

**Московский Государственный Университет
Им. М.В. Ломоносова
Биологический факультет
Кафедра биохимии**

**Исследование свойств и процессинга предшественника
натрийуретического пептида В (proBNP) человека**

Дипломная работа
студентки V курса
Карповой Н.С.
Научные руководители:
д.б.н. Катруха А.Г.,
аспирант Семёнов А.Г.

Москва
2008 г.

Оглавление

Список сокращений.....	4
Введение.....	6
Обзор литературы.....	8
Семейство натрийуретических пептидов.....	8
Открытие BNP.....	9
Структура гена BNP. Регуляция транскрипции.....	10
Синтез и процессинг proBNP.....	13
Рецепторы натрийуретических пептидов.....	19
Удаление натрийуретических пептидов из кровотока.....	20
Физиологическое действие BNP.....	22
<i>Физиологическое действие BNP на почки.....</i>	22
<i>Физиологическое действие BNP на сердечно-сосудистую систему.....</i>	23
Формы BNP в крови.....	23
Концентрация BNP в крови.....	24
Формы BNP в сердечной ткани.....	24
Клиническое значение BNP.....	25
Цели и задачи.....	28
Материалы и методы.....	29
Трансфекция эукариотических клеток.....	30
Конъюгация антител с хелатом европия ТЕКЕС.....	30
Флуороиммунный анализ сэндвич типа (сэндвич-ФИА).....	30
Определение концентрации proBNP методом сэндвич-ФИА.....	31
Гель-фильтрация.....	31
Аффинная хроматография.....	32
Ионообменная хроматография на системе FPLC.....	32
Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) в трис-трициновой буферной системе.....	33
Идентификация гликопротеинов в ПААГ с помощью GelCode Glycoprotein Staining Kit.....	33
Western blotting.....	33
Иммунохимическое окрашивание белков, иммобилизованных на нитроцеллюлозной мембране.....	34
Дегликозилирование proBNP.....	35
Идентификация белков с использованием метода усиленной хемилюминесценции (Enhanced Chemiluminescence, ECL).....	34
Экспрессия респроBNP в присутствии ингибитора фурина.....	35
Расщепление proBNP фурином in vitro.....	36
Результаты и обсуждения.....	37
Экспрессия рекомбинантного proBNP человека в эукариотических клеточных линиях.....	37
<i>Экспрессия рекомбинантного proBNP человека в эукариотической клеточной линии HEK 293.....</i>	37
<i>Анализ форм proBNP в кондиционированной среде клеток линии HEK 293, трансфицированных вектором pCMV/hproBNP, методом гель-фильтрации.....</i>	38
<i>Исследование биохимических и иммунохимических свойств респроBNP, экспрессированного в клеточной линии HEK 293.....</i>	41
<i>Сравнение иммунохимических свойств рекомбинантного proBNP со свойствами эндогенного proBNP.....</i>	43
<i>Иммунохимические свойства дегликозилированного респроBNP (HEK 293).....</i>	46
<i>Иммунохимическое окрашивание респроBNP (HEK 293) до и после дегликозилирования.....</i>	48

<i>Иммунохимические свойства recproBNP, экспрессированного в различных эукариотических клеточных линиях</i>	49
<i>Исследование иммунохимических свойств NT-proBNP, полученных при процессинге proBNP, экспрессированного в клеточных линиях HEK 293, CHO-K1 и NIH 3T3</i>	51
<i>Уровень процессинга recproBNP при экспрессии в клеточных линиях HEK 293, CHO-K1 и NIH 3T3</i>	54
<i>Исследование иммунохимических свойств NT-proBNP, экспрессированного в различных клеточных линиях</i>	56
<i>Идентификация recNT-proBNP на нитроцеллюлозной мембране методом ECL</i>	58
<i>Экспрессия recproBNP (HEK 293) в присутствии ингибитора фурина</i>	59
<i>Гетерогенность форм proBNP, экспрессированного в клеточных линиях CHO-K1 и NIH 3T3</i>	61
<i>Подбор условий для проведения расщепления proBNP фурином in vitro</i>	64
<i>Идентификация форм proBNP до и после расщепления recproBNP (E. coli) фурином</i>	65
<i>Анализ форм proBNP, образующихся после обработки recproBNP (E. coli) фурином in vitro, методом гель-фильтрации</i>	67
<i>Расщепление recproBNP фурином in vitro</i>	68
<i>Заключение</i>	71
<i>Выводы:</i>	72
<i>Список литературы</i>	73

Список сокращений

- ANP — натрийуретический пептид А
- АТФ — аденозинтрифосфат
- BNP — натрийуретический пептид В
- cGMP — циклический гуанозинмонофосфат
- CNP — натрийуретический пептид С
- DMEM — Dulbecco's modified Eagle's Medium
- DNP — натрийуретический пептид D
- НЕК 293 (human embryonic kidney) — клетки эмбриональной почки человека
- NPR-A, B, C — рецепторы натрийуретических пептидов А, В, С типов
- NT-proANP — N-концевой фрагмент молекулы предшественника натрийуретического пептида А
- NT-proBNP — N-концевой фрагмент молекулы предшественника BNP
- preproBNP — молекула препрогормона
- proBNP — молекула предшественника натрийуретического пептида В
- recNT-proBNP (CHO-K1) — рекомбинантный NT-proBNP, экспрессированный в клеточной линии CHO-K1
- recNT-proBNP (E. coli) — рекомбинантный NT-proBNP, экспрессированный в E. coli
- recNT-proBNP (НЕК 293) — рекомбинантный NT-proBNP, экспрессированный в клеточной линии НЕК 293
- recNT-proBNP (НИН 3Т3) — рекомбинантный NT-proBNP, экспрессированный в клеточной линии НИН 3Т3
- recproBNP (CHO-K1) — рекомбинантный proBNP, экспрессированный в клеточной линии CHO-K1
- recproBNP (E. coli) — рекомбинантный proBNP, экспрессированный в клеточной линии E. coli
- recproBNP (НЕК 293) — рекомбинантный proBNP, экспрессированный в клеточной линии НЕК 293
- recproBNP (НИН 3Т3) — рекомбинантный proBNP, экспрессированный в клеточной линии НИН 3Т3
- ТЕКЕС — хелат европия
- АА — акриламид
- АК — аминокислотные остатки
- БСА — бычий сывороточный альбумин

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота
ДСН — додецилсульфат натрия
кДНК — кодирующая ДНК
КМ-сефароза — карбоксиметилсефароза
МАт — моноклональные антитела
МБА — метиленбисакриламид
мРНК — матричная РНК
НП — натрийуретические пептиды
ПААГ — полиакриламидный гель
РНК — рибонуклеиновая кислота
СН — сердечная недостаточность
ТРИС — Трис(гидроксиметил)аминометан
ТХУ — трихлоруксусная кислота
ФИА — флуороиммунный анализ
ФСБ — фосфатно-солевой буфер
ФСБТ — фосфатно-солевой буфер, содержащий Tween-20
ЭДТА — этилендиаминтетраацетат

Введение

Натрийуретический пептид В (BNP) относится к семейству натрийуретических пептидов, играющих важную роль в поддержании гомеостаза организма. Натрийуретические пептиды участвуют в регуляции кровяного давления, объема жидкости организма и ее электролитного состава.

BNP синтезируется кардиомиоцитами в виде молекулы предшественника (proBNP), состоящего из 108 аминокислотных остатков (АК). Молекула предшественника позднее подвергается протеолизу с образованием двух пептидов — N-концевого фрагмента (NT-proBNP, 1-76 АК) и BNP (77-108 АК). При заболеваниях сердечно-сосудистой системы, связанных с повышением давления на стенки камер сердца, концентрации BNP и NT-proBNP в крови повышаются, при этом наблюдается корреляция между значением концентрации и степенью тяжести заболевания. Измерение концентрации этих молекул в крови с помощью иммунохимических методов широко используется в медицине для диагностики сердечной недостаточности (СН), оценки функции левого желудочка, прогнозирования последствий инфаркта миокарда. Однако, несмотря на продолжительное использование в клинике, биохимические и иммунохимические особенности молекул NT-proBNP и proBNP детально не изучены.

Недавно было показано, что в крови больных СН присутствуют непротессированные молекулы proBNP в концентрации, превышающей концентрацию физиологически активных молекул BNP. Факторы, препятствующие расщеплению молекул proBNP, до сих пор неизвестны, однако нарушение процессинга proBNP у больных СН может быть одной из причин развития заболевания. Невозможно исключить, что в некоторых случаях низкий уровень концентрации BNP, необходимого для обеспечения компенсаторной функции при СН, связан с неполным процессингом proBNP. Таким образом, исследование молекулярных механизмов регуляции процессинга proBNP может иметь большое теоретическое и практическое значение.

Недавно в нашей лаборатории было показано, что циркулирующие в крови NT-proBNP и proBNP являются гликопротеинами. Эти данные были подтверждены в работе (Schellenberger et al., 2006). В этой работе было также показано, что рекомбинантный proBNP экспрессированный в клетках CHO-K1, представляет собой O-гликопротеин, и определено 7 сайтов гликозилирования (T36, S37, S44, T48, S53, T58, T71). В нашей лаборатории было показано, что гликозилирование молекул NT-proBNP и proBNP оказывает заметное влияние на измерение концентраций этих молекул в крови с помощью иммунохимических методов. Однако исследование иммунохимических свойств

эндогенных NT-proBNP и proBNP сильно осложнено низкой концентрацией пептидов в крови. Так, концентрация NT-proBNP не превышает нескольких десятков нг/мл, а концентрация proBNP — нескольких нг/мл в крови больных СН. Экспрессия рекомбинантного proBNP в эукариотических клеточных линиях позволяет получать proBNP, содержащий постраницационные модификации, в количествах, достаточных для проведения анализа и исследования свойств.

