

Биохимическая и функциональная характеристика рекомбинантного белка CD40L-Adiponectin

Научный руководитель – Филатов Александр Васильевич

Михайлов А.А.¹, Гусева П.П.², Бязрова М.Г.³, Сухова М.М.⁴, Филатов А.В.⁵

1 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра иммунологии, Москва, Россия, *E-mail: artem.mihaylov.2001@mail.ru*; 2 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра иммунологии, Москва, Россия, *E-mail: guseva-2004@mail.ru*; 3 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра иммунологии, Москва, Россия, *E-mail: mbyazrova@list.ru*; 4 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра иммунологии, Москва, Россия, *E-mail: mary.sukhova13@gmail.com*; 5 - Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, Россия, *E-mail: filatov_andrey_@mail.ru*

В-лимфоциты играют важную роль в развитии адаптивного иммунного ответа. Активация В-лимфоцитов происходит при взаимодействии с Т-фолликулярными хелперами в вторичных лимфоидных органах. Ключевым событием этого процесса является образование комплекса CD40-CD40L. Процесс активации В-лимфоцитов изучают с помощью олигомеризованных рекомбинантных белков с рецепторным доменом CD40L [1].

Нами была получена конструкция гибридного белка CD40L-Adiponectin, в которой N-конец рецепторного домена CD40L (а.о. 116–261) был слит с C-концом коллагеноподобного домена адипонектина (а.о. 18–111). Коллагеноподобный домен адипонектина выполнял функцию олигомеризации конструкции. Адипонектин склонен к образованию тримерных, гексамерных и олигомерных форм. При этом олигомеризация происходит за счет формирования дисульфидных связей между тримерами [2].

Генетическую последовательность CD40L-Adiponectin клонировали в экспрессионный вектор и продуцировали белок в клетках НЕК293. Выделение осуществляли с помощью металл-аффинной хроматографии. Затем была проведена биохимическая характеристика CD40L-Adiponectin с помощью электрофоретических методов и эксклюзионной гель-хроматографии. Большая доля белка в ДСН-ПААГ-электрофорезе в восстанавливающих условиях мигрировала в виде полосы с молекулярной массой 33 кДа, соответствующей мономеру. В невосстанавливающих условиях в дополнение к полосе, соответствующей мономеру, наблюдали мажорную полосу с молекулярной массой 75 кДа, которая соответствовала тримеру, и минорные полосы с молекулярной массой 98 кДа и 130 кДа, которые представляли олигомерные формы.

Эксклюзионную гель-хроматографию проводили на колонке Superose 6 10/300 GL (PBS, рН 7,4). На профиле элюции наблюдали два пика с кажущимися молекулярными массами 460 кДа (октадекамер) и 150 кДа (гексамер). В ходе препаративной гель-хроматографии были собраны фракции, соответствующие выявленным формам белка. Собранные фракции изучали с помощью электрофореза в нативных условиях. Таким методом была подтверждена разница в электрофоретической подвижности выделенных форм.

Ранее нами была разработана сенсорная клеточная линия с поверхностной экспрессией CD40, стабильно трансфицированная геном люциферазы под контролем NF-κB промотера [3]. К сенсорным клеткам добавляли белок CD40L-Adiponectin и фракции, собранные в ходе эксклюзионной гель-хроматографии, соответствующие гексамерной и октадекамерной формам белка. На следующий день оценивали активацию NF-κB с помощью люциферазного теста. Для всех образцов была выявлена дозозависимая активация NF-κB. Значения

полумаксимальной эффективной концентрации (EC_{50}) составили 427 нг/мл для исходного препарата CD40L-Adiponectin, 661 нг/мл для гексамерной формы и 7244 нг/мл для октадекамерной формы. Полученные данные свидетельствуют о том, что гексамерные формы вносят основной вклад в активацию NF- κ B при стимуляции CD40 с помощью белка CD40L-Adiponectin.

Таким образом, нами получен рекомбинантный белок CD40L-Adiponectin и проведена его биохимическая и функциональная характеристика. Полученные результаты расширяют понимание механизмов активации В-лимфоцитов.

Источники и литература

- 1) Haswell L. et al. Analysis of the oligomeric requirement for signaling by CD40 using soluble multimeric forms of its ligand, CD154 // Eur J Immunol. – 2001. – Т. 31. – №. 10. – С. 3094-3100.
- 2) Tsao T.S. et al. Role of disulfide bonds in Acrp30/adiponectin structure and signaling specificity. Different oligomers activate different signal transduction pathways // J. Biol. Chem. – 2003. – Т. 278. – №. 50. – С. 50810-50817.
- 3) Сухова М.М. и др. Линия сенсорных клеток для анализа активности препаратов CD40L // Иммунология. – 2025. – Т. 46. – №. 4. – С. 474-482.