

ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ВИМЕНТИНА И ЕГО ЦИТРУЛЛИНИРОВАННОГО АНАЛОГА КАК АНТИГЕНА РАННЕГО РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА

Г.В. Кожух¹, А.П. Власов¹, Д.В. Шубенок¹, Л.Л. Ильина¹, Д.А. Русанович¹, Н.А. Мартусевич², С.П. Марцев¹

¹Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий;

²Белорусский государственный медицинский университет

Виментин широко распространен в организме как белок цитоскелета различных типов клеток, таких как клетки мезенхимы и эндотелия, фибробласты, остеоциты и присутствует также в синовиальной жидкости сустава, где является субстратом цитруллинирования — реакции дезамидирования остатков аргинина под действием фермента пептидиларгининдеиминазы (ПАД). В норме эта реакция не приводит к формированию аутоантител благодаря феномену иммунологической толерантности. Однако в случае срыва иммунологической толерантности под действием факторов генетической или иной природы цитруллинирование виментина превращает его в триггер аутоиммунного процесса через индукцию аутоантител [1], что инициирует патогенез ревматоидного артрита (РА). В связи с этим антитела к цитруллинированному виментину представляют собой диагностически значимый маркер раннего РА, а сам цитруллинированный белок — один из основных инструментов диагностики [2]. Антитела против цитруллинированного виментина высокоспецифичны для РА и выявляются в сыворотке крови задолго до появления ревматоидного фактора [2, 3], что дает возможность ранней диагностики РА как условия наиболее успешной терапии.

Материал и методы. Основой для создания плазмиды, кодирующей рекомбинантный виментин, послужил вектор pET-22b («Novagen»). Ген, кодирующий виментин человека (1–466 а.к.), амплифицировали, используя в качестве матрицы кДНК полноразмерного виментина человека, клонированную в родительский вектор pCMV6-XL5 («OriGene Technologies», США). Амплификация проводилась по стандартному протоколу, включающему 30 циклов полимеразной цепной реакции. Амплифицированный участок ограничивался прямым праймером, содержащим сайт рестрикции *NdeI*, и обратным праймером с сайтом *NotI*. По данным сайтам фрагмент в дальнейшем встраивали в экспрессионный вектор pET-22b.

Амплифицированная нуклеотидная последовательность, кодирующая виментин человека, была лигирована в клонирующий вектор pJET1/blunt по тупым концам. Трансформированные плазмидой pJET1-виментин бактериальные клетки *E. coli* штамма JM 107 выращивались в LB среде, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, при температуре 37°C в течение 16 ч. Затем из клеток с использованием коммерческих наборов фирмы «Qiagen» (США) была выделена плаزمиды, содержащая ген целевого белка. Плазмиды обрабатывались ре-

стрикционными эндонуклеазами *NdeI* и *NotI* в течение 16 ч при температуре 37°C, а затем очищалась на 2%-м агарозном геле. Для создания липких концов экспрессионный вектор pET-22b обрабатывали парой рестриктаз (*NdeI* и *NotI*). Рестрикционные фрагменты и вектор для клонирования лигировали с помощью ДНК-лигазы фага T4. Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки штамма BL-21(DE3). Селекцию позитивных колоний, несущих целевую плазмиду, осуществляли в среде, содержащей ампициллин в концентрации 100 мг/л. Верификацию клонированного фрагмента, кодирующего виментин, осуществляли рестрикционным анализом и прямым секвенированием по Сэнгеру.

Ферментативную конверсию мутированного виментина в его цитруллинированную форму (МЦВ) проводили с помощью фермента ПАД при pH 7,4–8,0 в 50 мМ Трис-НСl буфере, содержащем 1 мг ПАД и 0,35 мг виментина, 8 мМ CaCl₂, 0,5 мМ дитиотреитола в течение ночи при 37°C. Реакция останавливалась добавлением в реакционную смесь ЭГТА (pH 8,0) до конечной концентрации 50 мМ.

Результаты и их обсуждение. Виментин, выделенный из синовиальной жидкости суставов пациентов с РА, имел 2 мутации Gly→Arg в положениях 16 и 59 полипептидной цепи [1], в связи с чем нами проведен мутагенез гена виментина человека по нуклеотидным позициям 46 и 175. Это обеспечило указанные замены глицина на аргинин и увеличило количество сайтов цитруллинирования в структуре рекомбинантного виментина.