Таким образом, в данной работе мы планировали использовать рекомбинантный proBNP, полученный в эукариотической экспрессионной системе, в качестве модели, позволяющей проводить исследования иммунохимических и биохимических свойств, а также факторов, влияющих на процессинг молекул предшественника BNP.

гуанилатциклазной активностью, на поверхности клеток-мишеней, что приводит к повышению внутриклеточной концентрации циклического гуанозинмонофосфата (сGMP) и активации сGMP-зависимых реакций.

Открытие BNP

BNP был впервые выделен из мозга свиньи в 1988 г. Для выделенного пептида была определена аминокислотная последовательность (26 АК) и показана высокая степень гомологии аминокислотной последовательности (70%) с уже известным к тому времени ANP. Выделенный пептид обладал вазорелаксирующими свойствами, увеличивал натрийурез и диурез, вызывал понижение давления. В исследовании [7] было показано, что BNP оказывает стимулирующее действие на гуанилатциклазу различных тканей крысы. На гладкомышечных клетках аорты быка было показано, что BNP связывается с рецепторами, для которых ранее было показано связывание с ANP. Таким образом, было установлено, что BNP действует на клетки-мишени сходным с ANP образом — активируя внутриклеточную гуанилатциклазу.

В 1989 г. методом радиоиммунного анализа с использованием антител, полученных на BNP было показано, что BNP присутствует в плазме крови человека [8]. Дальнейшие исследования были направлены на установление аминокислотной последовательности BNP человека. Для этого была получена кДНК, кодирующая его предшественник (препрогормон), была определена нуклеотидная последовательность и по полученным данным предсказана аминокислотная последовательность предшественника BNP человека [9]. В 1990 г. из экстракта предсердий человека был выделен BNP [10]. Было установлено, что это пептид, состоящий из 32 АК. Кроме того, была установлена его аминокислотная последовательность, которая соответствовала С-концевому участку (с 77 по 108 АК) молекулы предшественника BNP, последовательность которого была предсказана по кДНК. В другом исследовании [11] было показано, что в предсердии человека кроме низкомолекулярной формы (4 кДа), соответствующей BNP, содержится также высокомолекулярная форма (13 — 15 кДа), соответствующая форме предшественника гормона — proBNP.

Вскоре были получены моноклональные антитела (МАт), специфичные к BNP человека [12], которые использовали в радиоиммунном анализе для измерения концентраций BNP в крови здоровых людей и людей с сердечной недостаточностью (СН). В этом исследовании было показано, что концентрация BNP в плазме людей с СН, увеличивается в зависимости от тяжести заболевания. Дальнейшие исследования были направлены на исследование возможности использования BNP в качестве маркера СН.

Кроме того, было показано, что N-концевой фрагмент молекулы предшественника натрийуретического пептида В (NT-proBNP) также может служить маркером данного заболевания. В последующие годы были разработаны иммунохимические методы измерения концентраций этих молекул в крови, которые используются в настоящее время в клинической практике для диагностики заболеваний сердечно-сосудистой системы, оценки степени тяжести заболевания и прогнозирования лечения [13].

Структура гена BNP. Регуляция транскрипции

Ген BNP человека расположен на первой хромосоме, состоит из трех экзонов и двух интронов (Рис. 2) [14]. Характерной особенностью мРНК BNP является наличие на 3' конце нетранслируемого участка, состоящего из повторов AUUUAА. Этот участок придает молекуле РНК нестабильность, увеличивая тем самым скорость ее обмена, что приводит к импульсному характеру синтеза BNP [14].

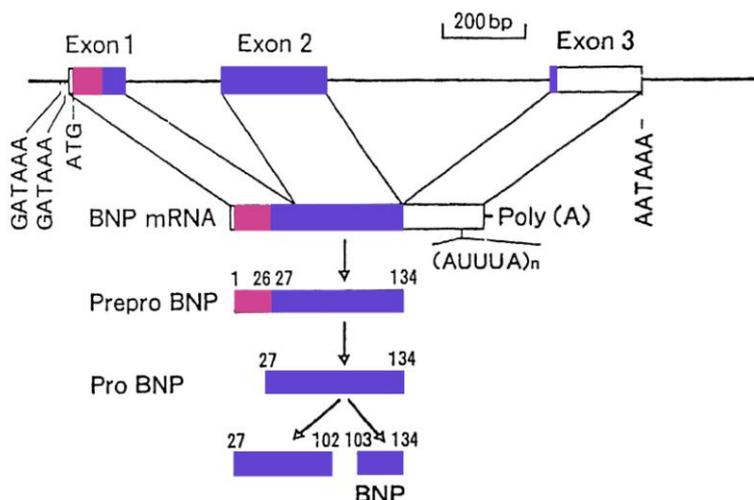


Рис. 2. Структура гена и процессинг BNP человека [14].

Регуляция секреции BNP происходит в основном на уровне экспрессии гена. Повышение давления на стенки сердца служит сигналом к синтезу мРНК BNP и дальнейшему выбросу BNP из сердца. Было показано, что основным местом синтеза BNP у человека являются кардиомиоциты желудочков сердца [15]. Кроме того, небольшое количество пептида синтезируется в кардиомиоцитах предсердий и может запасаться вместе с ANP в гранулах [16].

В работе [17] проводили исследование экспрессии гена BNP человека у трансгенных мышей. Было показано, что ген BNP экспрессируется преимущественно в ткани сердца. Экспрессия в других тканях организма, таких как мозг, почки, печень, легкие, скелетная мускулатура, происходит в значительно меньшей степени и составляет всего 1-3 % от уровня экспрессии гена BNP в сердце. Было показано, что при искусственно вызванном

инфаркте у мышей уровень транскрипции гена BNP в области инфаркта увеличивается примерно в 5 раз в течение последующих 48 часов. Кроме того, он остается на увеличенном уровне в течение последующих 3-4 недель. Также было установлено, что регуляторные элементы, отвечающие за увеличение уровня транскрипции, находятся преимущественно в проксимальной области промотера гена BNP. Была показана связь увеличенной экспрессии гена BNP с последовавшей через 3 недели после инфаркта реконструкцией ткани желудочков (увеличением массы ткани, растяжением камер сердца).

В другой работе [18] было показано, что в течение короткого времени после искусственно вызванного инфаркта у мышей наблюдается заметное усиление экспрессии гена BNP в желудочках сердца. При этом заметное увеличение синтеза BNP начинается уже через 12 часов. Что значительно раньше, чем для ANP. Таким образом, при увеличении нагрузки на стенку желудочка происходит увеличение синтеза мРНК BNP и, как следствие, увеличение BNP в кардиомиоцитах желудочков сердца. При помощи иммуногистохимических методов было показано, что в самой области некротической ткани и вокруг нее выживают миоциты, синтезирующие большее количество BNP. После инфаркта миокарда BNP синтезируется в основном в желудочках сердца. При СН в ответ на увеличение нагрузки на стенки сердца BNP секретируется в кровоток значительно быстрее, чем ANP, что делает его более чувствительным маркером данного заболевания.

В работе [19] было показано, что уровень мРНК BNP в желудочках сердца человека составляет 52 % от соответствующего значения в предсердиях, однако, учитывая массы желудочков и предсердий, общее количество мРНК BNP в желудочках составляет 77 % от количества мРНК всего сердца. Таким образом, можно сказать, что желудочки являются основным местом синтеза BNP. Данное исследование проводили на сердцах, полученных при вскрытии 10 пациентов. Пациентами были 4 мужчины и 6 женщин в возрасте от 52 до 80 лет. Восемь пациентов страдали острой лейкемией, инфарктом мозга, раком кишечника, раком пищевода (2), раком желудка (2) и гепатомой, и двое пациентов страдали заболеваниями сердца. При помощи Northern blot анализа были определены уровни мРНК BNP в ткани сердец пациентов. В результате было выявлено, что для сердец пациентов, не страдающих заболеваниями сердечно-сосудистой системы, характерен следующий ряд уровня мРНК: правое предсердие > левое предсердие > правый желудочек = левый желудочек. При этом уровень мРНК в желудочках составлял 52% от уровня мРНК в предсердиях. Уровень мРНК BNP в ткани сердец больных с заболеваниями сердца был увеличен в 3-4 раза по сравнению с тканью сердец пациентов, не страдавших заболеваниями сердца.

Было показано, что концентрация BNP в желудочках сердца больного с диагнозом СН увеличена по сравнению со здоровым человеком примерно в 30 раз, в то время как для ANP концентрация пептида при СН увеличивается всего в 3-4 раза [20]. Это позволяет утверждать, что BNP имеет большее значение при патологических состояниях по сравнению с ANP. Кроме того, следует отметить, что значения концентраций BNP в различных тканях варьировали у разных людей. Таким образом, можно сказать, что для гена BNP характерна тканеспецифическая регуляция экспрессии. Кроме того, тканеспецифичностью обладает также экспрессия рецепторов натрийуретических пептидов. Все это обуславливает специфическое воздействие BNP на разные ткани человеческого организма.

