях в последние годы, однако на данный момент в литературе практически нет сведений о биохимических особенностях этих белков. В то же время для достоверного количественного определения уровня NT-IGFBP-4 и СТ-IGFBP-4 в крови пациентов необходимо иметь представление об их свойствах: стабильности в кровотоке, посттрансляционных модификациях, образовании комплексов с другими белками и пр. Все эти факторы могут влиять на взаимодействие биомаркеров с моноклональными антителами (МАт), используемыми для количественного определения этих белков. Кроме того, для количественного определения NT-IGFBP-4 и СТ-IGFBP-4 необходимо иметь калибраторы со свойствами, схожими со свойствами обнаруживаемых в крови эндогенных белков.

¹ Все номера а.к.о. IGFBP-4 и его фрагментов в данной работе приведены согласно последовательности секретированного IGFBP-4 с отщепленным сигнальным пептидом (P22692, PRO_0000014382 в базе данных UniProt). Далее в тексте «NT-IGFBP-4» соответствует N-концевому фрагменту IGFBP-4 1-135, а «СТ-IGFBP-4» - C-концевому фрагменту IGFBP-4 136-237.

В ходе выполнения данной работы нами впервые были выделены и охарактеризованы эндогенные NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4. Была определена эпитопная специфичность МАт, использующихся для их количественного определения. В эукариотических экспрессионных системах были получены рекомбинантные аналоги NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4, схожие с ними по своим иммунохимическим свойствам.

Отдельной частью нашего исследования было изучение посттрансляционных модификаций NT-IGFBP-4, CT-IGFBP-4 и их предшественника – полноразмерного IGFBP-4. Известно, что IGFBP-4 присутствует в крови в двух формах: гликозилированной и негликозилированной. Однако наличие в крови гликозилированных фрагментов IGFBP-4 ранее не исследовалось. Из литературы известно, что гликозилирование белка может влиять на его взаимодействие с МАт. В связи с этим представлялось важным установить, оказывает ли гликозилирование какое-либо влияние на взаимодействие МАт с IGFBP-4 и его фрагментами.

Также известно, что гликозилирование может влиять на взаимодействие белка со специфическими протеазами. В литературе описаны случаи, когда гликозилирование молекулы биомаркера приводило к ингибированию ее специфического протеолиза. В связи с этим в рамках данной работы был отдельно исследован вопрос о чувствительности гликозилированного IGFBP-4 к протеолизу под действием специфической протеазы PAPP-A.

Цель исследования: изучение биохимических и иммунохимических свойств IGFBP-4 и его фрагментов NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4, обнаруживаемых в крови пациентов с ОКС, а также изучение влияния гликозилирования IGFBP-4 на специфическое расщепление IGFBP-4 под действием протеазы PAPP-A.

В рамках поставленной цели были сформулированы следующие **задачи:** 1) Получить рекомбинантные аналоги IGFBP-4, NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4, по своим биохимическим и иммунохимическим свойствам сходные с эндогенными белками; 2) Разработать метод выделения из крови больных ОКС эндогенных форм IGFBP-4, NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 и исследовать их биохимические свойства; 3) Исследовать различные факторы, которые могут влиять на измерение концентрации протеолитических фрагментов IGFBP-4 в крови; 4) Исследовать влияние гликозилирования на протеолиз IGFBP-4 под действием протеазы PAPP-A, приводящий к образованию фрагментов NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4.

Научная новизна работы. В ходе работы впервые были выделены из крови пациентов с ОКС и охарактеризованы протеолитические фрагменты IGFBP-4, а также изучено влияние гликозилирования IGFBP-4 на его протеолиз под действием PAPP-A. Различными методами было показано, что образующиеся под действием PAPP-A NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 не претерпевают в крови протеолитической деградации и не образуют комплексов с белками плазмы крови. Впервые в плазме крови была обнаружена гликозилированная форма NT-IGFBP-4 с массой 17260 Да. При исследовании IGFBP-4 и его фрагментов в образцах плазмы пациентов с ОКС было показано, что доля гликозилированного IGFBP-4 в общем содержании IGFBP-4 составляет от 47,2 до 61,7%, в то время как доля гликозилированного NT-IGFBP-4 в общем содержании NT-IGFBP-4 – от 9,8 до 23,5%. При сравнении скорости протеолиза гликозилированного и негликозилированного IGFBP-4 под действием PAPP-A *in vitro* было показано, что наличие гликозилирования на молекуле IGFBP-4 замедляет ее протеолиз примерно в 4 раза.

Практическая значимость работы. Показано, что полученные рекомбинантные аналоги полноразмерного IGFBP-4, NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 обладают сходными иммунохимическими свойствами с соответствующими эндогенными белками. Полученные рекомбинантные белки могут быть использованы как калибраторы для количественного определения концентрации IGFBP-4 и его фрагментов, что важно для их надежного использования в качестве маркеров риска осложнения ССЗ. Определена эпитопная специфичность МАт, используемых для измерения концентрации IGFBP-4, NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4. Было показано, что гликозилирование IGFBP-4 и NT-IGFBP-4 не оказывает влияния на взаимодействие этих белков со специфическими МАт. Исследованные МАт могут быть использованы для количественного определения как гликозилированной, так и негликозилированной форм IGFBP-4 и NT-IGFBP-4.

Положения, выносимые на защиту.

1. В плазме крови человека присутствуют фрагменты NT-IGFBP-4¹⁻¹³⁵ (14620 Да) и CT-IGFBP-4¹³⁶⁻²³⁷ (11345 Да), соответствующие продуктам протеолитической активности PAPP-A. Данные фрагменты не подвергаются в крови дальнейшей протеолитической деградации и не образуют прочных комплексов с белками плазмы

крови. Эпитопы данных фрагментов остаются доступными для детекции с использованием специфических МАт.

2. Иммунохимические свойства рекомбинантных NT-IGFBP-4, СТ-IGFBP-4 и полноразмерного IGFBP-4, полученных в эукариотических экспрессионных системах, соответствуют иммунохимическим свойствам эндогенных белков. Это позволяет использовать полученные рекомбинантные белки в качестве калибраторов для количественного измерения эндогенного IGFBP-4 и его фрагментов в плазме крови.

3. В плазме крови человека присутствует гликозилированный NT-IGFBP-4¹⁻¹³⁵ (17260 Да), содержание которого составляет в среднем 15,6% от общего количества NT-IGFBP-4. Гликозилирование NT-IGFBP-4 не влияет на его взаимодействие со специфическими МАт, используемыми для определения концентрации NT-IGFBP-4 в крови.

4. В плазме крови человека доля гликозилированного NT-IGFBP-4 в общем содержании NT-IGFBP-4 в $3,8 \pm 1,1$ раза меньше доли гликозилированного IGFBP-4 в общем содержании IGFBP-4. Данный факт согласуется с тем, что образование NT-IGFBP-4 в результате PAPP-A-зависимого протеолиза гликозилированного IGFBP-4 замедлено примерно в 4 раза по сравнению с протеолизом негликозилированного IGFBP-4.

Методология и методы диссертационного исследования. В работе использовались различные современные методы исследования белковых молекул. Для проведения исследования были использованы классические биохимические (электрофорез, гель-фильтрация), иммунохимические (аффинная хроматография, иммуноблоттинг, различные типы иммуноанализа) и физико-химические (масс-спектрометрия) методы.

Степень достоверности полученных результатов. Постановка цели и формулирование задач работы, подготовка обзора литературы и обсуждение результатов основаны на анализе актуальных публикаций по теме исследования. Представленные в работе данные получены с использованием современных методов исследований. Полученные результаты воспроизводимы и статистически достоверны.

Личный вклад соискателя. Личный вклад соискателя присутствует на всех этапах работы, включая анализ литературы по теме исследования, разработку используемых методик, постановку задач, получение, обработку и анализ

экспериментальных данных, обсуждение результатов, составление выводов, подготовку статей и тезисов конференций.

