

П.В.Погрібний, д-р мед.наук, проф.

Н.М.Грегірчак, канд. техн. наук

Є.С. Зайцева

P. Pogribniy,

N.Gregirchak.

Ye.Zayzheva

ВИДІЛЕННЯ І ОЧИСТКА БЕТА-ДЕФЕНСИНУ-2 ЛЮДИНИ
ISOLATION AND PURIFICATION OF HUMAN BETA-
DEFENSIN-2

Представлено результати експерименту за схемою виділення та очистки бета-дефенсину-2 людини із застосуванням афінної хроматографії. Показано, що препарат чистого hBD-2 було елюйовано в діапазоні концентрацій 40-70% ацетонітрила.

Ключові слова: бета-дефенсин-2 людини, антимікробні властивості.

The results of the experiment under the scheme isolation and purification of human beta-defensin-2 using affinity chromatography are presented. It was determined that the preparation of pure hBD-2 was desorbed with concentrations in the range of 40-70% acetonitrile.

Key words: human beta-defensin-2, antimicrobial properties.

Дефенсини людини є об'єктом інтенсивних досліджень, спрямованих на встановлення їх структури, біологічних функцій та особливостей експресії *in vivo* та *in vitro* в нормі та за умов патології, в тому числі онкопатології. Дефенсини було відкрито як антимікробні

пептиди, що мають широкий спектр дії щодо грампозитивних та грамнегативних бактерій, грибів та вірусів, які мають оболонку. У людини та інших ссавців антимікробні пептиди представлено двома головними сімействами – дефенсини та кателіцидини. Дефенсини представлені в усіх типах епітеліальних клітин ссавців, лімфоїдних клітинах, зокрема нейтрофілах та макрофагах, де їх вміст часто перевищує мілімолярні концентрації. Кателіцидини за своєю фізіологічною дією дуже подібні до дефенсинів, але відрізняються від останніх структурною організацією.

Усі антимікробні пептиди діють на широкий спектр мікроорганізмів, а також гриби та віруси. Тим самим, ці речовини складають важливий компонент неспецифічного природженого імунітету, функцією якого є миттєва відповідь на інфікування, затримка бактеріальної колонізації для формування та розвитку специфічної імунної відповіді, а також контроль над мікрофлорою [1].

Бета-дефенсин-2 людини (hBD-2) може впливати на систему адаптивного імунітету і прямо активувати дендритні клітини. Як речовини з потужними ад'ювантними властивостями, дефенсини можуть впливати на здатність адаптивної імунної системи впізнавати фрагменти білків клітин, у тому числі пухлинних. У зв'язку з цим вони можуть бути використані у клініці не тільки як антибіотики для поверхневого застосування, але і як компоненти протипухлинних вакцин [2].

Окрім основної антимікробної дії встановлено, що дефенсини володіють і іншими активностями. Дослідження останніх років показали, що дефенсини можуть приймати участь в функціонуванні імунної системи, регенерації тканин та туморогенезі. Дослідженнями кількох наукових груп було виявлено, що дефенсини можуть впливати на різні ланки імунної системи, підсилюють продукцію специфічних антитіл, викликають хемотаксис імунокомпетентних клітин та активують незрілі дендритні клітини, більш того, можуть стимулювати-пухлинний ангіогенез. У кількох дефенсинів виявлено хемокін-подібну активність та

встановлено, що вони є хемотактиками для моноцитів, тучних клітин, дендритних клітин та Т-клітин, тим самим здійснюючи зв'язок між системами природженого та адаптивного імунітету.

Таблиця 1

Пептидні антибіотики еукаріот

Пептиди	Особливості структури	Організм/тканина	Антимікробний спектр
Дефенсини рослин	4-дисульфід	Рослини	Гриби
α -дефенсини β -дефенсини	3-дисульфід, β -складки	Нейтрофіли та епітелій хребетних	Бактерії, гриби, оболонкові віруси
Дефенсини комах	3-дисульфід, α -спіраль та β -складки	Гемолімфа артроподів, моллюсків	Грам-позитивні бактерії
Деякі тіоніни (крабмін)	3- чи 4-дисульфід, 2 α -спіралі + β -складки	Рослини	Бактерії, гриби, клітини ссавців
Протегріни, тахіплезіни, поліфемезини	2-дисульфід, β -складки	Нейтрофіли свині, гемоцити краба	Бактерії, гриби, оболонкові віруси
Циклічний додекапептид (бактеницин-1), раналексин, бревінін	1-дисульфід, циклічні чи частково циклічні	Лейкоцити жуйних	Бактерії
Цекропіни, магаїнін, PGLa, LL-37	α -спіраль	Гемолімфа комах, шкіра амфібій, лейкоцити ссавців	Бактерії
Бактенецини 5 чи 7, PR-39, профенін, індоліцидін, діптерицин, апідецин, гістатин	Лінійні з повторними мотивами чи домінуючими амінокислотами	Лейкоцити ссавців, гемолімфа комах, слина людини	Бактерії, гриби