В исследовании [20] было показано, что уровень транскрипции гена BNP у человека достаточно высок не только в ткани сердца. Было показано, что уровень транскрипции гена BNP в сердце человека близок к уровню транскрипции гена BNP в сердце крысы, однако уровень транскрипции гена BNP в других тканях организма у человека на 1-2 порядка выше показателей крысы. Например, количество мРНК в мозгу и легких крысы в 1000 раз меньше, чем в сердце, в то время как для людей с СН количество мРНК в сердце выше по сравнению с мозгом и легкими всего в 10-20 раз. Было также показано, что ген BNP экспрессируется и в яичниках. Кроме того, было выявлено значительное увеличение (в 20 раз) концентрации BNP в ткани яичника у пациентки с карциномой яичника по сравнению с уровнем BNP в ткани яичника здоровой пациентки. Значение концентрации BNP в ткани яичника больной было сравнимо с концентрацией BNP в сердце.

Факт содержания довольно большого количества мРНК в других органах помимо сердца человека позволяет предположить, что они вносят определенный вклад в увеличение количества BNP, циркулирующего в кровотоке. Однако следует отметить, что наличие мРНК не доказывает наличие синтеза BNP этими тканями.

Регуляция экспрессии гена BNP может осуществляться также под действием нейrogормонов. Связывание таких нейrogормонов как эндотелин-I, ангиотензин-II и агонистов адренергических рецепторов с соответствующими рецепторами приводит к значительному увеличению экспрессии гена BNP [21].

Было показано, что ил-1 β может участвовать в регуляции экспрессии генов сердечных миоцитов. Ил-1 β активирует транскрипционные факторы, такие как NF-kB и AP-1. В проксимальной части промотора гена BNP человека присутствуют cis-регуляторные элементы M-CAT и GATA-4, которые играют важную роль в постоянной, тканеспецифичной и индуцибельной регуляции генов ткани сердца человека. В работе [22] было проведено исследование влияния ил-1 β на экспрессию гена BNP. В результате

впервые было показано, что Ил-1 β участвует в регуляции гена BNP человека через транскрипционный механизм, направляя действие на m-CAT элемент. Действие Ил-1 β осуществляется через Ras-, Rac- и p38-зависимые пути.

Также показано, что регуляция экспрессии гена BNP может осуществляться и на посттранскрипционном уровне. Нуклеотидная последовательность гена *BNP* содержит дестабилизирующую последовательность “tatttat”, которая предполагает высокую скорость обмена мРНК BNP и импульсный характер синтеза BNP [21].

Синтез и процессинг proBNP

BNP человека синтезируется в виде препрогормона, состоящего из 134 АК. Молекула ррегroBNP человека содержит гидрофобную сигнальную последовательность, состоящую из 26 аминокислотных остатков, которая отщепляется котрансляционно в гранулярном эндоплазматическом ретикулуме до окончания синтеза С-концевой части молекулы прогормона. Молекулы proBNP (108 аминокислотных остатков) подвергаются дальнейшему процессингу с образованием физиологически неактивной N-концевой части (NT-proBNP) и биологически активной молекулы BNP (Рис. 3). Было показано, что в плазме человека присутствуют три формы пептида: BNP, proBNP и NT-proBNP [13]. Предполагают, что расщепление proBNP происходит в кардиомиоцитах либо непосредственно в момент секреции, либо перед секрецией в кровоток. Однако до конца этот вопрос не изучен.

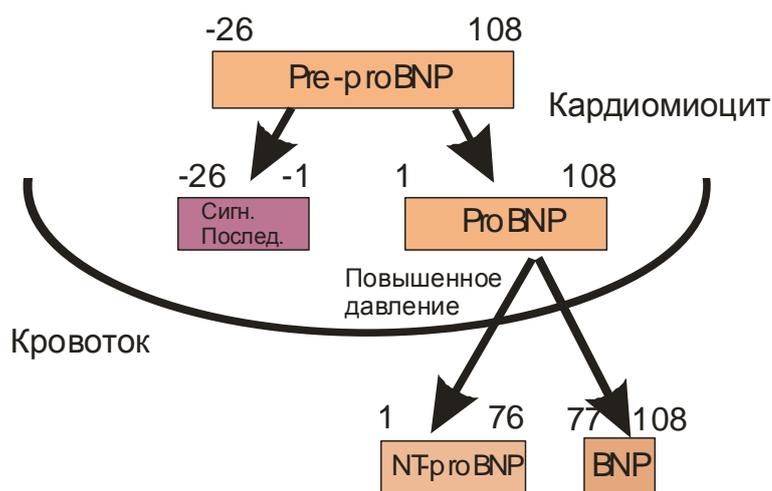


Рис. 3. Секреция BNP. Цифрами обозначены номера аминокислотных остатков.

Экспрессия гена proBNP характерна как для миоцитов предсердий, так и для миоцитов желудочков сердца человека [23]. Однако миоциты предсердий и желудочков значительно отличаются друг от друга по принципу хранения и секреции пептидов. В

миоцитах предсердий присутствуют секреторные гранулы, содержащие как интактные молекулы proBNP, так и продукты расщепления молекулы предшественника. Миоциты желудочков сердца, напротив, не содержат таких гранул и продуктов расщепления proBNP. С другой стороны, есть некоторые данные о том, что при заболеваниях сердечно-сосудистой системы в желудочках также образуются секреторные гранулы, и в ткани присутствуют продукты расщепления proBNP. Кроме того, показано, что фибробласты сердца также синтезируют BNP [24]. Клетки коронарной сосудистой сети также экспрессируют ген BNP, по крайней мере, при коронарном атеросклерозе [25].

В работе [26] было показано, что основная часть иммунореактивного BNP, циркулирующего в крови больных с тяжелой стадией СН представляет собой proBNP. Как на эндотелиальных, так и на клетках гладких мышц сосудов было показано, что молекула proBNP обладает в 6-8 раз меньшей физиологической активностью по сравнению с BNP. Однако механизм, приводящий к увеличению содержания непроцессированной формы proBNP в кровотоке больных с тяжелыми формами СН до сих пор остается неясным. Было показано, что в кровотоке расщепления proBNP с образованием BNP не происходит [26]. Можно предположить, что увеличение экспрессии гена BNP при развитии СН перекрывает возможности кардиомиоцитов к расщеплению proBNP с образованием более активной молекулы BNP, вследствие чего большая часть молекул proBNP остается в интактном состоянии, это приводит к увеличению количества proBNP в кровотоке больных. Кроме того, возможно уменьшение деградации proBNP и/или увеличение степени деградации BNP. Наконец, дополнительным механизмом, уменьшающим активность BNP в крови больных СН, может быть активация сGMP фосфодиэстеразы или уменьшение экспрессии гена NPR-A. Однако для выяснения конкретного механизма данного явления необходимы дальнейшие исследования.

Процессинг proBNP в сердце до сих пор остается слабо изученным. Одной из основных причин этого является отсутствие хороших клеточных моделей *in vitro*. Неонатальные миоциты могут быть выращены в культуре в течение короткого периода времени, однако при этом не происходит их дифференцировка в зрелые клетки предсердий и желудочков [23].

Предполагают, что proBNP расщепляется эндопротеазой фурином, поскольку при СН показано одновременное увеличение экспрессии генов фурина и BNP. Кроме того, proBNP содержит мотив Arg-X-X-Arg в положении 73-76 АК, по которому происходит расщепление молекул предшественника фурином. Также было показано, что при ингибировании фурина *in vitro* процессинг proBNP блокируется [23].

Фурин является наиболее изученной протеазой, осуществляющей процессинг молекул предшественников. Ген фурина человека был установлен в 1989 году [27]. Этот ген был впервые охарактеризован как ген, ассоциированный с протоонкогенами *c-fes/feps*. Дальнейшее клонирование полной кДНК и экспрессия помогли установить гомологию фурина и Kex2 (субтилизиновая конвертаза).

Фурин является трансмембранным белком, представляющим собой кальций-зависимую сериновую протеазу с субтилизин-подобным доменом. Фурин экспрессируется повсеместно во всех тканях человека. С широкой распространенностью фурина в организме человека связана широкая специфичность данного фермента. Так, известны такие субстраты как факторы роста, гормоны, рецепторы клеток, факторы свертывания крови, металлопротеиназы, экстраклеточные белки, секретазы, бактериальные токсины и гликопептиды вирусов. Фурин присутствует в нескольких компартментах клетки, таких как транс-Гольджи сеть, эндосомы, плазматическая мембрана [27].

Также как и бактериальный субтилизин фурин синтезируется в форме зимогена (профермент), который превращается в активную форму фермента при протеолитическом отщеплении N-конца молекулы. Было показано, что фурин проходит две стадии расщепления, зависящие от pH [27].

