

УДК 616-092

Выбор эффективного аффинного сорбента для выделения белков, обладающих сиалидазной активностью, из сыворотки крови человека

Суркова Р.С., Каширских Д.А., Собенин И.А., Орехов А.Н.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»
125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8.

Целью исследования было определить эффективный аффинный сорбент для выделения белков, обладающих сиалидазной активностью, из сыворотки крови человека.

Материалы и методы. Для получения белков, обладающих сиалидазной активностью, было использовано четыре аффинных сорбента: 1) иммобилизованная на агарозе трисиаловая кислота Neu5Ac(α2-8)Neu5Ac(α2-8)Neu5Ac, 2) иммобилизованный на агарозе дериват сиаловой кислоты (Neu5Ac)₃-C3-PAA-biot, 3) иммобилизованный на агарозе дериват сиаловой кислоты 5-амино-Neu2en, 4) иммобилизованный на агарозе дериват сиаловой кислоты 4-амино-Neu5Ac2en. Выделение белков, ответственных за десалирование липопротеидов низкой плотности (ЛНП), проводили с помощью электрофореза в градиентном полиакриламидном геле.

Результаты. Показано, что наиболее эффективно связывает белки, обладающие нейраминидазной активностью, сорбент с (Neu5Ac)₃-C3-PAA-biot. При проведении электрофореза полученных элюатов выделяются белки с молекулярной массой 65 и 116 кДа.

Ключевые слова: аффинная хроматография; сиалидазная активность; атеросклероз; липопротеиды низкой плотности.

Для цитирования: Суркова Р.С., Каширских Д.А., Собенин И.А., Орехов А.Н. Выбор эффективного аффинного сорбента для выделения белков, обладающих сиалидазной активностью, из сыворотки крови человека. Патогенез. 2023; 21(3): 43-45.

DOI: 10.25557/2310-0435.2023.03.43-45

Для корреспонденции: Суркова Раиса Сергеевна, e-mail: raisasurkova850@gmail.com.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (Грант № 20-15-00264).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 29.05.2023

Selection of an effective affinity sorbent for the isolation of proteins with sialidase activity from human blood serum

Surkova R.S., Kashirskkh D.A., Sobenin I.A., Orekhov A.N.

Institute of General Pathology and Pathophysiology,
Baltiiskaya St. 8, Moscow 125315, Russian Federation

The aim of the study was to determine an effective affinity sorbent for isolating proteins with sialidase activity from human blood serum.

Materials and methods. Four affinity sorbents were used to obtain proteins with sialidase activity: 1) Neu5Ac(α2-8)Neu5Ac(α2-8)Neu5Ac trisialic acid immobilized on agarose, 2) sialic acid derivative (Neu5Ac)₃-C3-PAA-biot immobilized on agarose, 3) sialic acid derivative immobilized on agarose 5- amino-Neu2en, 4) agarose-immobilized sialic acid derivative 4-amino-Neu5Ac2en. Isolation of the proteins responsible for LDL desiallation was performed using gradient polyacrylamide gel electrophoresis.

Results. The sorbent with (Neu5Ac)₃-C3-PAA-biot most effectively binds proteins with neuraminidase activity. During electrophoresis of the obtained eluates, proteins with a molecular weight of 65 and 116 kDa are isolated.

Key words: affinity chromatography; sialidase activity; atherosclerosis; low density lipoproteins.

For citation: Surkova R.S., Kashirskkh D.A., Sobenin I.A., Orekhov A.N. [Selection of an effective affinity sorbent for the isolation of proteins with sialidase activity from human blood serum]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2023; 21(3): 43-45. (in Russian)

DOI: 10.25557/2310-0435.2023.03.43-45

For correspondence: Surkova Raisa Sergeevna, e-mail: raisasurkova850@gmail.com

Funding. This work was supported by the Russian Science Foundation (Grant #20-15-00264).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received: 29.05.2023

Введение

Атеросклероз — многофакторное заболевание, при котором происходит развитие дегенеративных изменений в стенках крупных артерий с последующей окклюзией просвета сосудов и ограничением кровоснабжения жизненно важных органов, таких как сердце, поч-

ки, головной мозг [1, 2]. Данное заболевание является причиной развития инфаркта миокарда и обуславливает не менее 50% смертности в России.

