

Получение гликозилированного и негликозилированного рекомбинантного IGFBP-4 и исследование некоторых его иммунохимических и биохимических свойств

Научный руководитель – Конев Алексей Александрович

Руденко Полина Андреевна

Студент (бакалавр)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра биохимии, Москва, Россия

E-mail: polinarude@yandex.ru

IGFBP-4 - белок, связывающий инсулиноподобный фактор роста (IGF), - присутствует в крови и препятствует взаимодействию IGF с рецептором клетки-мишени [2]. Под действием металлопротеазы PAPP-A IGFBP-4 расщепляется по специфическому участку между остатками 135 и 136, в результате чего IGF активируется. IGFBP-4 в крови представлен двумя формами: гликозилированной по остатку Asn104 и негликозилированной. Известно, что гликозилирование IGFBP-4 затрудняет его протеолиз под действием PAPP-A, что может быть одним из механизмов регуляции активности IGF [1]. Однако исследование протеолиза IGFBP-4 на эндогенном белке затруднительно из-за сложности его выделения. Моделью для исследования протеолиза IGFBP-4 мог бы стать его рекомбинантный аналог.

Целью данной работы было получение гликозилированной и негликозилированной форм рекомбинантного IGFBP-4 и изучение их иммунохимических и биохимических свойств.

Для экспрессии IGFBP-4 клонировали кДНК гена в вектор pсDNA3.1-Hygro(+) и трансфицировали полученной конструкцией клетки культуры Epx1293F. IGFBP-4 из культуральной среды выделяли методом аффинной хроматографии на носителе с иммобилизованными моноклональными антителами. Для разделения гликозилированной и негликозилированной форм IGFBP-4 использовали носитель с иммобилизованным лектином-конканавалином А. Состав фракций, полученных в ходе проведения хроматографий, анализировали методами SDS-электрофореза и иммуноблоттинга. Для изучения иммунохимических свойств рекомбинантного IGFBP-4 сравнивали, как гликозилированная и негликозилированная формы белка взаимодействуют с антителами, эпитопы которых находятся рядом с сайтом гликозилирования и на расстоянии от него. Влияние гликозилирования рекомбинантного IGFBP-4 на эффективность его протеолиза под действием PAPP-A определяли, сравнивая скорость расщепления гликозилированного и негликозилированного IGFBP-4.

При выделении белка из кондиционированной среды получили 38 мг тотального IGFBP-4, при разделении гликозилированного и негликозилированного IGFBP-4 получили 0,1 и 14,6 мг белка соответственно. Результаты экспериментов показали, что гликозилирование рекомбинантного IGFBP-4 не влияет на его связывание с антителом IBP180. Протеолиз негликозилированного рекомбинантного IGFBP-4 под действием PAPP-A идет в 4,5 раза активнее, чем гликозилированного.

Таким образом, гликозилирование рекомбинантного IGFBP-4 не влияет на его связывание с антителами, специфичными к эпитопам, находящимся вблизи области гликозилирования. Гликозилированная форма рекомбинантного IGFBP-4 более устойчива к протеолизу металлопротеазой PAPP-A.

Источники и литература

- 1) Oxvig C. The role of PAPP-A in the IGF system: location, location, location. J Cell Commun Signal. 2015 Jun;9(2):177-87. doi: 10.1007/s12079-015-0259-9
- 2) Zhou R, Diehl D, Hoefflich A, Lahm H, Wolf E. IGF-binding protein-4: biochemical characteristics and functional consequences. J Endocrinol. 2003 Aug;178(2):177-93. Review.