В работе [28] было показано, что после инфаркта миокарда происходит одновременное усиление экспрессии генов фурина и BNP. Эксперимент был проведен на крысах с искусственно вызванным инфарктом миокарда. Было показано, что на третий день после инфаркта в ткани как предсердий, так и желудочков сердца происходит увеличение количества мРНК фурина и BNP. Повторное увеличение синтеза мРНК происходит на 14 и 28 дни после инфаркта. В кардиомиоцитах предсердий BNP хранится в виде секреторных гранул, и секретируется при необходимости в ответ на внешние сигналы. proBNP может подвергаться расщеплению фурином в ТГС и затем храниться в предсердных секреторных гранулах. В желудочках, напротив, секреторных гранул не образуется, и proBNP, по-видимому, расщепляется непосредственно при выбросе в кровотока. Процессинг proBNP происходит более интенсивно в предсердиях, чем в желудочках. Так, отношение BNP/proBNP для предсердий и желудочков составляет 2:1 и 1:1, соответственно. Однако после инфаркта миокарда соотношение BNP/proBNP в желудочках составляет 3:1, что объясняется усилением экспрессии фурина в кардиомиоцитах.

Было показано, что фурин играет важную роль в пролиферации клеток и клеточной дедифференцировке, отщепляя RXXR участок белков и пептидов, отвечающих за эти процессы [29]. Мотив RXXR характерен и для молекулы proBNP. В данной работе при

помощи нескольких ингибиторов фурина было показано его участие в процессинге proBNP. Предполагают, что фурин играет основную роль в контроле гипертрофического роста кардиомиоцитов, участвуя в процессе образования биоактивных пептидов и белков, включающих несколько факторов роста и пептидов, регулирующих сердечно-сосудистую систему.

В ткани сердца была обнаружена и охарактеризована также другая эндопротеаза — корин. Корин является сериновой протеазой, способной проводить протеолитическое расщепление *in vitro* proANP и proBNP [30]. Корин содержит трансмембранный домен, локализованный в мембране клетки, поэтому предполагается, что расщепление молекулы предшественника происходит в момент секреции гормона в кровоток. Таким образом, существует предположение, что корин может участвовать в процессе расщепления молекулы proBNP на BNP и NT-proBNP в ткани сердца. С другой стороны в настоящее время не существует данных о том, где происходит расщепление молекулы proBNP корином. Кроме того, процессинг proBNP и proANP в клетках предсердий различны. Так, показано, что секреторные гранулы предсердий содержат молекулы proANP и BNP [23]. Таким образом, активность корина не объясняет в полной мере процессов, приводящих к появлению физиологически активных молекул натрийуретических пептидов.

В работе [31] была проведена совместная экспрессия proANP и корина, в результате было показано, что корин является протеазой, осуществляющей процессинг ANP. При проведении точечных мутаций по 98, 101 и 102 Arg молекулы корина процессинга proANP не происходило, что позволяет предполагать, что корин-опосредуемый процессинг proANP обладает высокой специфичностью. В предыдущих исследованиях было показано, что корин является высокомолекулярной сериновой протеазой кардиомиоцитов. Было показано, что корин относится к типу II трансмембранных трансмембранных белков с внеклеточным каталитическим доменом. Это было доказано следующим образом. При помощи метода Western blotting было показано, что корин присутствует во фракции мембран, полученной при лизате кардиомиоцитов. Кроме того, при добавлении proANP в среду клеток, экспрессирующих корин, происходило расщепление предшественника с образованием ANP, что свидетельствует о том, что каталитический домен корин располагается во внеклеточном пространстве. Кроме того, было показано, что при действии таких ингибиторов, как апротинин, бензамидин и леупептин, но не соевый ингибитор трипсина, процессинга proANP не происходило. Также на мышах было показано, что мРНК корина присутствует не только в сердце, но и в матке беременных самок. Биологический смысл усиления экспрессии корина в матке беременных не ясен. Однако известно, что концентрация ANP в крови беременных

женщин увеличена, особенно у женщин с преэклампсией. Возможно, что усиление экспрессии корина в матке необходимо для увеличения количества ANP, чтобы предотвратить преэклампсию.

Известно, что для образования активной формы корина, осуществляющего процессинг предшественников НП, необходимо отщепление пептида от первоначально синтезируемой молекулы фермента [32]. Однако до настоящего времени неизвестно, какая протеаза участвует в активации корина. В работе было показано, что при замене 866 Arg на Ala образования активной формы корина не происходит. Это позволило предположить, что этот участок молекулы корина играет важную роль при его протеолизе. По всей видимости, протеаза, осуществляющая активацию корина, представляет собой трипсиноподобный белок, поскольку активация корина не происходила при действии небольших молекул ингибиторов трипсиноподобных протеаз, но не ингибиторов металлопротеиназ и цистеиновых протеиназ. При помощи метода Western blotting было показано, что мышечные клетки и кардиомиоциты крысы не содержат значительных количеств корина. Было сделано предположение, что в нормальном состоянии только небольшое количество корина находится в активном состоянии в кардиомиоцитах. При повышении давления, возможно, увеличивается активность протеазы, активирующей корин, и образуется необходимое количество активного корина, осуществляющего процессинг proANP. Это предположение подтверждают данные о том, что количество мРНК корина в левом желудочке увеличено при СН. Кроме того, в данной работе было показано, что корин является гликопротеидом. Также было установлено, что гликозилирование корина относится к N-типу. Причем гликозилирование корина имеет важное значение для процесса его активации. Также при помощи точечного мутагенеза было показано, что гликозилирование корина крысы по остаткам Asn-968 и 1087 в протеазном домене играет важную роль для активации фермента.

В работе [33] было исследовано значение трансмембранного домена корина для его активации. Был сконструирован ген растворимого корина человека, не содержащего трансмембранного домена. Было показано, что при экспрессии данного гена, образуется корин, способный процессировать proANP. Таким образом, было доказано, что для активации корина трансмембранный домен не играет никакой роли. Кроме того, при помощи точечной мутации R801A было показано, что данный АК важен для активации фермента, поскольку мутантный корин был неспособен осуществлять процессинг proANP. Также было установлено положение, по которому происходит отщепление пропептида от молекулы корина при его активации: Arg801-Phe802. Также в данной работе были получены интересные результаты при использовании различных ингибиторов протеаз.

Так, было показано, что растворимая форма корина ингибируется неспецифическими ингибиторами трипсиноподобных сериновых протеаз, а ингибиторы химотрипсиноподобных и металло-протеаз не оказывают влияния на активность корина. Интересно, что на активность нерастворимой формы корина соевый ингибитор трипсина не оказывал существенного влияния. Подобные результаты различия действия соевого ингибитора трипсина на растворимую и нерастворимую формы фермента известны для других представителей семейства трансмембранных сериновых протеаз II типа. Возможно, что наличие трансмембранного домена закрывает доступ для крупных молекул ингибиторов ферментов, обеспечивая тем самым устойчивость фермента к ингибиторам. Таким образом, регуляция трансмембранных ферментов может осуществляться при помощи эндогенных ингибиторов. Однако в настоящее время неизвестно, существуют ли в организме человека эндогенные ингибиторы корина. В данной работе было показано, что плазма крови человека ингибиторов корина не содержит. Принимая во внимание также результаты, полученного с мутантным корином, можно предположить, что регуляция корина человека, по всей вероятности, осуществляется в основном на уровне протеолитического расщепления, а не при помощи ингибиторов.

Также предполагают возможное участие конвертазы прогормонов I в процессинге молекул proBNP [23]. До настоящего времени остается неизученным вопрос о возможности расщепления молекул proBNP по другим сайтам расщепления.

В работе [34] было показано, что при увеличении давления на левый желудочек происходит увеличение количества секретируемого в кровоток BNP. Было показано, что количество мРНК BNP при гипертрофии сердца увеличивается в 2-3 раза по сравнению с нормальным сердцем, а количество BNP в клетках желудочков сердца увеличивается при этом более чем в 2 раза. Таким образом, при постоянном увеличении сердечной нагрузки происходит увеличение синтеза BNP желудочками сердца. Увеличение синтеза BNP приводит и к увеличению его секреции в кровоток. Так для здоровых людей значение концентрации BNP в крови значительно ниже концентрации ANP, при СН концентрации обоих пептидов в крови увеличиваются, однако, значение концентрации BNP при этом превышает концентрацию ANP, что делает BNP более чувствительным маркером заболевания. В данной работе было показано, что в первые 2 мин после увеличения нагрузки на желудочек происходит максимальное увеличение секреции ANP и BNP в кровоток. Далее в течение 10 мин происходит постепенный спад уровня секреции пептидов из желудочка, и контрольный значений выброс достигает при окончании давления на желудочек. Механизм, в результате которого происходит увеличение выброса BNP в ответ на увеличение нагрузки, остается невыясненным. В данной работе было

показано, что секреция BNP в отличие от ANP не зависит от активации протеин киназы-С и концентрации Ca^{2+} .

Рецепторы натрийуретических пептидов

Действие НП проявляется за счет связывания со специфическими рецепторами, обладающими гуанилатциклазной активностью. Натрийуретические пептиды являются лигандами трех типов рецепторов: А (NPR-A), В (NPR-B) и С (NPR-C). Эти рецепторы отличаются по сродству к разным НП, так NPR-A активируется физиологическими концентрациями ANP и BNP, NPR-B с наибольшим сродством связывает CNP, а NPR-C связывает все три типа пептидов. Связывание НП с рецепторами типов А и В приводит к повышению внутриклеточной концентрации циклического гуанозинмонофосфата, а рецепторы С-типа служат для удаления гормонов из кровотока (Рис. 4). Все три типа рецепторов широко распространены в различных типах тканей, они обнаружены в почках, сердце, эндотелии сосудов, надпочечниках и по всей центральной нервной системе [36].