Начальным проявлением атеросклероза на уровне клеток артериальной стенки является накопление вну-

триклеточных липидов, вызываемое циркулирующими модифицированными липопротеидами низкой плотности (ЛНП) [3]. Самой ранней известной модификацией липопротеидов является десиалирование – потеря терминальной сиаловой кислоты в биантенных полисахаридных цепях апобелка. Существует обоснованное предположение, что десиалирование ЛНП *in vivo* является результатом ферментативной модификации [4]. Ранее было установлено, что сыворотка крови больных атеросклерозом зачастую обладает сиалидазной и транс-сиалидазной активностью [5]. Однако точный механизм образования модифицированных (десиалированных) атерогенных ЛНП до сих пор не установлен.

Изучение природы сиалидазной активности сыворотки крови человека необходимо для получения новых знаний о молекулярных и клеточных механизмах атерогенеза, важных для разработки новых подходов к диагностике, профилактике и лечению атеросклероза [6]. В этом контексте **целью нашей работы** стал подбор наиболее эффективного аффинного сорбента для выделения из сыворотки крови человека белков, обладающих сиалидазной активностью.

Материалы и методы исследования

В качестве биологического материала для выделения белков, потенциально ответственных за десиалирование ЛНП, использовали сыворотки крови больных ишемической болезнью сердца. Образцы сывороток были получены из лаборатории клинической биохимии Института клинической кардиологии имени А.Л. Мясникова ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова, как неутрализованные остатки после выполнения рутинных биохимических анализов.

Образцы для исследования эффективности аффинных сорбентов были отобраны после измерения сиалидазной активности в пробах сыворотки крови от пациентов с ишемической болезнью сердца. В качестве контроля для аффинной хроматографии был отобран образец, не обладающий сиалидазной активностью.

Проводили скрининг образцов на наличие значимой сиалидазной активности с использованием коммерческих наборов Abcam ab138888 Neuraminidase Assay Kit Fluorimetric-Blue (Abcam, США).

Для выделения белков, потенциально ответственных за десиалирование ЛНП, были изготовлены следующие аффинные сорбенты:

- иммобилизованная на агарозе трисиаловая кислота Neu5Ac(α 2-8)Neu5Ac(α 2-8)Neu5Ac (**рис. 1, А**);
- иммобилизованный на агарозе дериват сиаловой кислоты (Neu5Ac α)₃-C3-РАА-biot (**рис. 1, А**);
- иммобилизованный на агарозе дериват сиаловой кислоты 5-amino-Neu2en (**рис. 1, Б**);
- иммобилизованный на агарозе дериват сиаловой кислоты 4-amino-Neu5Ac2en (**рис. 1, В**);

На колонку с аффинным сорбентом наносили 1 мл образца (сыворотки крови) и промывали 20 мл фосфатного буферного раствора (рН 7,0) для удаления несвязавшихся белков. Дополнительно колонку промывали 5 мл 1М NaCl в изотоническом фосфатном буфере (рН 7,0) для удаления неспецифически связавшихся белков. Связавшиеся с аффинным сорбентом белки элюировали 1 мл 50 мМ сиаловой кислоты в фосфатном буферном растворе и собирали фракции элюата по 300 мкл.

Для выделения белков, обладающих сиалидазной активностью, из элюатов, полученных при проведении аффинной хроматографии, использовали метод электрофореза в градиентном полиакриламидном геле (3,5–13,0%) в денатурирующих условиях с последующей окраской Кумасси бриллиантовым синим R250.