Полученный ген мутированного виментина был клонирован в вектор pJET1 и переклонирован в полилинкер экспрессионного вектора pET-22b по сайтам рестрикции *NdeI* и *NotI*. Данная генная конструкция позволяет при трансляции получить полипептид, который по аминокислотной последовательности соответствует мутированному виментину человека с дополнительным метионином на N-конце, Ala-Ala-(His)₆ на C-конце и с общей молекулярной массой 54 кДа.

Система экспрессии создана на основе штамма *E. coli* BL21(DE3) и плазмидной ДНК pET-22b-виментин-16,59. Индукция транскрипции достигалась добавлением в среду изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до 1 мМ. Полученный штамм-продуцент синтезировал целевой полипептид с высоким уровнем экспрессии (70 мг белка на 1 л культуральной среды) в составе телец включения, в которых виментин составлял 60–80% суммарного белка.

Разработан протокол ренатурации/рефолдинга и хроматографической очистки белка с использованием металл-хелатной хроматографии на сорбенте Ni-NTA-сефарозе («Qiagen»), на который наносили солиобилизованный денатурантом материал из телец включения. После промывки сорбента и смены денатуранта на 8 М мочевины целевой белок либо элюировался 0,2 М имидазолом в денатуранте с последующей ренатурацией путем градиентного или ступенчатого уменьшения концентрации денатуранта, либо был фолдирован непосредственно на колонке в условиях градиентного снижения концентрации мочевины с последующей элюцией 0,2 М имидазолом в отсутствие денатуранта. В результате получен виментин в компактной нативной конформации с содержанием белка не менее 95%.

Гомогенность рекомбинантного виментина доказана аналитической хроматографией на колонке (10×300 мм) с носителем Tricorn Superdex 200 («GE Healthcare») в денатурирующих условиях (8 М мочевины). Виментина элюирован одним симметричным пиком с кажущейся молекулярной массой 53,5 кДа. Такой же результат получен при электрофорезе в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. При этом результат не изменялся в условиях добавления либо отсутствия восстанавливающего дисульфидные группы агента — 2% β-меркаптоэтанола, что указывает на отсутствие межмолекулярных взаимодействий, возникающих в результате «неправильно» замкнутых дисульфидных связей. При гель-электрофорезе в «нативных» условиях белок демонстрирует одну четко сформированную полосу и отсутствие межмолекулярных ассоциатов.

Мономерный виментин, как и многие другие белки филаментов, имеет центральный α-спиральный домен, ограниченный с обоих концов малоупорядоченными терминальными доменами [4]. Мономеры склонны к формированию суперспирального димера, который является базовой структурной единицей олигомеров виментина [5]. При низкой ионной силе (5 мМ Трис-НСl или 2 мМ фосфат натрия) виментин образует тетрамерные комплексы, тогда как повышение ионной силы приводит к дальнейшему объединению тетрамеров в большие по размерам комплексы. Эта тенденция к межмолекулярной ассоциации значительно усложняет исследование конформации и стабильности виментина. Одним из методов, относительно толерантных к динамике олигомеризации, является флуоресцентная спектроскопия.

Конформацию и стабильность виментина анализировали по спектрам флуоресценции собственных флуорофоров белка, в число которых входит 13 остатков тирозина и 1 остаток триптофана. Флуоресценцию регистрировали при возбуждении светом с длиной волны 295 нм, что дает данные о микроокружении триптофана, и 280 нм (данные об окружении всех флуорофоров, то есть о глобальной третичной структуре белка). Локальное окружение Trp в условиях возрастающих концентраций денатуранта демонстрирует относительно низкую стабильность, претерпевая конформационный переход в диапазоне 2,5–4,0 М мочевины. В то же время, спектры эмиссии тирозинильных флуорофоров демонстрируют локальные либо субглобальные изменения конформации без глобального разворачивания третичной структуры виментина вплоть до концентрации мочевины 5 М. Особенность динамики виментина состоит в том, что его стабильность *in vitro* как белка ци-