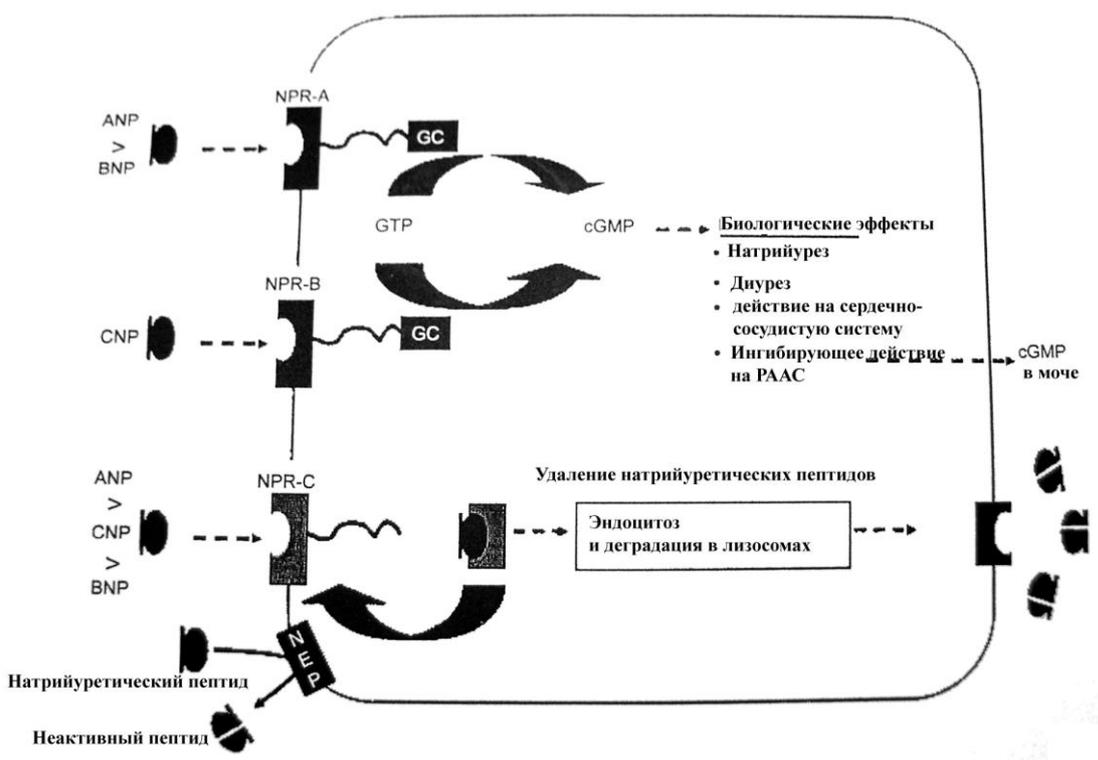


Рис. 4. Рецепторы натрийуретических пептидов [35].

NPR-A и NPR-B относятся к классу гуанилатциклазных рецепторов и имеют сходное строение. Они представляют собой трансмембранные белки, состоящие из трех доменов: внеклеточного лиганд-связывающего домена, трансмембранного домена, внутриклеточного домена. В последнем можно выделить киназо-подобный и С-концевой

гуанилатциклазный каталитический домены, соединенные амфипатической последовательностью, состоящей из 41 АК [37].

Рецепторы А-типа наиболее широко распространены в клетках сосудов, почках, надпочечниках. Активация NPR-A приводит к вазорелаксации, диурезу, натрийурезу, ингибированию синтеза альдостерона, подавлению клеточной пролиферации.

Рецепторы В-типа преобладают в мозге, включая гипофиз, и, возможно, принимают участие в нейроэндокринной регуляции.

В настоящее время предложена следующая модель функционирования NPR-A. В отсутствие натрийуретических пептидов рецептор существует в виде гомодимера или гомотетрамера, находится в фосфорилированном состоянии, а гуанилатциклазная активность подавлена. Связывание гормона не приводит к дальнейшей агрегации рецептора. Связывание АТФ с киназо-подобным доменом приводит к конформационным изменениям этой части рецептора. При этом пропадает ингибирующий эффект киназо-подобного домена на каталитическую активность, гуанилатциклазные домены сближаются и образуют два активных центра. После чего сродство рецептора к гормону снижается. Конформационные изменения киназо-подобного домена делают доступными фосфорилированные остатки для конститутивной или сGMP-индуцируемой протеинфосфатазы. В результате дефосфорилированный рецептор становится невосприимчивым к дальнейшей гормональной стимуляции [37].

NPR-C отличается по строению от рецепторов А и В типов: он содержит короткий цитоплазматический домен, связанный с G-белком и не обладает гуанилатциклазной активностью. Имеются данные о том, что NPR-C может ингибировать аденилатциклазную активность через Gi-белок [35]. Этот тип рецепторов широко распространен в различных тканях: NPR-C представлены в эндотелии сосудов, гладкой мускулатуре, сердце, надпочечниках и почках. Отличается этот тип рецепторов и по выполняемым в организме функциям. Так, на мышцах, нокаутированных по гену рецепторов С-типа (*Npr3*), показано, что эти рецепторы служат для удаления натрийуретических пептидов из кровотока [38].

В исследовании [39] на клетках крысы и человека было показано, что NPR-C обладает следующим сродством к натрийуретическим пептидам: ANP > CNP > BNP.

Удаление натрийуретических пептидов из кровотока

В настоящее время показано два способа удаления НП из кровотока: с помощью эндоцитоза, опосредуемого NPR-C, с последующей деградацией пептида в лизосомах; путем деградации связанной с мембраной нейтральной эндопептидазой, которая раскрывает кольцевую структуру молекулы пептида. Деградация пептидов происходит в

основном в легких, печени и почках [2]. Время полужизни молекулы BNP в крови составляет 13-20 минут. Показано, что BNP присутствует в моче, но механизм его выведения почками до конца не ясен.

В работе [40] на овцах с СН было исследовано влияние ингибитора эндопептидазы и блокатора NPR-C на удаление из кровотока и биологическую активность натрийуретических гормонов. Животным внутривенно вводили различные дозы ингибитора пептидазы и блокатора рецепторов С-типа как по отдельности, так и совместно. Во всех случаях наблюдалось увеличение концентраций ANP и BNP в плазме крови, что в свою очередь приводило к падению кровяного давления, натрийурезу и диурезу. В результате исследователи пришли к выводу, что энзиматическое и рецепторное удаление пептидов из кровотока имеют одинаковое значение в метаболизме натрийуретических пептидов и что совместное использование ингибиторов эндопептидазы и блокаторов NPR-C при лечении СН может производить больший терапевтический эффект, чем каждое средство по отдельности.

Вопрос о деградации NT-proBNP остается недостаточно изученным. Известно, что время полужизни NT-proBNP выше, чем у BNP. Показано, что ингибирование нейтральной эндопептидазы практически не влияет на концентрацию NT-proBNP в плазме, что свидетельствует о том, что деградация NT-proBNP этим путем не так важна, как для BNP [2].

В работе [41] было показано, что при инкубации крови в условиях, ингибирующих протеазы системы свертывания крови, BNP оказывается более стабильным по сравнению с инкубацией в присутствии активных протеаз системы свертывания крови.

В работе [42] было показано, что при инкубации proBNP человека в сыворотке наблюдается значительное усиление процессинга с образованием BNP и NT-proBNP, а в цельной крови, обогатщенной гепарином, напротив, proBNP практически не подвержен протеолизу. В цельной крови расщепление proBNP происходит очень незначительно и, кроме того, время, в течение которого происходит протеолиз (от 1 до 4 часов) не может иметь физиологического значения. Кроме того, было показано, что протеазы, ответственные за процессинг proBNP, активируются под действием системы свертывания крови. Однако, по всей видимости, расщепление proBNP с образованием активного гормона в кровотоке, не играет главной роли в процессинге proBNP.

В работе [43] было показано, что пептидазы, участвующие в расщеплении BNP, относятся к группе металлопротеаз. Было показано, что полное ингибирование расщепления BNP происходит при действии ЭДТА, в то время как другие ингибиторы протеаз не оказывают существенного влияния на деградацию BNP. Фосфорамидон,

специфический ингибитор НЭП, НЭП 2 и эндотелинпревращающего фермента, не давал никакого эффекта на расщепление BNP. Ингибитор ангиотензинпревращающего фермента также не оказывал существенного влияния на деградацию BNP. Однако ингибитор меприна, актиноин, блокировал образование BNP₇₋₃₂, получаемого при отщеплении последовательности из 6 АК на N-конце молекулы BNP. В данной работе было показано, что BNP расщепляется под действием α меприна, в то время как меприн β не участвует в деградации BNP. Это было показано на BNP мыши, крысы и свиньи. Меприны, содержащие в своем составе субъединицы α называются мепринами А. Меприн А может быть гомоолигомером, состоящим только из α субъединиц, а может быть и гетероолигомером, в состав которого входят также β субъединицы, отвечающие за связь фермента с мембраной. Меприн А, участвующий в удалении BNP, представляет собой гетероолигомер, состоящий из обоих типов субъединиц, поскольку для проявления активности фермента и присоединения к мембране необходимо наличие β субъединиц. Таким образом, было показано, что первую стадию деградации BNP в почках осуществляет меприн А, однако после отщепления 6 АК с N-конца молекулы BNP, пептид продолжает проявлять физиологическую активность и может взаимодействовать с NPR-B. В данной работе было показано, что укороченная форма BNP является субстратом НЭП, которая производит дальнейшее расщепление BNP. Таким образом, удаление BNP в почках является двухстадийным процессом и для его осуществления необходимо наличие двух ферментов — меприна А и НЭП.