Результаты исследования

При использовании выбранных сывороток крови человека была проведена оценка эффективности четырёх типов сорбентов для аффинной хроматографии белков, обладающих сиалидазной активностью. Оказалось, что сорбент с (Neu5Ac α)₃-C3-РАА-biot наиболее эффективно связывал белки, ответственные за десиалирование ЛНП, сорбент с трисиаловой кислотой Neu5Ac(α 2-8)Neu5Ac(α 2-8)Neu5Ac был существенно менее действе-

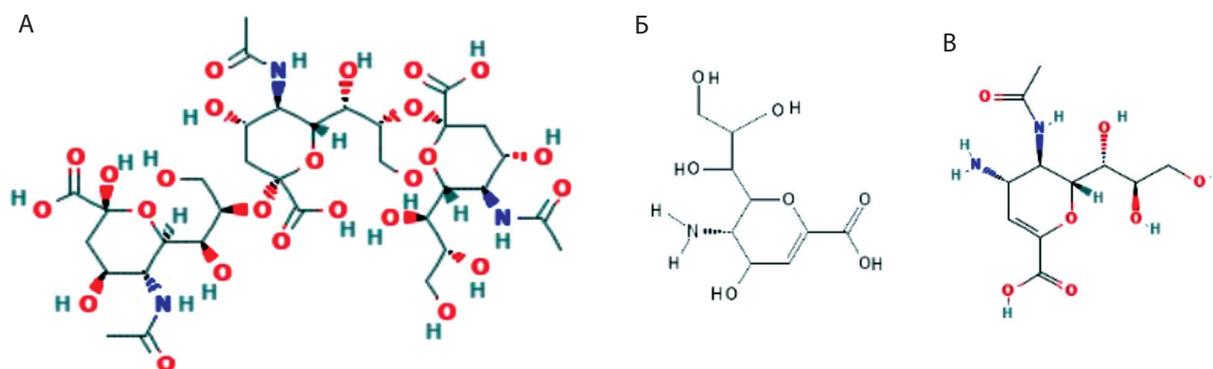


Рис. 1. Химические структуры лигандов, использованных для изготовления аффинных сорбентов. А – трисиаловая кислота Neu5Ac(α 2-8)Neu5Ac(α 2-8)Neu5Ac и (Neu5Ac α)₃-C3-РАА-biot; Б – дериват сиаловой кислоты 5-amino-Neu2en; В – дериват сиаловой кислоты 4-amino-Neu5Ac2en.

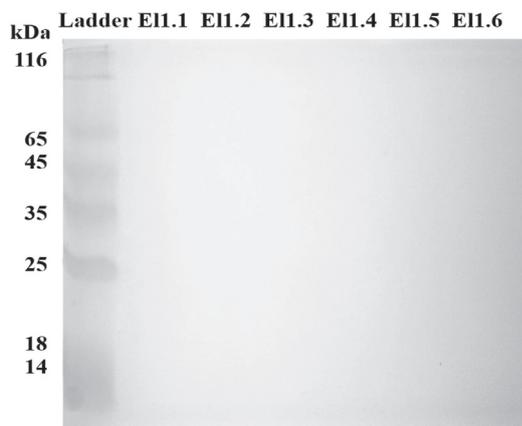


Рис. 2. Электрофорез в полиакриламидном геле при денатурирующих условиях элюатов, полученных после проведения аффинной хроматографии образца сыворотки крови без сиалидазной активности. Дорожки E11.1-E11.6 обозначают номер пробирки с образцом элюата после нанесения на колонку (сорбент с $(\text{Neu5Ac}\alpha)_3\text{-C3-PAA-biot}$) 1 мл 50 мМ сиаловой кислоты.