Апробация работы. Результаты работы были доложены на заседании кафедры биохимии биологического факультета МГУ; на 65-м и 68-м съездах Американской Ассоциации Клинической Химии в 2013 году (Хьюстон, США) и в 2016 году (Филадельфия, США); на 4-м Объединенном конгрессе Европейской Федерации Клинической Химии и Европейского Союза Медицинских Специалистов в 2016 году (Варшава, Польша); на Международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» в 2017 году (Москва, Россия); на 5-м Всемирном конгрессе острой сердечной недостаточности в 2018 году (Вена, Австрия).

Структура и объем работы. Диссертация построена по традиционному плану и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, список цитированной литературы. Работа изложена на 155 страницах печатного текста, сопровождается 46 рисунками и 8 таблицами. Список цитированной литературы содержит 203 наименования.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

В обзоре литературы приведены данные о факторах, влияющих на развитие процесса атеросклероза, а также описаны различные прогностические биомаркеры риска осложнений ССЗ. Особое внимание уделено описанию системы регуляции активности инсулиноподобного фактора роста (IGF) в организме, а также характеристике IGFBP-4, его протеолитических фрагментов и протеазы PAPP-A.

Материалы и методы исследования

Материалы. Получение молекулярно-генетических конструкций для экспрессии IGFBP-4, NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 проводилось в компании GenScript. Синтез пептидов, соответствующих различным участкам аминокислотной последовательности IGFBP-4, проводился в компании Peptide 2.0. МАт orb37203 было приобретено в компании Biorbyt; все остальные МАт, а также рекомбинантный PAPP-A были предоставлены компанией HyTest. Прочие реактивы и материалы (если не отмечено иное) – производства компании Sigma Aldrich.

Экспрессия рекомбинантных IGFBP-4, NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 проводилась в клетках линии HEK293f.

Конъюгацию пептидов, соответствующих различным участкам последовательности IGFBP-4, с бычьим сывороточным альбумином (БСА) проводили с использованием сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилата (SMCC, Pierce).

Определение эпитопной специфичности МАт проводили методом прямого ИФА. Конъюгаты БСА с пептидами сорбировали в лунки 96-луночного иммунологического планшета (Costar), после чего проводили инкубацию сорбированных пептидов с исследуемым МАт, конъюгированным с пероксидазой хрена. О наличии взаимодействия МАт с пептидом судили по интенсивности оптической плотности при проведении реакции с тетраметилбензидином.

Аффинная хроматография. Для получения очищенных препаратов рекомбинантных IGFBP-4, NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 и выделения эндогенных белков из плазмы крови пациентов с ОКС использовали аффинную хроматографию на сефарозе с иммобилизованными МАт, специфичными к различным эпитопам молекулы IGFBP-4.

Разделение гликозилированных и негликозилированных IGFBP-4 и NT-IGFBP-4 проводили на сефарозе с иммобилизованным конканавалином А (Pharmacia).

Иммуноанализ проводили для количественного определения концентрации IGFBP-4 и его фрагментов в образце. Использовали детекторные системы на основе пары МАт, специфичных к двум различным эпитопам исследуемого белка (иммуноанализ сэндвич-типа). Одно из МАт сорбировали в лунки планшетов для проведения иммуноанализа; второе МАт, конъюгированное со стабильным хелатом Eu^{3+} , использовали в качестве детекторного антитела. Регистрацию флуоресценции европия (в CPS, отсчетов в секунду) проводили на спектрофлуориметре Victor 1420 Multilabel Counter (PerkinElmer).

Электрофорез в трис-трициновой буферной системе проводили согласно методике, описанной Шагер и фон Ягов (Schagger & von Jagow, 1987).

Иммуноблоттинг осуществляли после электрофоретического разделения белков и их электропереноса из ПААГ на нитроцеллюлозную мембрану. Мембрану инкубировали с МАт, конъюгированными с пероксидазой хрена. Флуоресценцию

люминола, использованного в качестве субстрата, регистрировали на приборе ChemiDoc™ Touch Imaging System (BioRad). В качестве калибраторов использовали рекомбинантные белки. Расчет интенсивности флуоресценции полос и содержания в них белка проводили с использованием программного обеспечения Image Lab 5.2.1.

Гель-фильтрацию пулированных образцов плазмы проводили на системе AKTA pure (GE Healthcare), используя колонку Superdex 75 10/300 (GE Healthcare). Концентрацию форм IGFBP-4 во фракциях определяли методом иммуноанализа сэндвич-типа.

Для проведения масс-спектрометрических исследований использовали тандемный времяпролетный масс-спектрометр UltrafleXtreme Bruker Daltonics с матричной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI TOF/TOF), оснащенный ультрафиолетовым лазером в режиме положительных ионов; точность измеренных средних масс составляла 0,05%.

Результаты и обсуждение

Экспрессия, очистка и исследование рекомбинантных IGFBP-4, NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4

Для того, чтобы разработать метод количественного определения IGFBP-4, NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 в плазме крови, необходимо было получить и охарактеризовать рекомбинантные аналоги этих белков для использования их в качестве калибраторов в соответствующих иммуносистемах. Выбор эукариотической системы экспрессии для получения данных белков был обусловлен их сложной третичной структурой, наличием дисульфидных связей и потенциальных сайтов гликозилирования.

Уровень экспрессии IGFBP-4, NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 составил 3,5, 1,7 и 1,3 мг/л, соответственно. В результате аффинной хроматографии были получены препараты целевых белков с чистотой более 90% (Рис. 1).

Кажущиеся молекулярные массы полученных белков, определенные электрофоретически, соответствовали ожидаемым (25 кДа, 15 кДа и 12 кДа для IGFBP-4, NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4, соответственно). В препарате IGFBP-4 помимо основной формы массой 25 кДа была обнаружена минорная форма массой 30 кДа, а также фрагменты массой 13-15 кДа.

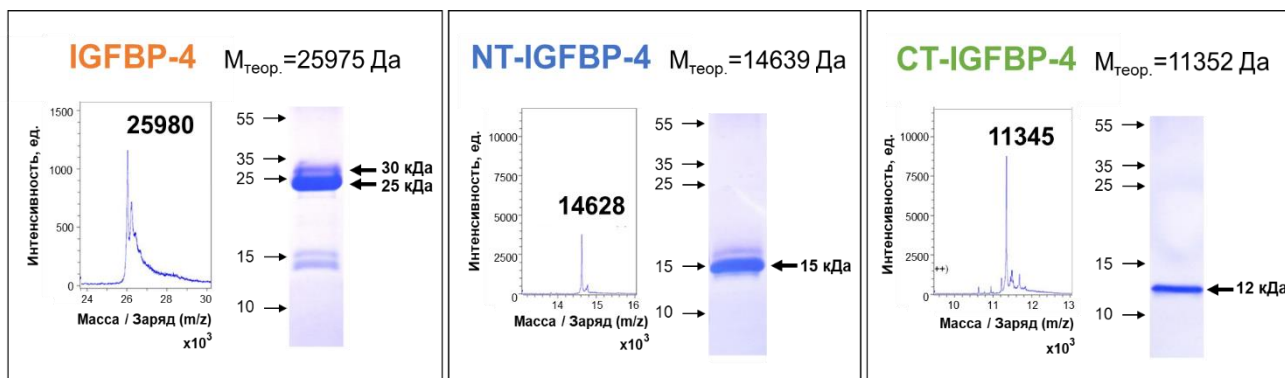


Рис. 1. Анализ препаратов рекомбинантных IGFBP-4, NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 методами электрофореза и масс-спектрометрии.

При исследовании препаратов рекомбинантных NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 методом масс-спектрометрии были детектированы пики с молекулярными массами 14628 и 11345 Да, что соответствует теоретическим значениям массы этих белков (14639 и 11352 Да, соответственно).

В препарате рекомбинантного IGFBP-4 был обнаружен пик с молекулярной массой 25980 Да, что соответствует теоретической массе IGFBP-4 (25975 Да). Белок с массой 30 кДа на масс-спектре обнаружен не был. Белкам с массой 13-15 кДа, присутствующим на электрофореграмме препарата IGFBP-4, соответствуют фрагменты IGFBP-4, образованные в результате его неспецифического протеолиза между а.к.о. 136-137, 134-135, 128-129 и 120-121 (масс-спектр не приведен) в процессе культивирования клеточной линии.