Физиологическое действие BNP

Физиологическое действие BNP на почки

Показано, что действие BNP на почки осуществляется на уровне клубочков и канальцев. В клубочках он способствует расширению приносящей артериолы и одновременному сужению выносящей артериолы, что приводит к увеличению клубочковой фильтрации. В канальцах действие BNP направлено на уменьшение реабсорбции натрия, что способствует его выведению. Кроме того, BNP подавляет синтез ренина, ангиотензина II и альдостерона [35].

Действие BNP на почки исследовали внутривенным введением BNP. В исследовании [44] 48 здоровым мужчинам вводили BNP в дозах 1, 2 или 4 пмоль/кг х мин в течение часа. При этом концентрация BNP в крови повышалась до уровня, наблюдаемого при сердечной и почечной недостаточности. Наблюдалось увеличение выведения жидкости из организма и усиление натрийуреза пропорционально введенному количеству пептида.

Физиологическое действие BNP на сердечно-сосудистую систему

BNP обладает вазорелаксирующим действием, вызывающим расширение кровеносных сосудов, что приводит к уменьшению кровяного давления. Так, в одном из исследований [45] при внутривенном введении BNP крысам с повышенным давлением было отмечено значительное снижение кровяного давления. Кроме того, было показано более длительное действие BNP по сравнению с ANP.

У мышей с повышенной экспрессией гена *BNP* наблюдается более низкое кровяное давление и более низкое сопротивление периферических сосудов по сравнению с мышами дикого типа [35].

Кроме того, известно, что BNP ингибирует пролиферацию гладкомышечных клеток сосудов и оказывает ингибирующее влияние на симпатическую систему сердца [13].

Формы BNP в крови

Гетерогенность молекулярных форм proBNP, циркулирующих в крови человека, исследована с помощью хроматографических методов в сочетании с иммунохимическим анализом [23]. Установлено, что BNP секретируется кардиомиоцитами и циркулирует в крови в свободном состоянии. Показано, что при инкубации в крови синтетического BNP происходит отщепление двух N-концевых аминокислотных остатков (Ser-Pro). Известно, что мотив X-Pro является сайтом расщепления таких молекул, как хемокины и цитокины. Поэтому высказывается предположение, что молекула BNP может подвергаться протеолитической деградации с N-конца с помощью аминодипептидаз. Следует отметить, что N-конец молекулы BNP не играет существенной роли для связывания BNP с рецепторами и проявления физиологической активности.

В исследовании [46] в плазме крови людей методом обратно-фазовой хроматографии было показано наличие двух форм пептида: низко- и высокомолекулярной. При анализе аминокислотной последовательности этих форм было установлено, что низкомолекулярная форма пептида представляет собой BNP, а высокомолекулярная форма — proBNP. В другом исследовании [47] методом гель-фильтрации и обратно-фазовой хроматографии в плазме также было показано наличие NT-proBNP. Кроме того, было показано, что значительное количество иммунореактивного NT-proBNP, содержащегося в плазме крови представляет собой формы пептида образовавшиеся в результате протеолитического отщепления нескольких АК с обоих концов интактной молекулы NT-proBNP [48].

В работе [49] было показано наличие в плазме крови больных, страдающих СН, формы proBNP с молекулярной массой 25 кДа, которая уменьшалась до 12 кДа после обработки О-гликозидазами. Таким образом, было показано наличие в крови больных, страдающих СН, гликозилированной формы proBNP. Также в этой работе было определено несколько сайтов о-гликозилирования в центральной части молекулы proBNP.

Таким образом, можно заключить, что в крови циркулируют как интактные молекулы proBNP, так и NT-proBNP и BNP, образующиеся в результате процессинга молекул предшественника.

Концентрация BNP в крови

Данные о значениях концентрации BNP в крови здоровых людей в литературе варьируют, они зависят от метода измерения и выбора контрольной популяции. Известно, что содержание BNP в крови увеличивается с возрастом и может быть немного выше у женщин, чем у мужчин. Концентрацию BNP от 0,5 до 30 пг/мл (от 0,15 до 8,7 пмоль/л) считают нормальной. Концентрация BNP 80 пг/мл в возрасте 55 лет считается критической для диагностики СН. Для NT-proBNP нормальной считается концентрация в пределах от 68 до 112 пг/мл (от 8,2 до 13,3 пмоль/л) [2].

Было показано, что концентрация BNP в крови увеличивается при физической нагрузке. В связи с этим для избежания ошибок было предложено проводить измерение концентрации BNP через час после прекращения физической нагрузки, когда содержание BNP в крови приходит в норму [50].

Обнаружено, что концентрация BNP в крови увеличивается при таких заболеваниях как СН, почечная недостаточность, дисфункция левого желудочка, после инфаркта миокарда. Показано, что при СН возрастание концентрации происходит пропорционально степени тяжести заболевания. Кроме того, повышение концентрации BNP наблюдается уже на начальных этапах развития заболевания. Это делает возможным использование BNP в качестве маркера СН.

Формы BNP в сердечной ткани

В работе [52] был проведен анализ экстрактов ткани сердца человека. В данном исследовании экстракт предсердий анализировали методом гель-фильтрации с последующим измерением иммунохимической активности во фракциях методом радиоиммунного анализа с помощью антител, специфичных к молекуле BNP человека. Авторы этой работы наблюдали два пика иммунологической активности BNP: высоко- и низкомолекулярный. Молекулярные массы, определенные методом гель-фильтрации, для

высоко- и низкомолекулярной форм составили 13-15 кДа и 4 кДа, соответственно. На основании полученных результатов было сделано предположение о том, что высокомолекулярная форма соответствует молекуле proBNP, а низкомолекулярная форма представляет собой BNP.

При анализе экстрактов правых желудочков сердца человека были получены похожие результаты [53]. В этой работе разделение белков экстракта проводили методом гель-фильтрации, содержание иммунореактивного BNP в полученных фракциях определяли методом радиоиммунного анализа с помощью антител, специфичных к молекуле BNP человека. В результате были определены две молекулярные формы BNP: высокомолекулярная форма с молекулярной массой более 13 кДа и низкомолекулярная с молекулярной массой 3 кДа. Подвижность низкомолекулярной формы совпадала с подвижностью синтетического BNP.

В работе [10] было проведено определение аминокислотной последовательности форм BNP, содержащихся в сердечной ткани человека. По полученным результатам было установлено, что высокомолекулярная форма соответствует proBNP, а низкомолекулярная форма соответствует BNP, как и предполагалось ранее.

Таким образом, можно заключить, что в ткани сердца присутствуют proBNP и BNP.

Клиническое значение BNP

В клинической практике показано, что СН достаточно сложно диагностировать. Сложность диагностики этого заболевания связана с неспецифичностью симптомов. Наиболее достоверными считаются данные эхокардиографии, но ее использование не всегда представляется возможным. Поэтому создание недорогого и несложного биохимического теста для диагностики СН является очень актуальной задачей. Повышенный интерес к исследованию BNP и NT-proBNP связан с возможностью их использования в качестве маркеров СН. В настоящее время измерение концентраций BNP и NT-proBNP в крови широко используется для диагностики СН [55]. Измерение концентрации BNP и NT-proBNP в крови людей с симптомами СН позволяет исключить вероятность этого заболевания или направить пациентов на дальнейшие исследования.

Во многих исследованиях [56, 57, 58] было показано, что увеличение концентрации BNP и NT-proBNP в крови пациентов коррелирует со степенью тяжести заболевания, определяемому по классификации NYHA (New York Heart Association). В работе [56] эти данные были получены при исследовании 105 больных хронической СН. В качестве контроля были исследованы 67 здоровых людей. Для NT-proBNP было показано увеличение концентрации в большей степени по сравнению с BNP. В связи с этим было

высказано предположение о том, что NT-proBNP может быть более чувствительным маркером заболевания, чем BNP.

Показано, что систолическая дисфункция левого желудочка очень часто является причиной развития СН. При дисфункции левого желудочка наблюдается уменьшение фракции выброса левого желудочка. Показано, что NT-proBNP и BNP являются маркерами дисфункции левого желудочка [56, 59], увеличение концентрации пептидов коррелирует с уменьшением фракции выброса левого желудочка. В исследовании [59] проводили сравнительный анализ способности предсказывать уменьшение фракции выброса левого желудочка с помощью измерения концентрации BNP, NT-proBNP и NT-proANP в крови пациентов. В работе были исследованы 57 пациентов. Было показано, что лучшими маркерами являются BNP и NT-proBNP. При предсказании уменьшения фракции выброса левого желудочка меньше 40 % были определены контрольные значения концентраций BNP и NT-proBNP, которые составили 41 и 488 пмоль/л, соответственно. При этом чувствительность составила 73 % и 70 %, специфичность — 77 % и 73 %, эффективность — 75 % и 72 % для BNP и NT-proBNP, соответственно. Таким образом, было показано, что BNP и NT-proBNP могут быть использованы в качестве маркеров дисфункции левого желудочка. Причем различия в чувствительности этих маркеров оказались практически незначимыми.