тоскелета определяется в первую очередь не внутримолекулярными конформационными переходами, а межмолекулярными взаимодействиями, приводящими к формированию нерастворимых ассоциатов/филаментов. Динамика межмолекулярных взаимодействий виментина высокочувствительна к ионному составу и pH раствора, что необходимо учитывать как фактор критического значения при биотехнологических операциях с виментином, в особенности при ферментативном цитруллировании. Рекомбинантный виментин цитруллиновали *in vitro* с помощью фермента пептидиларгинин-деиминазы (ПАД). Учитывая ограниченную доступность и высокую стоимость коммерческих препаратов фермента, и исходя из направленности работы на создание минимизированной по импортной составляющей технологии получения цитруллинированных белков и диагностических наборов, нами разработан метод выделения ПАД из скелетных мышц кролика и оптимизированы условия его применения. Количество цитруллинов в белке определяли методом [6], дающим окрашенный продукт при реакции цитруллина с 2,3 бутандион-монооксимом и антипирином в разбавленной (1:35) серной кислоте. Степень цитруллинирования виментина в оптимизированных условиях реакции достигала максимального значения 18,3%, что соответствует содержанию цитруллина в виментине, выделенном из синовиальной жидкости [1]. При такой степени модификации в среднем 8 из 45 остатков аргинина в виментине трансформированы в цитруллин. В наших условиях максимальная степень ферментативного цитруллинирования достигнута при 37°C, 10–12 ч инкубации в присутствии ионов Ca²⁺ и дитиотреитола при pH 7,4 и молярном соотношении фермента и виментина 5:3. Учитывая природную низкую удельную активность фермента и, как следствие, его высокое молярное содержание, отделение фермента после цитруллинирования проведено с помощью хроматографии на Ni-NTA-сефарозе, используя введенный в структуру виментина гексагистидиновый пептид.

Полученный цитруллинированный виментин подтвердил свою иммунокомпетентность в реакции с антицитруллиновыми антителами из сыворотки пациентов с верифицированным диагнозом ревматоидного артрита. Для этого цитруллинированный виментин был использован как иммобилизованный адсорбцией на полистироле антиген в разработанной нами иммуноферментной системе количественного определения антицитруллиновых антител. Макетные образцы иммуноферментной системы были сравнены с коммерчески доступными наборами производства Orgentec (Германия) и показали сходство по основному критерию — способности выявлять сыворотки с повышенным содержанием антицитруллиновых антител. Одновременно выявлена необходимость адаптации разработанной тест-системы к определению в присутствии в сыворотках пациентов с развитой формой РА интерферирующих анти-IgG антител; к ним относится, в частности, ревматоидный фактор. Трансформация макетной тест-системы в диагностический набор требует дальнейших работ по адаптации к реальным условиям иммуноферментной диагностики РА и, с другой стороны, к требованиям стабильно функционирующей технологии производства набора, что является предметом дальнейшего развития.

DESIGN AND STUDY OF HUMAN RECOMBINANT VIMENTIN AND ITS CITRULLINATED COUNTERPART AS AN ANTIGEN OF EARLY RHEUMATOID ARTHRITIS

G.V. Kozhukh, A.P. Vlasov, D.V. Shubenok, L.L. Il'ina, D.A. Rusanovich, N.A. Martusevich, S.P. Martsev

The major goal of this study was to obtain citrullinated vimentin that would be immunochemically identical to the protein recently isolated from a synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis (RA). The procedure of obtaining recombinant vimentin and its citrullinated counterpart is described. When employed as a solid-phase capture antigen in our design of enzyme immunoassay, mutated citrullinated vimentin was fully competent in reaction with autoantibodies from serum of patients with verified early or advanced RA. The results demonstrate that citrullinated recombinant vimentin might provide a key reagent to design immunoassays with the potential for reliable diagnostics of early RA.

Литература

1. Mutation and citrullination modifies vimentin to a novel autoantigen for rheumatoid arthritis / H. Bang [et al.] // *Arthritis Rheum.* — 2007. — Vol. 56, № 8. — P. 2503–2511.
2. Egerer, K. The serological diagnosis of rheumatoid arthritis: antibodies to citrullinated antigens / K. Egerer, E. Feist, G.-R. Burmester // *Dtsch Arztebl Int.* — 2009. — Vol. 106, № 10. — P. 159–163.
3. van Venrooij, W.J. Anticitrullinated protein/peptide antibody and its role in the diagnosis and prognosis of early rheumatoid arthritis / W.J. van Venrooij, J.M. Hazes, H. Visser // *Neth. J. Med.* — 2002. — Vol. 60, № 10. — P. 383–388.
4. Katsumoto, T. The role of the vimentin intermediate filaments in rat 3Y1 cells elucidated by immunoelectron microscopy and computer-graphic reconstruction / T. Katsumoto, A. Mitsushima, T. Kurimura // *Biol. Cell.* — 1990. — Vol. 68, № 2. — P. 139–146.
5. Assembling an intermediate filament network by dynamic cotranslation / L. Chang [et al.] // *J. Cell Biol.* — 2006. — Vol. 172, № 5. — P. 747–758.
6. Vassef, A.A. Direct micromethod for colorimetry of serum ornithine carbamoyltransferase activity, with use of a linear standard curve / A.A. Vassef // *Clin. Chem.* — 1978. — Vol. 24, № 1. — P. 101–107.