Определение эпитопной специфичности МАт

Для использования МАт в качестве основного инструмента, используемого для количественного определения исследуемых белков, было важно определить эпитопную специфичность этих антител.

Картирование эпитопов МАт проводили с использованием библиотеки перекрывающихся пептидов. Участки молекулы IGFBP-4, которым соответствовали пептиды, приведены на рис. 2.

Было определено, что МАт orb37203 (Biorbyt), IBP154, IBP180, IBP17, взаимодействующие с N-концевой частью молекулы IGFBP-4, специфичны к трем участкам: (1) а.к.о. 60-71, (2) а.к.о. 108-122 и (3) а.к.о. 126-133 (Рис. 3).

1																		I G F B P - 4																		237	
1										N T - I G F B P - 4								135		136		C T - I G F B P - 4								237							
1	22	30	49	56	75	82	101	108	127				144	163	170	189	196	215	222	237																	
	17	36	43	62	69	88	95	114	121	135	136	150		157	176	183	202	209	228																		
									121	134	137	150							222	236																	
									121	133	138	150							222	235																	
									121	132	139	150							222	234																	
								108	122	126	142								222	233																	
																			222	232																	
																			222	231																	

Рис. 2. Пептиды, использовавшиеся для определения эпитопной специфичности МАт. Оранжевым цветом обозначен IGFBP-4, синим – NT-IGFBP-4, зеленым – СТ-IGFBP-4. Светло-серым цветом обозначены пептиды, использовавшиеся для картирования эпитопов на молекуле IGFBP-4. Темно-серым обозначены пептиды для определения границ неоэпитопов NT-IGFBP-4 и СТ-IGFBP-4. Цифрами обозначены а.к.о. IGFBP-4.

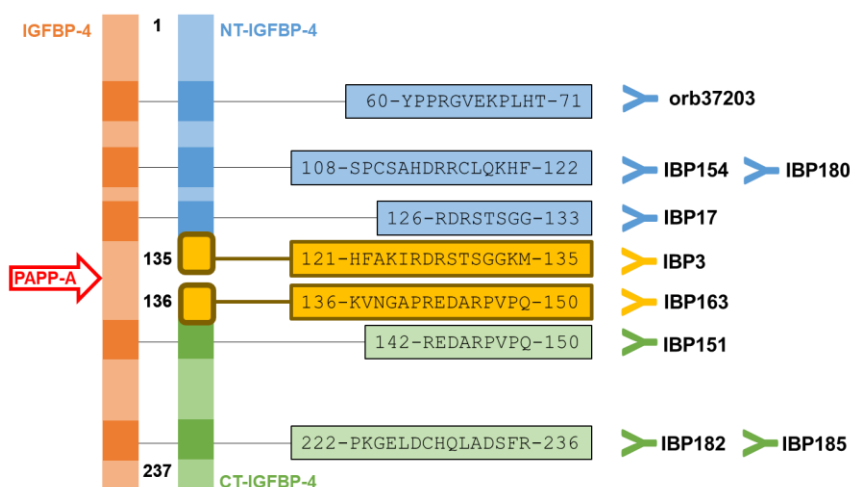


Рис. 3. Искользовавшиеся в работе МАт и их эпитопы. МАт, специфичные к N-концевой части молекулы IGFBP-4, и их эпитопы обозначены синим цветом. МАт, специфичные к С-концевой части молекулы IGFBP-4, и их эпитопы обозначены зеленым цветом. Желтым обозначены неоэпитопы на молекулах NT-IGFBP-4 и СТ-IGFBP-4 и соответствующие МАт, узнающие эти эпитопы. IGFBP-4 обозначен оранжевым цветом, участок его протеолиза под действием PAPP-A помечен стрелкой.

Было показано, что МАт IBP151, IBP182, IBP185, взаимодействующие с С-концевой частью молекулы IGFBP-4, специфичны к двум участкам: (1) участку 142-150 вблизи сайта расщепления IGFBP-4 и (2) участку 222-236 на С-конце молекулы (Рис. 3).

МАт из рассмотренных выше двух групп ввиду расположения их эпитопов взаимодействуют как с IGFBP-4, так и с его фрагментами.

Также было показано, что МАт IBP3 и IBP163 (специфичны к участкам 121-135 и 136-150, соответственно) не взаимодействуют с IGFBP-4 и специфичны только к эпитопам, имеющимся у NT-IGFBP-4 или СТ-IGFBP-4. Таким образом, можно заключить, что МАт IBP3 и IBP163 взаимодействуют с «неоэпитопами» – эпитопами,

отсутствующими на молекуле полноразмерного IGFBP-4 и образующимися в результате его протеолиза между Met135 и Lys136. МАт IBP3 и IBP163 являются главным инструментом количественного определения NT-IGFBP-4 и СТ-IGFBP-4 в крови, поскольку позволяют определять концентрацию фрагментов в присутствии IGFBP-4.

При исследовании специфичности МАт IBP3 и IBP163 было показано, что они не взаимодействовали с фрагментами, лишенными концевых Met135 и Lys136, соответственно (Рис. 4), демонстрируя, таким образом, крайнюю чувствительность к целостности неоэпитопов.

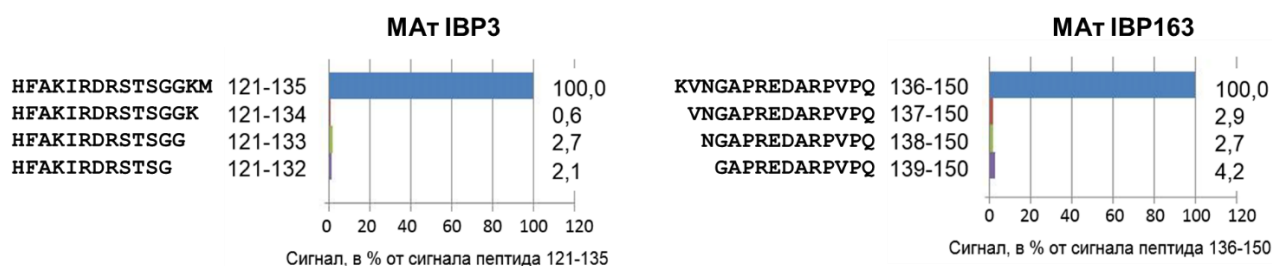


Рис. 4. Определение специфичности МАт IBP3 и IBP163. Пептиды 121-135 и 136-150 включают последовательности неоэпитопов NT-IGFBP-4 и СТ-IGFBP-4, соответственно. Пептиды 121-134, 121-133 и 121-132 лишены 1, 2 и 3 С-концевых а.к.о, присутствующих в молекуле NT-IGFBP-4. Пептиды 137-150, 138-150 и 139-150 1, 2 и 3 лишены N-концевых а.к.о присутствующих в молекуле СТ-IGFBP-4.

Выделение IGFBP-4 и его протеолитических фрагментов из плазмы крови и исследование разнообразия их форм

При картировании эпитопов было обнаружено, что для взаимодействия МАт IBP3 и IBP163 с NT-IGFBP-4 и СТ-IGFBP-4 важны их концевые а.к.о. 135 и 136, соответственно. Известно, что области вблизи неоэпитопов NT-IGFBP-4 и СТ-IGFBP-4 являются неструктурированными и могут быть подвержены дальнейшей протеолитической деградации. Частичный протеолиз белка в области эпитопа антитела может привести к занижению результатов при определении его концентрации в образце. В то же самое время мы показали, что МАт IBP3 и IBP163, крайне чувствительны к деградации эпитопов (Рис 4). Исходя из этого было необходимо выяснить, присутствуют ли в плазме крови деградированные NT-IGFBP-4 и СТ-IGFBP-4 и затрагивает ли деградация их неоэпитопы.

Выделение NT-IGFBP-4, СТ-IGFBP-4 и IGFBP-4 проводили из ЭДТА-плазмы пациентов с ОКС, поскольку известно, что содержание NT-IGFBP-4 и СТ-IGFBP-4 у

них выше, чем у здоровых доноров. Для выделения использовали две соединенные последовательно колонки с аффинными носителями (рис. 5, А). Носитель в первой колонке был специфичен к N-концевой части молекулы IGFBP-4 (IBP180-сефароза), а носитель во второй колонке - к С-концевой части (IBP185-сефароза). При элюции белков с носителей получали СТ-IGFBP-4 и смесь IGFBP-4 и NT-IGFBP-4. Эту смесь впоследствии разделяли на IBP185-сефарозе, получая во фракции не связавшихся с носителем белков NT-IGFBP-4, а в элюате – IGFBP-4.