В некоторых работах было высказано предположение о том, что BNP обладает меньшей чувствительностью для предсказания дисфункции левого желудочка по сравнению с диагностикой СН, особенно в случае слабо выраженной дисфункции [56, 57].

По результатам другого исследования [60], измерения концентрации NT-proBNP не давали достоверных результатов при определении дисфункции левого желудочка. Это связано с перекрыванием значений концентрации NT-proBNP у людей, страдающих СН, с концентрациями пептида у здоровых людей. Однако авторы данной работы отмечают высокое негативное предсказательное значение NT-proBNP, что делает метод измерения концентрации в крови NT-proBNP простым и эффективным средством для определения отсутствия дисфункции левого желудочка у пациентов.

Измерение концентрации BNP и NT-proBNP может иметь прогностическое значение [2, 61]. У пациентов с хронической СН наиболее высокие концентрации BNP свидетельствуют о высокой вероятности смертельного исхода, независимо от возраста, степени тяжести заболевания по классификации NYHA, предшествующего инфаркта миокарда и фракции выброса левого желудочка. Измерение концентраций НП в крови также используется для предсказания необходимости пересадки сердца.

Показана также возможность использования BNP для лечения СН. Показано, что увеличение концентрации BNP в крови больных приводит к благоприятному эффекту [62]. При этом повышение концентрации можно производить двумя способами — внутривенным введением BNP и ингибированием нейтральной эндопептидазы, фермента, катализирующего распад натрийуретических пептидов.

Цели и задачи

В данной работе мы планировали провести исследование иммунохимических и биохимических свойств предшественника натрийуретического пептида В (proBNP) человека. Поскольку исследование эндогенного proBNP осложнено низким содержанием пептида в крови для исследований свойств предшественника BNP и факторов, оказывающих влияние на процессинг мы планировали использовать рекомбинантный proBNP, экспрессированный в эукариотических клеточных линиях. Таким образом, перед нами стояли следующие задачи:

1. Подобрать условия для экспрессии рекомбинантного proBNP в эукариотических клетках.
2. Осуществить очистку рекомбинантного proBNP из кондиционированной среды.
3. Охарактеризовать полученный рекомбинантный proBNP.
4. Исследовать факторы, оказывающие влияние на процессинг.

Материалы и методы

Рекомбинантные пептиды NT-proBNP и proBNP, используемые в данной работе, были предоставлены А.М. Федоровым из МНИИ Медицинской экологии. МАт, специфичные к NT-proBNP и BNP человека; антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, и антитела, конъюгированные с хелатом европия ТЕKES; векторы pCMV/myc/cyto (Invitrogen, Германия), содержащие кДНК proBNP или NT-proBNP человека, были предоставлены лабораторией «Химия ферментов». Ростовая среда DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium) — фирмы ICN Biomedicals (США). Унифектин-56TM — фирмы Unifect (ИБХ РАН, Россия). Колонка для гель-фильтрации Superdex 75 10/300 GL; набор стандартных белков для калибровки колонки — Low Molecular Weight Gel Filtration Calibration Kit; сефароза CL-4В — фирмы Amersham Biosciences (Швеция); набор реактивов для идентификации белков с использованием метода усиленной хемилюминесценции — ECL Advance Western Blotting Detection Kit; нитроцеллюлоза Hybond-ECL с диаметром пор 0,45 мкм — фирмы Amersham Biosciences (Швеция); 96-луночные планшеты для проведения иммуноанализа — фирмы COSTAR (США); нитроцеллюлоза с диаметром пор 0,22 мкм — фирмы Bio-Rad (США); о-гликозидаза и нейраминидаза фирмы — QA-Bio (США); набор реактивов для выделения плазмидной ДНК — Qiagen Plasmid Midi Kit (Германия); набор реактивов для идентификации гликопротеинов — GelCode Glycoprotein Staining Kit фирмы Pierce (США). Все остальные химические реактивы были производства фирмы SIGMA (США).

Рекомбинантный фурин (SIGMA) ингибитор фурина

Образцы плазмы больных, страдающих заболеваниями сердечно-сосудистой системы, были предоставлены городской клинической больницей № 67.

Трансфекция эукариотических клеток

Эукариотические клетки (НЕК 293, CHO-K1 и NIH 3T3) культивировали в ростовой среде DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium), содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 40 мкг/мл гентамицина, при температуре 37°C в CO₂-инкубаторе (парцильное давление CO₂ 5%). Трансфекцию клеток проводили с помощью реагента для трансфекции эукариотических клеток Унифектин-56™. Клетки трансфицировали вектором рCMV/мус/cyto, содержащим кДНК proBNP или кДНК NT-proBNP человека. Трансфекцию клеток проводили при достижении клетками 90-95% конfluenceности по протоколу для транзитной трансфекции адгерентных клеток, прилагаемому производителем.

Конъюгация антител с хелатом европия ТЕКЕС

Конъюгацию антител с хелатом европия проводили по следующей методике.

Подготовка антител. Антитела, хранящиеся в виде сульфатно-аммонийного осадка, переводили в 0,9 % раствор NaCl, используя гель-фильтрационную колонку NAP 5, уравновешенную этим раствором. Концентрация антител после перевода в 0,9 % NaCl составляла 2 мг/мл. После этого к раствору антител добавляли 0,5 М Na-карбонатный буфер, pH 9,8, из расчета 100 мкл буфера на 0,75 мл раствора антител.

Конъюгирование антител с хелатом европия ТЕКЕС. К раствору антител добавляли водный раствор хелата европия ТЕКЕС с концентрацией 1 мг/мл. Количество ТЕКЕС брали из расчета 1 мг хелата на 1 мг раствора антител. Инкубацию проводили в течение 16 часов при + 4 °С. Конъюгат антител с хелатом европия отделяли от несвязавшегося хелата европия на колонке NAP-10 в буфере, содержащем 0,01М Трис – HCl, pH 7,8, 0,15 М NaCl, 0,1% NaN₃. Активность полученных конъюгатов проверяли методом прямого флуороиммунного анализа.

Флуороиммунный анализ сэндвич типа (сэндвич-ФИА)

Принцип данного метода основан на использовании пары антител, специфичных к удаленным друг от друга эпитопам исследуемого антигена. Одно из антител сорбируется на полистирольной поверхности планшета для проведения иммуноанализа (антитела подложки). Другое антитело содержит в качестве метки хелат европия ТЕКЕС и используется в качестве детекторного.

Сэндвич-ФИА проводили по следующей методике. В лунки 96-луночного планшета сорбировали по 1 мкг специфичных к исследуемому антигену МАт, разведенных в 100 мкл

фосфатно-солевого буфера (10 мМ фосфата калия, 150 мМ NaCl, pH 7,4), и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Планшет два раза отмывали буфером А (0,01 М Трис-НСl, 0,15 М NaCl, 0,025 % Tween 20, 0,05 % NaN₃, pH 7,8). После этого в лунки вносили по 200 нг МАт, конъюгированных с хелатом европия, разведенных в 50 мкл буфера, содержащего 50мМ Трис-НСl, 0,9 % NaCl, 0,01 % Tween 40, 0,5 % БСА, 0,05 % NaN₃, pH 7,75. Затем в лунки вносили по 50 мкл исследуемого раствора и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Планшет шесть раз отмывали буфером А, после чего в лунки вносили по 200 мкл раствора усиления LANFIA (1,75 М NaSCN, 1М NaCl, 50 мМ глицин-NaOH, 0,5 мМ NaHCO₃, 5% глицерин, 20% пропанол-1, pH 10). Инкубировали в течение 3 минут при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Интенсивность флуоресценции измеряли на приборе Victor 1420 Multilabel counter.

Определение концентрации proBNP методом сэндвич-ФИА

Концентрации proBNP в образцах определяли методом сэндвич-ФИА. В качестве иммобилизованных на подложку антител мы использовали МАт 50Е1, специфичные к участку 102-108 АК молекулы proBNP человека, в качестве детекторных — МАт 16F3, специфичные к участку 13-20 АК молекулы proBNP человека. Для построения калибровочного графика (Рис. 5) в качестве антигена использовала рекомбинантный proBNP, экспрессированный в E.coli.

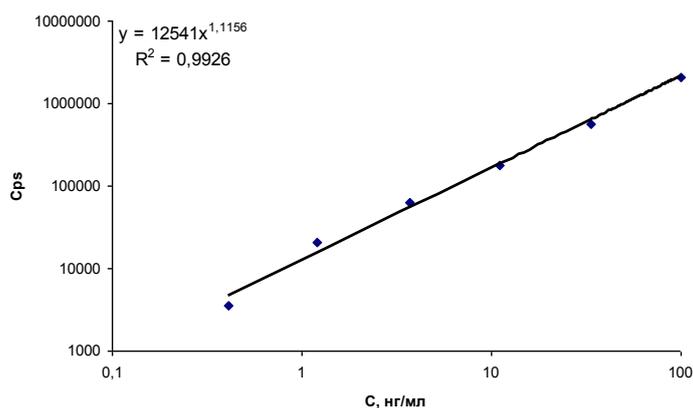


Рис. 5. Калибровочный график для определения концентрации proBNP методом сэндвич-ФИА в паре антител 50Е1-16F3. В качестве антигена использован рекомбинантный proBNP.