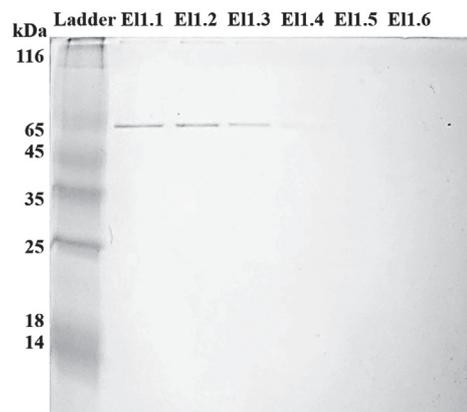


Рис. 3. Электрофорез в полиакриламидном геле при денатурирующих условиях элюатов, полученных после проведения аффинной хроматографии образцов сыворотки крови, обладающих сиалидазной активностью. Дорожки E11.1-E11.6 обозначают номер пробирки с образцом элюата после нанесения на колонку (сорбент с $(\text{Neu5Ac}\alpha)_3\text{-C3-PAA-biot}$) 1 мл 50 мМ сиаловой кислоты.

нен, а сорбенты с 4-amino-Neu5Ac2ep и с 5-amino-Neu2ep не были способны связывать нейраминидазы.

Следует отметить, что при нанесении на колонку образца контрольной пулированной сыворотки без сиалидазной активности связывания каких-либо белков с аффинным гелем не происходило (рис. 2).

В последующих экспериментах для аффинного выделения белков, потенциально обладающих нейраминидазной активностью, использовали сорбент с $(\text{Neu5Ac}\alpha)_3\text{-C3-PAA-biot}$.

При проведении электрофореза элюатов, полученных после аффинной хроматографии образцов сыворотки крови, удается, как правило, выделить фракции белков с молекулярной массой 65 и 116 кДа (рис. 3).

Заключение

Таким образом, в результате проведенного исследования было выявлено, что эффективным аффинным сорбентом для выделения белков, обладающих сиалидазной активностью, из сыворотки крови человека, является сорбент с $(\text{Neu5Ac}\alpha)_3\text{-C3-PAA-biot}$. При использовании данного сорбента были получены фракции белков с молекулярной массой 65 и 116 кДа.

Сведения об авторах:

Суркова Раиса Сергеевна — старший лаборант лаборатории ангиопатологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; <https://orcid.org/0000-0002-0620-224X>

Каширских Дмитрий Александрович — младший научный сотрудник лаборатории ангиопатологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; <https://orcid.org/0000-0002-0748-9238>

Собенин Игорь Александрович — доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории ангиопатологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; <https://orcid.org/0000-0003-0978-6444>

Орехов Александр Николаевич — профессор, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории ангиопатологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; <https://orcid.org/0000-0002-3318-4681>

Дальнейшая работа будет направлена на идентификацию выделенных белков с помощью методов tandem mass spectrometry и иммуноблоттинга с применением специфических антител к нейраминидазам млекопитающих.

Список литературы / References

- Kong P., Cui Z., Huang X., Zhang D., Guo R., Han M. Inflammation and atherosclerosis: signaling pathways and therapeutic intervention. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2022; 7(1): 131. DOI: 10.1038/s41392-022-00955-7
- Marchio P., Guerra-Ojeda S., Vila J.M., Aldasoro M., Victor V.M., Mauricio M.D. Targeting Early Atherosclerosis: A Focus on Oxidative Stress and Inflammation. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019; 2019: 8563845. DOI: 10.1155/2019/8563845
- Back M., Yurdagul A., Tabas I., Oorni K., Kovanen P. Inflammation and its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cardiol.* 2019; 16(7): 389-406. DOI: 10.1038/s41569-019-0169-2
- Zhang C., Chen J., Liu Y., Xu D. Sialic acid metabolism as a potential therapeutic target of atherosclerosis. *Lipids. Health. Dis.* 2019; 18(1): 173. DOI: 10.1186/s12944-019-1113-5
- Yang A., Gyulay G., Mitchell M., White E., Trigatti B. L., Igdoura S. A. Hypomorphic sialidase expression decreases serum cholesterol by downregulation of VLDL production in mice. *J. Lipid. Res.* 2012, 53(12): 2573–2585. DOI: 10.1194/jlr.M027300
- Summerhill V.I., Grechko A.V., Yet S.F., Sobenin I.A., Orekhov A.N. The atherogenic role of circulating modified lipids in atherosclerosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20(14): 3561. DOI: 10.3390/ijms20143561