У ссавців основною родиною антимікробних пептидів є дефенсини. На основі структурних особливостей на генетичному і білковому рівнях, а саме за різницею в позиції цистеїнів і, відповідно, в положенні дисульфідних зв'язків дефенсини відносять до двох родин: α -

та β -дефенсинів. Між цими двома класами існує невелика ідентичність на рівні первинної послідовності, але вони подібні за просторовою структурою. Молекули різних дефенсинів складаються з 28-45 амінокислотних залишків, характеризуються наявністю шести інваріантно розташованих залишків цистеїну, що утворюють три внутришньомолекулярні дисульфідні зв'язки таким чином, що молекули дефенсинів формують β -складчасту структуру на протязі 10 амінокислотних залишків, та високим вмістом основних і гідрофобних амінокислот [3].

Пептиди родини дефенсинів було вперше виділено із альвеолярних макрофагів кроля, а невдовзі знайдено в нейтрофілах кроля, людини, щура і морської свинки. На сьогодні відомо 6 β -дефенсинів людини - hBD-1-6. У людини вперше β -дефенсин (hBD-1) було знайдено при аналізі великої кількості гемофільтрату. Потім послідовно hBD-1 було винайдено в сечі, епітелії нирок, підшлунковій залозі, слинних залозах, кон'юнктиві, слізних залозах, дихальних шляхах, жіночій сечостатевої системі, молочній залозі, зовнішньому слуховому каналі та в плаценті. Другий β -дефенсин, hBD-2, було ідентифіковано в псоріатичній шкірі як продукт кератиноцитів, а пізніше винайдено в інфікованій кон'юнктиві, епітелії дихальних шляхів, сечостатевої системі. Експресію hBD-3 було відмічено в серцевій тканині, скелетних м'язах, плаценті, ембріональному тимусі, шкірі, стравоході та гінгівальних кератиноцитах. Експресію hBD-4 було виявлено в епітелії дихальних шляхів, де вона зростала в 1,5-7 разів після інфекції *Pseudomonas aeruginosa* та *Streptococcus pneumoniae*. Найвищий рівень експресії hBD-4 спостерігається у передміхуровій залозі, дещо нижчий – в антральному відділі шлунка, матці, нейтрофілах, тироїдній залозі, легенях та нирках [4].

Спектр антимікробної активності та гістологічний розподіл дефенсинів

Дефенсин	Вид тварини	Тканина	Спектр активності
MCP-1, 2	Кріль	Макрофаги легень	Г+,Г-, гриби, обол.віруси
NP-1-5	Кріль	Нейтрофіли	Г+,Г-, гриби, обол.віруси
GNCP1-2	Морська свинка	Нейтрофіли	Г+,Г-, гриби, обол.віруси
RatNP 1-4	Пацюк	Нейтрофіли	Г+,Г-, гриби
HNP 1-4	Людина	Нейтрофіли	Г+,Г-, гриби, обол.віруси
Криптдини	Миша, пацюк	Клітини Панета	Г+,Г-, гриби, найпростійші
HD 5,6	Людина	Клітини Панета	Невідомо
BNBD 1-13	Велика рогата худоба	Нейтрофіли	Г+,Г-, гриби
TAP	Велика рогата худоба	Трахея	Г+,Г-, гриби
LAP	Велика рогата худоба	Язик	Г+,Г-, гриби
Галінацини; CNP, TNP	Курчата, індики	Гетерофіли	Г+,Г-, гриби
Дефенсини метеликів (в тому числі сапецин, форма А та В)	Метелики	Жирові тільця, гемолімфа, тромбоцитоди	Г+
Дефенсин скорпіона	Скорпіон	Гемолімфа	Г+
Роялізін	Бджоли	Гемолімфа	Г+

Примітка. Г+ - грампозитивні, Г- - грамнегативні бактерії

Таким чином, узагальнюючи наведені вище дані (табл.1-2), можна зробити висновок, що продукція пептидів з властивостями антимікробних речовин широкого спектру дії властива майже всім філогенетичним групам еукаріотів.