Полученные препараты исследовали методом иммуноблоттинга с использованием МАт IBP180 и IBP185 (Рис. 5, Б). В препарате эндогенного СТ-IGFBP-4 присутствовал белок с молекулярной массой 12 кДа, соответствовавший по массе рекомбинантному аналогу. В препарате эндогенного NT-IGFBP-4 было выявлено присутствие двух форм: основной формы с молекулярной массой 15 кДа, которая соответствовала по массе рекомбинантному NT-IGFBP-4, и формы с молекулярной массой 17 кДа. Необходимо отметить, что в полученных препаратах NT-IGFBP-4 и СТ-IGFBP-4 отсутствуют фрагменты с меньшей массой, что свидетельствует о том, что NT-IGFBP-4 и СТ-IGFBP-4 не подвергаются деградации в крови.

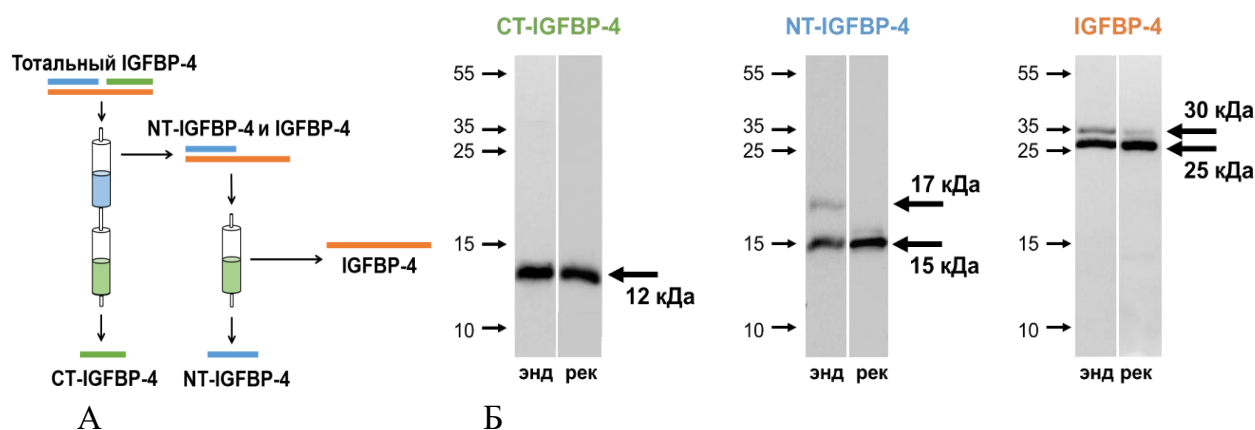


Рис. 5. Выделение эндогенного IGFBP-4 и его фрагментов из плазмы крови пациентов с ОКС. А – Схема выделения различных форм IGFBP-4 из плазмы крови. Б – Иммуноблоттинг препаратов IGFBP-4 и его фрагментов, выделенных из плазмы крови. Препараты эндогенных белков обозначены «энд», их рекомбинантные аналоги - «рек».

Препарат IGFBP-4 содержал две формы: основную массой 25 кДа и минорную массой 30 кДа. Известно, что IGFBP-4 в крови представлен в гликозилированной и негликозилированной формах (Kiefer et al. 1991). Можно предположить, что форма IGFBP-4 с молекулярной массой 30 кДа является гликозилированной формой IGFBP-4. Единственный возможный сайт гликозилирования (Asn104) расположен в N-концевой части IGFBP-4, и при его протеолизе под действием RAPP-A должен

образовываться гликозилированный NT-IGFBP-4. Поэтому мы предположили, что NT-IGFBP-4 с массой 17 кДа также может быть гликозилирован.

Чтобы подтвердить это предположение, мы провели аффинную хроматографию препарата эндогенных IGFBP-4 и NT-IGFBP-4 на сефарозе с иммобилизованным конканавалином-А – лектином, связывающем олигосахариды и гликопротеины с остатками маннозы. На рис. 6 приведен анализ полученных препаратов методом иммуноблоттинга. Как видно, формы IGFBP-4 и NT-IGFBP-4 с массами 25 и 15 кДа, соответственно, содержатся во фракции не связавшихся с носителем белков, а их формы с массами 30 и 17 кДа, соответственно, присутствуют в элюате. Это подтверждает наше предположение, что IGFBP-4 массой 30 кДа и NT-IGFBP-4 массой 17 кДа гликозилированы. Присутствие в крови гликозилированного NT-IGFBP-4 показано впервые.

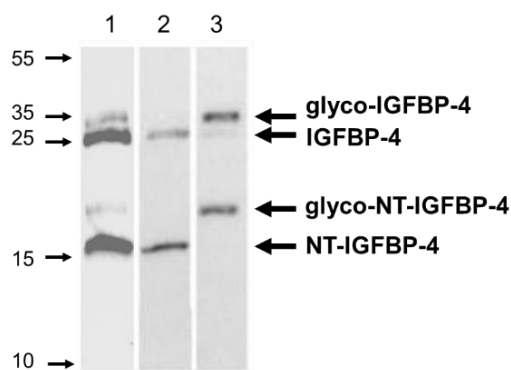


Рис. 6. Иммуноблоттинг препарата эндогенных IGFBP-4 и NT-IGFBP-4 после разделения на конканавалин-А-сефарозе. Окрашивание проводили с использованием МАт IBP180. Дорожки: 1 – препарат IGFBP-4 и NT-IGFBP-4, нанесенный на колонку с конканавалин А-сефарозой; 2 – фракция не связавшихся с носителем белков; 3 – элюат.

Разнообразие форм полученных белков было также изучено методом масс-спектрометрии (Рис. 7). В препаратах СТ-IGFBP-4 (Рис. 7, Б) и IGFBP-4 (Рис. 7, В) были обнаружены пики с молекулярной массой 11345 Да и 25985 Да, соответствующие СТ-IGFBP-4 и IGFBP-4, соответственно. В препарате эндогенного NT-IGFBP-4 помимо пика 14615 Да, соответствующего NT-IGFBP-4, присутствовала форма с массой 17260 Да (Рис. 7, А), соответствующая гликозилированному NT-IGFBP-4. Пиков, соответствующих деградированным формам NT-IGFBP-4 и СТ-IGFBP-4, обнаружено не было.