Метою даної роботи є виділення та очистка бета-дефенсину-2 людини, який експресується епітеліальними клітинами і характеризується широким спектром біологічної дії – від антимікробної

до хемотактичної.

Для трансформації, отримання плазмідних векторів та експресії білків використовувались штам *Escherichia coli* BL21DE3, наданий ІМБІГ НАНУ (Київ, Україна).

Бактеріальну культуру штаму *Escherichia coli* BL21DE3, трансформовану вектором рGEX-2T з клонованим фрагментом кДНК hBD-2, культивували в поживному середовищі Лур'є-Бертрані (LB), що містило г/л, NaCl – 10, бактотриптона – 10 та дріжджового екстракту - 5. 10 мл культури *E. coli* (10-12 год росту) вносили до 1 літра LB-середовища і культивували за температури 37°C до оптичної густини $OD_{610}=0.6$ при $\lambda=610$. Для індукції культури додавали 1М IPTG (до фінальної концентрації 1 мМ), після чого інкубували 7 год за температури 37°C. Клітини осаджували центригуванням (3000 об/хв) впродовж 20 хв. Селекцію та зберігання рекомбінантних колоній проводили на агаризованому середовищі LB, що містило 100 мкг/мл ампіциліну.

Для отримання лізату клітинний осад ресуспендували в лізуючому буфері. Проводили сонікацію (44 кГц, 6 разів по 15 с з інтервалами по 15 с) на ультразвуковому дезінтеграторі (UD-11 Automatic, Польща). Лізат освітлювали центрифугуванням (17000g) на центрифугі типу еппендорф (Eppendorf 5415C, США) та визначали концентрацію білка.

Для очистки GST-hBD-2 злитого білка з лізату бактеріальної культури застосовували афінну хроматографію з використанням колонки GSTrap (№17-5131-01, Amersham Biosciences) об'ємом 2 мл. Отриманий лізат бактеріальних клітин пропускали через колонку з розрахунку 9 мг тотального білка лізата на 1 мл сефарози. Для кращого зв'язування GST-злитого білку з носієм, колонку поміщали на шейкер на 1 год за температури +4°C. Після цього незв'язаний білок елюювали, колонку промивали 10 мл PBS-T буфером (20 мМ Tris-HCl, pH 7,5; 150 мМ NaCl; 1мкМ EDTA; 1% Triton x-100). Наступною стадією було

додавання тромбіну до злитого hBD-2-GST-білка. Для створення оптимальних умов протеолізу колонку промивали 4 мл протеолітичного буферу (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 150 mM NaCl; 2.5 mM CaCl₂, 0.1% β-меркаптоетанол). Протеоліз проводили в 4 мл протеолітичного буферу на ротаторі впродовж 12-14 год за температури +4°C. Тромбін додавали з розрахунку 1U на 1 мг GST-злитого білка, що зв'язався з носієм. Після тромболізу, елюат, що містив hBD-2 та залишки тромбіну, підкислювали трифтороцтовою кислотою до pH 3.5 та центрифугували (1500 об/хв) для видалення денатурованого білка. Подальше очищення препарату hBD-2 від домішок білків здійснювали методом зворотньофазової хроматографії. Отриманий зразок hBD-2 після тромболізу наносили на колонку і проводили ступінчасту елюцію в градієнті ацетонітрила, підкисленого до pH 2.5 (від 20 до 100% ацетонітрила). Всі фракції збирали та ліофільно висушували.

Для аналізу результатів індукції та очищення білків проводили електрофорез у вертикальних пластинах в системі буферів Леммлі в 7-22 % градієнтних поліакриламідних мінігелях товщиною 1 мм, використовуючи електрофоретичний прилад SE200 (Hoefler Scientific Instruments). Після закінчення електрофорезу гель виймали зі скляної форми і двічі нагрівали у розчині барвника (10% льодяна оцтова кислота, 45% метанол, 0,1-0,2% Coomassie R-250) до температури кипіння, після чого інкубували по 10 хв на шейкері. Надлишок барвника відмивали розчином для відмивки (5% льодяна оцтова кислота, 95% вода) 3-4 рази таким же чином (нагрівали до температури кипіння, давали відстоятися, зливали).

Для отримання в достатній кількості чистого рекомбінантного β-дефенсину-2 людини, що було експресовано в бактеріальних клітинах *E. coli* у вигляді GST- hBD-злитого білка була застосована методика, наведена вище.

Використані режими індукції бактеріальних клітин та схема їх

вирощування дозволили отримати злитий білок в кількості, що складає майже 25% від тотального білка клітин.