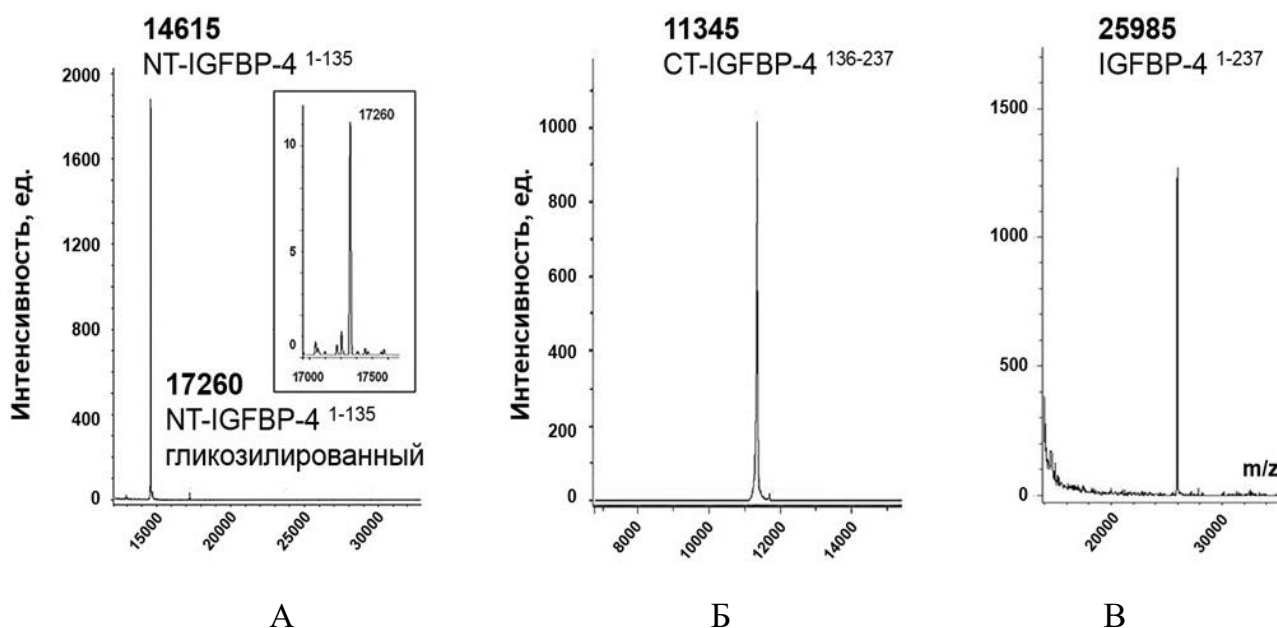


Рис. 7. Масс-спектры препаратов эндогенных форм IGFBP-4, выделенных из плазмы крови пациентов с ОКС.

Возможность деградации неоэпитопов NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 в крови была исследована также методом иммуноанализа.

В полученных препаратах концентрации эндогенных NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 измеряли с использованием двух типов детекторных систем. Системы IBP180-IBP3* и IBP182-IBP163* позволяли детектировать только формы NT-IGFBP-4¹⁻¹³⁵ и CT-IGFBP-4¹³⁶⁻²³⁷, соответственно, поскольку включали МАт IBP3 и IBP163, специфичные к неоэпитопам. В другом случае использовали системы, включающие МАт, специфичные к эпитопам, расположенным на определенном расстоянии от неоэпитопных участков. Эти системы позволяли детектировать фрагменты с деградированными неоэпитопами. В качестве таких систем были использованы orb37203-IBP180* и IBP17-IBP180* (для NT-IGFBP-4) и IBP185-IBP151* (для CT-IGFBP-4). Мы предположили, что при наличии в крови форм NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 с деградированными неоэпитопами концентрация данных фрагментов, измеренная в неоэпитоп-специфичных системах МАт, будет ниже, чем при измерении тех же фрагментов с использованием систем МАт, специфичных к участкам, удаленным от неоэпитопов.

Как видно на рис. 8, результаты измерения концентрации NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 при использовании двух описанных выше типов детекторных систем МАт, совпадают. Результаты исследования свидетельствуют о том, что в выделенных

препаратах отсутствуют деградированные со стороны неопитопов формы NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4.

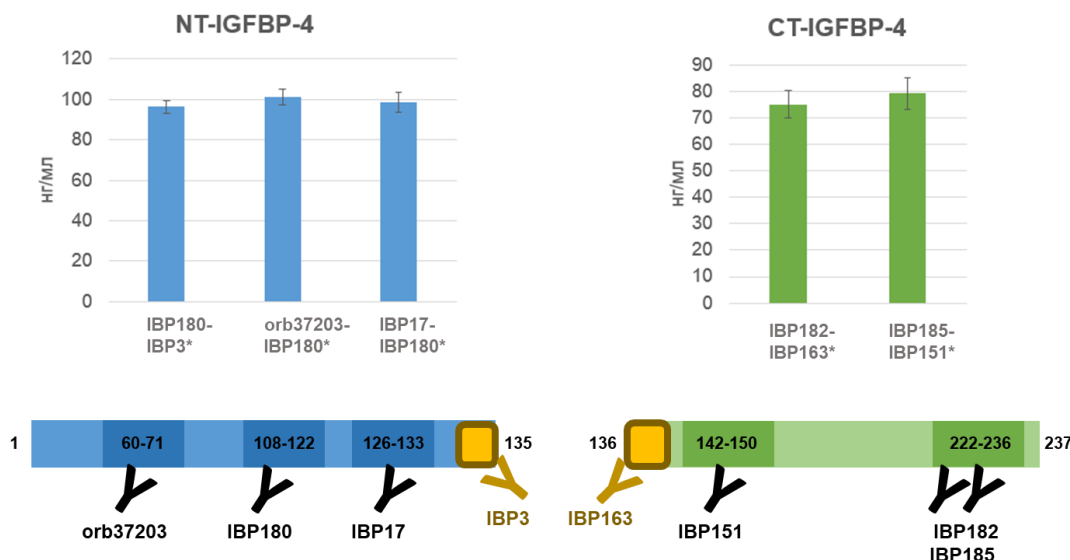


Рис. 8. Исследование деградации неопитопов эндогенных NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 методом иммуноанализа. На диаграммах приведены результаты измерения концентрации эндогенных NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 различными системами МАт. Изображена схема расположения эпитопов использовавшихся МАт.

Таким образом, различными методами было показано, что NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 в плазме крови не претерпевают деградации со стороны неопитопов. Это позволяет использовать МАт IBP3 и IBP163, чувствительные к целостности неопитопов, для количественного определения NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4.

Исследование возможного образования комплексов между фрагментами IGFBP-4 и белками крови

Помимо протеолиза концевых участков молекулы, другой причиной занижения результатов при измерении концентрации исследуемого белка в крови человека может быть полное или частичное экранирование его эпитопов в результате образования комплекса с другим белком или несколькими белками, содержащимися в плазме.

Чтобы определить, взаимодействуют ли NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 с какими-либо белками в крови, была проведена гель-фильтрация объединенной плазмы 22 пациентов с ОКС (рис. 9).

В собранных фракциях измеряли иммунохимическую активность NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 с использованием систем IBP180-IBP3* и IBP182-IBP163*, соответственно. Иммунохимическую активность IGFBP-4 измеряли с использованием

системы IBP185-IBP154*. Данная система позволяла детектировать только IGFBP-4, поскольку МАт IBP185 специфично к участку 222-236, а МАт IBP154 – к участку 108-122. Также для измерений использовали детекторные системы IBP17-IBP180* и IBP185-IBP151*. Эти системы включают МАт, специфичные к эпитопам, расположенным на расстоянии от протеолитических неоэпитопов, и позволяют детектировать IGFBP-4 совместно с NT-IGFBP-4 или СТ-IGFBP-4, соответственно.

При анализе фракций были получены пики, соответствующие по положению пикам рекомбинантных NT-IGFBP-4, СТ-IGFBP-4 и IGFBP-4. Пиков, соответствующих каким-либо комплексам, не наблюдали.

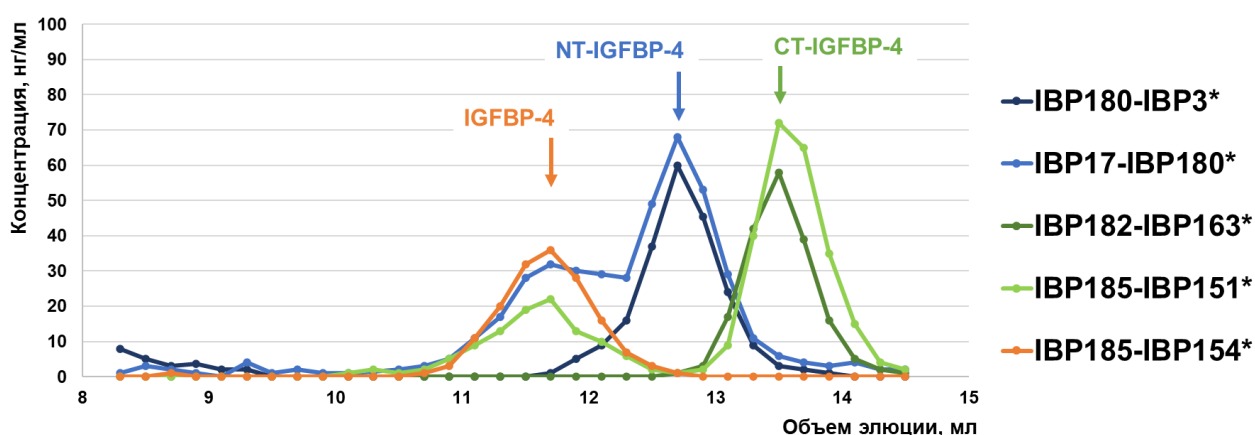


Рис. 9. Исследование иммунохимической активности NT-IGFBP-4, СТ-IGFBP-4 и IGFBP-4 во фракциях после разделения белков объединенной плазмы крови (22 больных с ОКС) методом геле-фильтрации. Положения пиков элюции рекомбинантных стандартов помечены стрелками.

Таким образом, в результате проведенного исследования мы установили, что NT-IGFBP-4 и СТ-IGFBP-4 не образуют комплексов с белками плазмы крови и присутствуют в крови в свободном виде и могут быть количественно определены в крови больных с использованием специфических МАт.

Исследование влияния гликозилирования на взаимодействие МАт с IGFBP-4 и NT-IGFBP-4

Известно, что экранирование эпитопа антитела может происходить не только за счет взаимодействия исследуемого белка с другим белком, но и за счет наличия посттрансляционных модификаций, изменяющих конформацию белковой молекулы или стерически препятствующих взаимодействию антигена с антителом.

Ранее мы показали, что в препаратах эндогенных IGFBP-4 и NT-IGFBP-4 присутствуют их гликозилированные формы. Известно, что молекула IGFBP-4 имеет только один потенциальный сайт гликозилирования – Asn104. Именно в области этого а.к.о. располагается эпитоп 108-122, с которым взаимодействуют используемые для определения IGFBP-4 и NT-IGFBP-4 МАт IBP154 и IBP180. Поскольку в крови больных ОКС присутствуют как гликозилированная, так и негликозилированная формы IGFBP-4 и NT-IGFBP-4, важно было понять, влияет ли гликозилирование на взаимодействие этих МАт с антигеном.

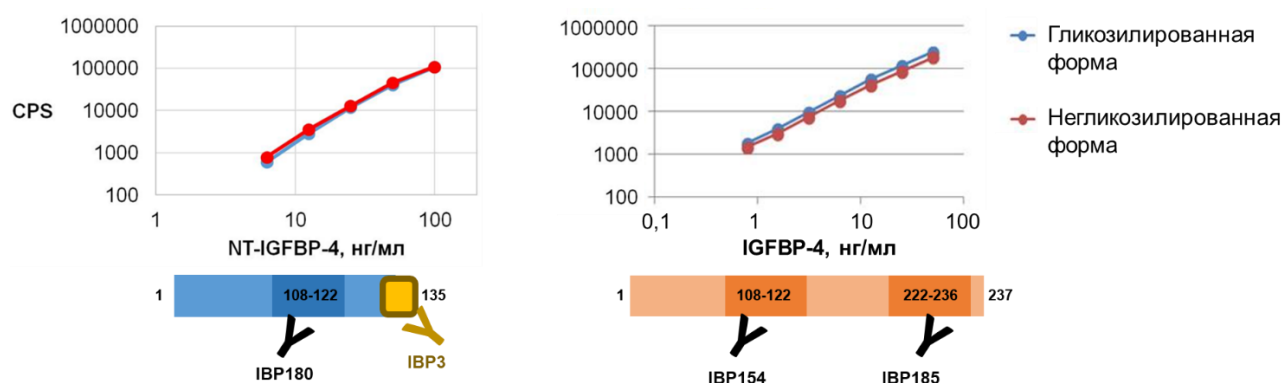


Рис. 10. Сравнение иммунохимической активности гликозилированной и негликозилированной форм эндогенных NT-IGFBP-4 и IGFBP-4. Приведены схемы расположения эпитопов использованных МАт.

Иммунохимические свойства полученных препаратов гликозилированных и негликозилированных форм IGFBP-4 и NT-IGFBP-4 исследовали с использованием систем IBP185-IBP154* и IBP180-IBP3*, соответственно.

Результаты данного эксперимента представлены на рис. 10. Как видно из приведенных графиков, МАт одинаково эффективно взаимодействуют с гликозилированными и негликозилированными формами исследованных белков. Это означает, что гликозилирование не оказывает влияния на иммунохимические свойства эндогенных IGFBP-4 и NT-IGFBP-4 при их определении с использованием МАт IBP154 и IBP180, специфичных к эпитопу 108-122. Поскольку данные МАт узнают как негликозилированные, так и гликозилированные формы IGFBP-4 и NT-IGFBP-4, они могут быть использованы для количественного определения обеих форм в крови.

Исследование влияния гликозилирования IGFBP-4 на его протеолиз под действием PAPP-A

Известно, что гликозилирование белка по участку, расположенному рядом с сайтом расщепления протеазы, может препятствовать его протеолизу. Поскольку в

крови определенная часть молекул IGFBP-4 гликозилирована, представлялось важным исследовать, влияет ли гликозилирование на специфический протеолиз IGFBP-4 под действием RAPP-A с образованием NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4.

Для этого препарат IGFBP-4, выделенный из плазмы пациентов с ОКС, содержащий обе формы (гликозилированную и негликозилированную) белка, инкубировали в присутствии RAPP-A в течение 60 мин. Белковый состав полученного препарата исследовали методом иммуноблоттинга с использованием смеси МАт IBP180 и IBP185. Как следует из рис. 11, при инкубации в присутствии RAPP-A в верхней полосе IGFBP-4, соответствующей его гликозилированной форме (полоса А), осталось 42,7% от исходного содержания белка. В то же время в нижней полосе IGFBP-4, соответствующей его негликозилированной форме (полоса В) осталось 19,7% от исходного содержания белка.

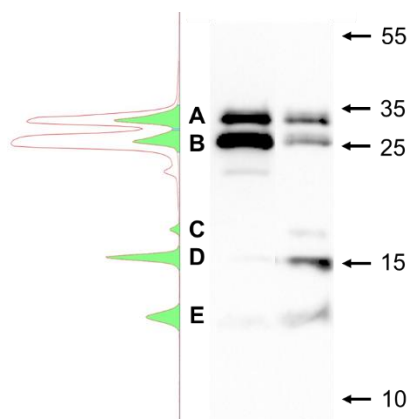


Рис. 11. Расщепление IGFBP-4 под действием RAPP-A. Дорожки: 1 – инкубация IGFBP-4 без добавления RAPP-A; 2 – инкубация IGFBP-4 в присутствии RAPP-A. Окрашивание белков методом иммуноблоттинга с использованием смеси МАт IBP180 и IBP185. Расчет содержания IGFBP-4 в соответствующих полосах проводили с использованием программы Image Lab 5.2.1. Слева приведена диаграмма, отражающая уровень интенсивности окрашивания полос до расщепления IGFBP-4 под действием RAPP-A (линия) и после расщепления (линия с закрашенной зеленым цветом областью под графиком). Обозначения пиков и полос: А – гликозилированный IGFBP-4; В – негликозилированный IGFBP-4; С – гликозилированный NT-IGFBP-4; D негликозилированный NT-IGFBP-4; E – CT-IGFBP-4.

В следующем эксперименте протеолизу под действием RAPP-A подвергали индивидуальные препараты эндогенного гликозилированного и негликозилированного IGFBP-4. В образцах через определенные промежутки времени измеряли концентрацию образовавшихся NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 с использованием систем IBP180-IBP3* и IBP182-IBP163*, соответственно (рис. 12). Также в образцах измеряли концентрацию IGFBP-4, используя систему IBP185-IBP154*. На представленных графиках зависимости концентрации белков в реакционной смеси от

продолжительности протеолиза видно, что при расщеплении негликозилированного IGFBP-4 его убыль и образование NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 происходит примерно в 4 раза быстрее, чем при расщеплении гликозилированного IGFBP-4.