Для виділення злитого білка з лізату бактерій наносили на колонку з глутатіон-агарозою, після зв'язування GST-hBD-2 з носієм, було підібрано оптимальні режими тромболізу злитого білка. За результатами експерименту оптимальним режимом є обробка тромбіном з розрахунку 1 U тромбіну на 1 мг GST-злитого білку та тромболіз впродовж 10-12 год при +4°C.

Отриманий елюат містив рекомбінантний hBD-2 чистотою 70 – 80 %, та домішки тромбіну. Для повного очищення білка проводили зворотньофазову хроматографію, використовуючи систему Sep-Pack C18. В той час, як за низької концентрації ацетонітрилу було елюйовано домішки сторонніх білків, препарат чистого hBD-2 було елюйовано в діапазоні концентрацій 40 – 70 % ацетонітрила (рис. 1).

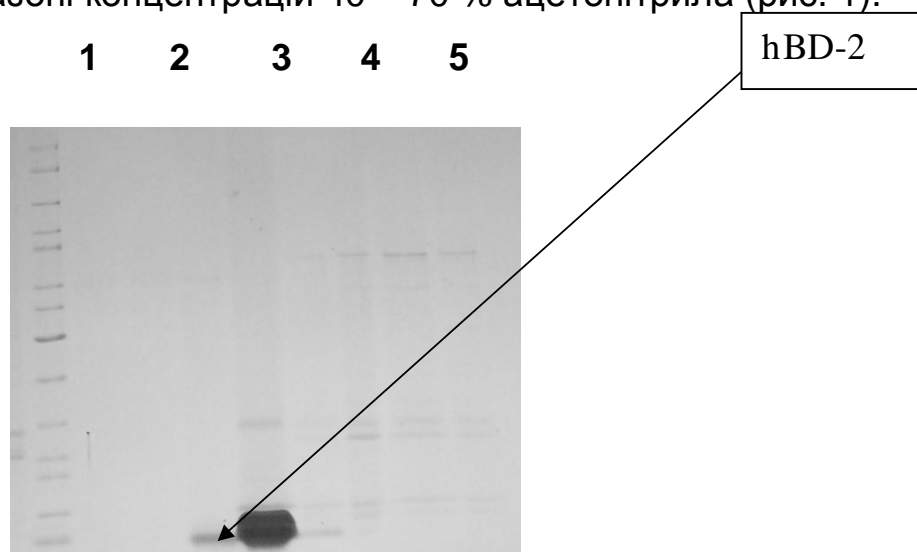


Рис.1 Електрофореграма фракцій елюату при очищенні рекомбінантного білку hBD-2 шляхом зворотньофазової хроматографії

1 - маркер молекулярних мас (PageRuler Protein Ladder, Fermentas, Литва);

- 2 - фракція, що була елюйована з колонки 30% ацетонітрилу;
- 3 - фракція, що була елюйована з колонки 40% ацетонітрилу;
- 4 - фракція, що була елюйована з колонки 70% ацетонітрилу;
- 5 - фракція, що була елюйована з колонки 100% ацетонітрилу.

Всі етапи очистки пептиду контролювали електрофоретично в градієнтному поліакріламідному гелі.

Висновки. З використанням методів афінної а зворотньофазової хроматографії оптимізовано схему очистки рекомбінантного бета-дефенсину-2. Препарат чистого hBD-2 було елюйовано в діапазоні концентрацій 40 – 70 % ацетонітрила. Схема отримання та очистки рекомбінантного пептиду дозволяє отримати приблизно 250 мкг чистого hBD-2 з 20 мг тотального білка лізату бактеріальних клітин *Escherichia coli*.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Izadpanah A.* Antimicrobial peptides // *J Am. Acad. Dermatol.* – 2005. – V. 52, № 3. – P. 381-387.
2. *Hoover D.M., Blumenthal R.P.,* The structure of human beta-defensin-2 shows evidence of higher order oligomerization. *J.Biol. Chem.* 2000, 275.
3. *Garcia JR, Krause A, Schulz S, Rodriguez-Jimenez FJ, Kluver E, Adermann K, Forssmann U, Frimpong-Boateng A, Bals R, Forssmann WG.* Human β -defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity// *The FASEB Journal* - 2001. – Vol.15, № 1.– P.1819-1821.
4. *Nishimura, Y. Abiko, Y. Kurashige, et al.* Effect of defensin peptides on eukaryotic cells: primary epithelial cells, fibroblasts and squamous cell carcinoma cell lines // *J. Dermatol. Sci.* – 2004. – V. 36, №2. – P. 87-95.

Надійшла до редколегії 22.10.2010 р.