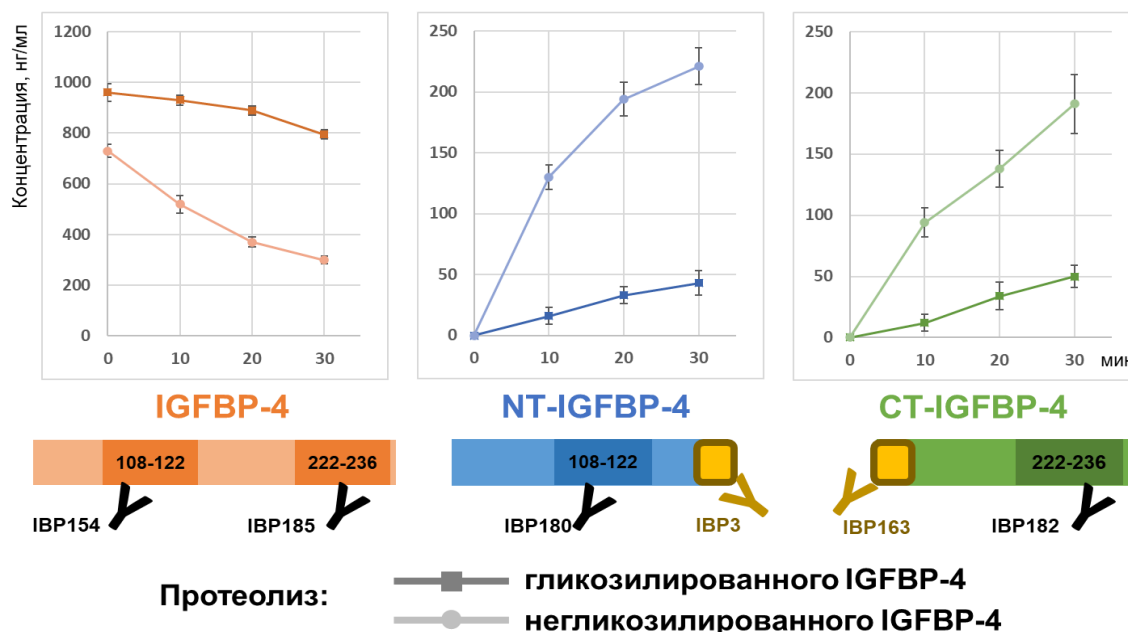


Рис. 12. Убыль IGFBP-4 и прирост NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 при PAPP-A-зависимом протеолизе гликозилированного и негликозилированного IGFBP-4. Представлены графики зависимости концентрации IGFBP-4, NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 от времени инкубации IGFBP-4 с PAPP-A, а также схема расположения эпипептидов использовавшихся МАт.

Таким образом, мы показали, что гликозилирование влияет на подверженность IGFBP-4 протеолизу под действием PAPP-A.

Результаты экспериментов *in vitro* также подтверждают полученные данные по содержанию гликозилированных и негликозилированных форм IGFBP-4 и NT-IGFBP-4 в индивидуальных образцах плазмы пациентов с ОКС (Рис. 13). Для экстракции всех возможных форм IGFBP-4 и его фрагментов образцы плазмы пациентов с ОКС инкубировали с сефарозой с иммобилизованными МАт, специфичными к различным эпипептидам IGFBP-4. Содержание гликозилированного и негликозилированного IGFBP-4 и NT-IGFBP-4 в экстрактах рассчитывали по интенсивности окрашивания соответствующих полос при проведении иммуноблоттинга. Рекомбинантные IGFBP-4 и NT-IGFBP-4 использовали как калибраторы, в качестве детекторного МАт использовали IBP180. Во всех 12 исследованных образцах плазмы крови содержатся гликозилированные и негликозилированные формы IGFBP-4 и NT-IGFBP-4. Доля гликозилированного IGFBP-4 (30 кДа) в общем содержании IGFBP-4 составила 47,2 -

61,7% (среднее значение 54,8%), в то время как доля гликозилированного NT-IGFBP-4 (17кДа) в общем содержании NT-IGFBP-4 – 9,8-23,5% (среднее значение 15,6%). В среднем доля гликозилированного полноразмерного IGFBP-4 в исследованных образцах была больше доли гликозилированного NT-IGFBP-4 в $3,8 \pm 1,1$ раза. Это наблюдение позволяет предположить, что гликозилированный IGFBP-4 расщепляется в крови в меньшей степени, чем негликозилированный IGFBP-4.

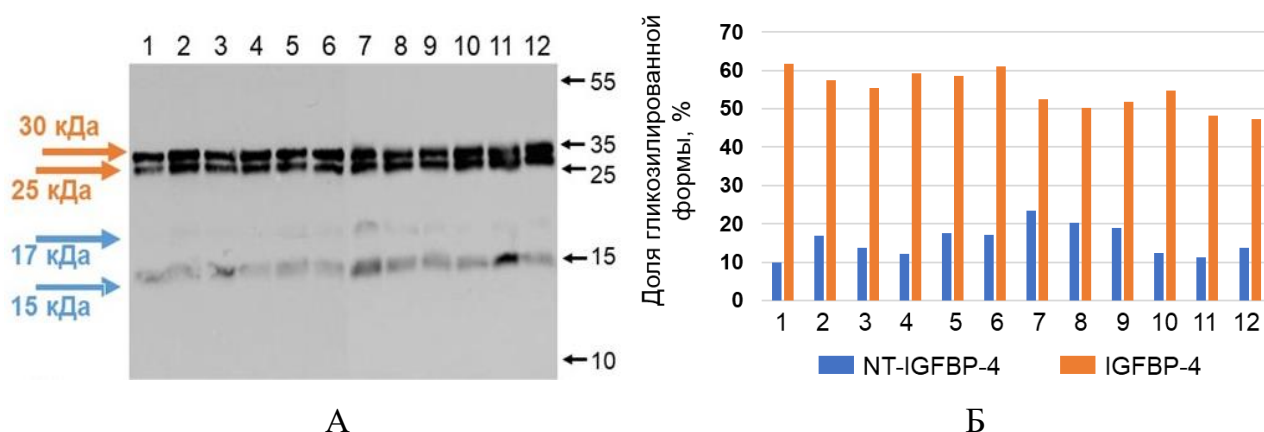


Рис. 13. Анализ содержания гликозилированных форм IGFBP-4 и NT-IGFBP-4 в экстрактах из 12 образцов плазмы пациентов с ОКС. А – Детекция IGFBP-4 и NT-IGFBP-4 в экстрактах методом иммуноблоттинга. Б – Доля гликозилированных форм IGFBP-4 и NT-IGFBP-4 в общем содержании IGFBP-4 и NT-IGFBP-4, соответственно, рассчитанное по интенсивности флуоресценции полос(А).

Известно, что расщепление IGFBP-4 под действием PAPP-A возможно только в том случае, если IGFBP-4 находится в комплексе с IGF. Это означает, что PAPP-A образует фермент-субстратный комплекс не со свободным IGFBP-4, а с комплексом IGF · IGFBP-4, только после чего возможен акт протеолиза. Присутствие стерического ограничения в виде гликана, связанного с остатком Asn104 IGFBP-4, может влиять: а) на образование комплекса IGF·IGFBP-4 или б) на взаимодействие PAPP-A с этим комплексом.

Ранее было показано, что IGF с одинаковой эффективностью связывается как с гликозилированным, так и с негликозилированным IGFBP-4 (*Chelius et al., 2002*). Поэтому наиболее вероятной причиной частичного ингибирования протеолиза гликозилированного IGFBP-4 является именно препятствие в образовании фермент-субстратного комплекса между IGFBP-4 и PAPP-A. Участок протеолиза IGFBP-4 находится между а.к.о. Met135 и Lys136, расположенными на определенном удалении от гликозилированного Asn104. Известно однако, что за связывание IGFBP-4 и PAPP-

А отвечают положительно заряженные остатки Lys120, His121, Lys124, Arg126, Arg128 и Lys134 IGFBP-4 (Laurson *et al.*, 2002). В дополнительном исследовании (данные не приводятся) при дегликозилировании NT-IGFBP-4 под действием α 2-3,6,8-нейраминидазы мы показали, что в состав гликана входят отрицательно заряженные остатки N-ацетилнейраминовой кислоты. В этом случае отрицательно заряженные остатки гликана могут взаимодействовать с расположенными рядом положительно заряженными а.к.о., важными для образования фермент-субстратного комплекса, и препятствовать взаимодействию RAPP-A с молекулой IGFBP-4.

Гликозилирование IGFBP-4, снижающее его чувствительность к протеолизу под действием RAPP-A, может быть одним из механизмов ограничения биологической активности IGF в организме. На основе наших экспериментальных данных мы предлагаем объяснение механизма влияния гликозилирования IGFBP-4 на биологическую активность IGF (рис. 14).

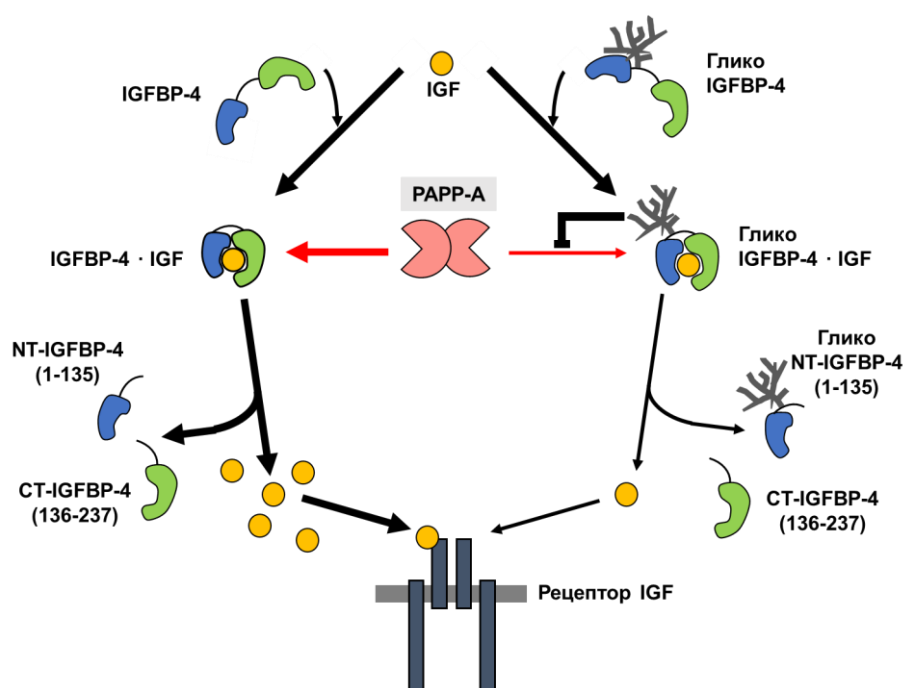


Рис. 14. Механизм влияния гликозилирования IGFBP-4 на биологическую активность IGF. Пояснения в тексте.

Считается, что IGFBP-4 модулирует активность IGF, образуя с ним комплекс и инактивируя его, в то же время увеличивая его устойчивость к деградации. IGF может связаться со специфическим рецептором только после расщепления IGFBP-4 с образованием NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4, не взаимодействующих с IGF. Единственным известным ферментом, осуществляющим специфический протеолиз IGFBP-4 между Met135 и Lys136, является RAPP-A.

Кроме негликозилированного IGFBP-4, RAPP-A-зависимому протеолизу также подвергается гликозилированная форма IGFBP-4. В подтверждение этого факта в ходе данной работы в крови был обнаружен гликозилированный NT-IGFBP-4. Однако, как было нами показано, наличие гликозилирования препятствует RAPP-A-зависимому протеолизу IGFBP-4. Присутствие гликана в составе молекулы IGFBP-4 замедляет ее протеолиз под действием RAPP-A примерно в 4 раза. Таким образом, IGF, связанный в комплексе с гликозилированным IGFBP-4, является, по-видимому, менее доступным для взаимодействия с рецептором и может формировать некий инактивированный пул. Изучение физиологической роли ингибирования RAPP-A-зависимого протеолиза гликозилированного IGFBP-4 является предметом дальнейших исследований.

ВЫВОДЫ

1. В ходе работы были получены рекомбинантные аналоги NT-IGFBP-4, CT-IGFBP-4 и IGFBP-4, по своим иммунохимическим свойствам схожие с эндогенными белками;
2. Были изучены иммунохимические и биохимические свойства эндогенных NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4, выделенных из плазмы крови пациентов с острым коронарным синдромом. Было показано, что данные белки не подвергаются протеолитической деградации в кровотоке, и их неоэпитопы остаются доступными для взаимодействия со специфическими антителами;
3. Впервые было показано, что в плазме крови присутствует гликозилированный NT-IGFBP-4¹⁻¹³⁵ (17260 Да), содержание которого составляет в среднем 15,6% от общего количества NT-IGFBP-4;
4. Было показано, что гликозилирование NT-IGFBP-4 не влияет на его взаимодействие со специфическими моноклональными антителами, используемыми для определения концентрации NT-IGFBP-4 в крови;
5. В экспериментах *in vitro* было показано, что RAPP-A-зависимый протеолиз гликозилированной формы IGFBP-4 менее эффективен, чем протеолиз негликозилированной формы IGFBP-4. Эти результаты согласуются с полученными в ходе исследования данными о том, что в плазме крови доля гликозилированного NT-IGFBP-4 в общем содержании NT-IGFBP-4 в $3,8 \pm 1,1$ раза ниже, чем доля гликозилированного IGFBP-4 в общем содержании IGFBP-4.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах Scopus, WoS, RSCI:

1. **Konev A.A.**, Smolyanova T.I., Kharitonov A.V., Serebryanaya D.V., Kozlovsky S.V., Kara A.N., Feygina E.E., Katrukha A.G., Postnikov A.B. Characterization of endogenously circulating IGFBP-4 fragments - Novel biomarkers for cardiac risk assessment. Clin. Biochem., 2015, 48, p. 774-780. **Impact Factor Scopus (IF) – 2,6**
2. **Konev A.A.**, Serebryanaya D.V., Koshkina E.V., Rozov F.N., Filatov V.L., Kozlovsky S.V., Kara A.N., Katrukha A.G., Postnikov A.B. Glycosylated and non-glycosylated NT-IGFBP-4 in circulation of acute coronary syndrome patients. Clin. Biochem., 2018, 55, p. 56-62. **IF – 2,6**
3. **Konev A.A.**, Kharitonov A.V., Rozov F.N., Altshuler E.P., Serebryanaya D.V., Lassus J., Harjola V.P., Katrukha A.G., Postnikov A.B. CT-IGFBP-4 as a novel prognostic biomarker in acute heart failure. ESC Heart Failure, 2020 7(2), p. 434-444. **IF – 3,9**

Тезисы докладов и материалы конференций:

4. **Konev A.A.**, Postnikov A.B., Smolyanova T.I., Tamm N.N., Kharitonov A.V., Serebryanaya D.V., Kozlovsky S.V., Kara A.N., Katrukha A.G. Investigation of immunochemical and biochemical properties of circulating IGFBP-4 fragments - novel biomarkers for cardiac risk assessment. Clin. Chem., 2013, 59 (10, Supplement), p. A228.
5. **Konev A.A.**, Postnikov A.B., Seferian K.R., Koshkina E.V., Katrukha A.G. N-glycosylation of NT-IGFBP-4 does not influence its immunodetection by the neo-epitope specific sandwich immunoassay. Clin. Chem., 2016, 62 (10, Supplement), p. S23.
6. **Konev A.A.**, Postnikov A.B., Serebryanaya D.V., Koshkina E.V., Kozlovsky S.V., Kara A.N., Katrukha A.G. N-glycosylated IGFBP-4 could be less susceptible to PAPP-A mediated proteolysis than the non-glycosylated form. Clin. Chem. and Lab. Med., 2016, 54 (9, Supplement), p. eA283.
7. **Конеv A.A.**, Постников А.Б., Катруха А.Г. Гликозилирование белка IGFBP-4 ингибирует его специфическое расщепление под действием протеазы PAPP-A. Материалы международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития», 2017, т.1, с. 64-65.

8. Postnikov A.B., **Konev A.A.**, Kharitonov A.V., Datskevich P.N., Rozov F.N., Lassus J., Harjola V.P., Katrukha A.G. C-terminal fragment of IGFBP-4 is independently associated with mortality in patients hospitalized due to acute heart failure. *European Journal of Heart Failure*, 2018, 20 (S1), p. 466.