Гель-фильтрация

Гель-фильтрацию образцов объединенной культуральной среды НЕК 293, СНО-К1 и плазмы больных СН проводили на системе FPLC ÄKТАpurifier 10 (P-903). Разделение проводили на колонке Superdex 75 10/300 GL. Для уравнивания использовали буфер,

содержащий 0,1 М NaH_2PO_4 , 0,7 М NaCl , 5мМ ЭДТА, рН 7,4. Образцы наносили в объеме 150 мкл. Элюцию проводили со скоростью 0,7 мл/мин.

Колонку предварительно калибровали, используя набор стандартных белков: альбумин (Мм 67 кДа), овальбумин (Мм 43 кДа), химотрипсиноген (Мм 25 кДа), рибонуклеазу А (Мм 13,7 кДа), а также апротинин (Мм 6,517 кДа).

Аффинная хроматография

Для проведения аффинной хроматографии в качестве носителя использовали сефарозу CL-4В с иммобилизованными на ней МАт, специфичными к ргоBNP человека. Объем носителя, необходимый для проведения экстракции, рассчитывали с учетом 15-кратного молярного избытка антител по отношению к ожидаемому количеству антигена.

Носитель промывали буфером, содержащим 0,1 М глицин, рН 2, затем уравнивали буфером, содержащим 20мМ Трис-НСl, 150 мМ NaCl , рН 7,5. Перед нанесением на колонку кондиционированную ростовую среду центрифугировали при 10000 g в течение 15 мин, фильтровали через бумажный фильтр, добавляли ЭДТА до конечной концентрации 5 мМ и ингибиторы протеаз: пепстатин, PMSF, апротинин (разведение 1:1000 стоковых растворов согласно методике производителя). После нанесения образца колонку промывали сначала буфером, содержащим 20 мМ Трис-НСl, 700 мМ NaCl , рН 7,5, затем буфером, содержащим 20мМ Трис-НСl, 100 мМ NaCl , рН 7,5. Элюцию проводили 0,01 М раствором НСl. После этого колонку промывали буфером, содержащим 0,1 М глицин, рН 2.

Ионообменная хроматография на системе FPLC

Ионообменную хроматографию проводили на системе FPLC (fast protein liquid chromatography). В качестве носителя использовали карбоксиметилсефарозу (КМ-сефарозу). Хроматографию проводили на колонке HiTrapTM CM FF объемом 1 мл с использованием системы ÄKTApurifier 10 (P-903) Amersham Biosciences (Швеция). Колонку уравнивали буфером, содержащим 50мМ Na-ацетат, рН 4,2. Образец наносили на колонку со скоростью 1мл/мин. Элюцию проводили градиентом буфера, содержащего 50мМ Na-ацетат, 1М NaCl , рН 4,2 от 0 до 60%, длина градиента составляла 50 объемов колонки.

Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) в трис-трициновой буферной системе

Электрофорез в ПААГ в присутствии ДСН в трис-трициновой буферной системе представляет собой модифицированный метод электрофореза по Лэммли. Данный метод позволяет добиться лучшего разделения белков с небольшими молекулярными массами [63].

В данной работе использовали разделяющий гель с концентрацией акриламида (АА) и метиленбисакриламида (МБА): Т = 10% и С = 3%, промежуточный гель с Т = 10% и С = 3%, концентрирующий гель с Т = 4% и С = 3%. Гели готовили на буфере, содержащем 3,0 М Трис-НСl, рН 8,45, 0,3% ДСН. Конечная концентрация буфера в растворах, используемых для приготовления разделяющего и промежуточного гелей, составляла 1,0 М Трис-НСl, рН 8,45, 0,1% ДСН, для концентрирующего геля конечная концентрация буфера составляла 0,75 М Трис-НСl, рН 8,45, 0,075% ДСН. Кроме того, разделяющий гель содержал 13% (по объему) глицерина. Использовали катодный буфер, содержащий 0,1 М Трис-НСl, 0,1 М Трицин, рН 8,25, 0,1% ДСН; анодный буфер, содержащий 0,2 М Трис-НСl, рН 8,9.

Исследуемые образцы смешивали в соотношении 3:1 с буфером для образцов, содержащим 250 мМ Трис-НСl, рН 6,8, 40% глицерин, 8% ДСН, 10% β-меркаптоэтанол, бромфеноловый синий. Пробы инкубировали при температуре 100°C в течение 5 мин. Электрофоретическое разделение проводили при постоянном напряжении 150 В в течение 1 – 1,5 ч.

Идентификация гликопротеинов в ПААГ с помощью GelCode Glycoprotein Staining Kit

После проведения электрофоретического разделения идентификацию белковых полос в ПААГ проводили по методике, прилагаемой производителем к GelCode Glycoprotein Staining Kit. Данный метод идентификации гликопротеинов основан на окислении гликолей, содержащихся в гликопротеинах, до альдегидов, окрашиваемых в оттенки красного цвета.

Western blotting

Электроперенос белков на нитроцеллюлозную мембрану проводили в течение 30 мин при постоянном напряжении 100 В, в буфере, содержащем 25 мМ Трис-НСl, 192 мМ глицин, 10 % этанол (по объему), рН 8,3. Качество переноса и расположение белковых

полос определяли, окрашивая мембрану красителем Ponceau S. Затем мембрану промывали несколько раз раствором, содержащим Трис для удаления красителя Ponceau S.

Иммунохимическое окрашивание белков, иммобилизованных на нитроцеллюлозной мембране

Перед проведения иммунохимического окрашивания для блокирования мест неспецифического связывания антител нитроцеллюлозную мембрану инкубировали в 10% растворе сухого обезжиренного молока, приготовленном на ФСБТ (10 мМ KH_2PO_4 , pH 7,4, 150 мМ NaCl, 0,1% Tween-20), при постоянном перемешивании при комнатной температуре в течение 30 мин или при температуре $+4^\circ\text{C}$ в течение ночи. Затем нитроцеллюлозную мембрану инкубировали в течение часа при комнатной температуре и постоянном перемешивании в растворе антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, специфичных к исследуемому антигену, приготовленном на ФСБТ, содержащем 5% сухое обезжиренное молоко. Концентрация антител составляла 6 мкг/мл.

Отмывание не связавшихся с мембраной антител проводили ФСБТ. Для окрашивания белковых полос мембрану инкубировали в течение 5-15 минут в растворе хромогенного субстрата, содержащем 0,3 мг/мл 3,3'-диаминобензидина (ДАБ), 50 мМ Трис-HCl, pH 7,6, 0,03% H_2O_2 , 0,1 мг/мл NiCl_2 . Для остановки реакции мембрану промывали дистиллированной водой.

Идентификация белков с использованием метода усиленной хемилюминесценции (Enhanced Chemiluminescence, ECL)

Данный метод используется для детектирования белков, иммобилизованных на нитроцеллюлозную мембрану. В методе ECL используются субстраты, окисление которых перекисью водорода в реакции, катализируемой пероксидазой, приводит к испусканию квантов света в видимой области. Свечение детектируется при помощи высокочувствительной фотопленки. Метод усиленной хемилюминесценции отличается от метода иммунохимического окрашивания с использованием хромогенных субстратов значительно большей чувствительностью.

Детектирование белков проводили с использованием набора реактивов ECL Advance Western Blotting Detection Kit. Перед проведением ECL для блокирования мест неспецифического связывания антител нитроцеллюлозную мембрану после проведения электропереноса методом Western blotting инкубировали в 2 % блокирующем растворе, приготовленном на ФСБТ (10 мМ KH_2PO_4 , pH 7,4, 150 мМ NaCl, 0,1 % Tween-20), при

постоянном перемешивании, при комнатной температуре в течение 2 часов или при температуре + 4°C в течение ночи. Затем мембрану инкубировали в течение 3 часов при комнатной температуре и постоянном перемешивании в растворе антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, специфичных к исследуемому антигену, приготовленном на 2 % блокирующем растворе. Концентрация антител составляла 25 нг/мл.

Отмывание не связавшихся с мембраной антител проводили ФСБТ. Для идентификации белковых полос мембрану подсушивали на фильтровальной бумаге, наклеивали на кусок картона. Дальнейшие операции проводили в темной комнате при свете красного фонаря. Мембрану покрывали тонким слоем раствора субстрата. После этого мембрану помещали в прозрачный полиэтиленовый пакет, сверху накладывали фото пленку, фиксировали друг относительно друга, помещая в кассету для автордиографии. Экспонировали в течение 0,5 – 5 мин. По окончании инкубации пленку помещали в раствор для проявления и инкубировали при перемешивании до появления четких полос. Пленку отмывали дистиллированной водой и фиксировали в фиксирующем растворе в течение нескольких мин, снова промывали пленку дистиллированной водой и высушивали на воздухе.

Дегликозилирование proBNP

Для проведения энзиматического дегликозилирования образцы, содержащие proBNP, обрабатывали двумя гликозидазами, специфичными к O-типу гликозилирования, — о-гликозидазой и нейраминидазой. Реакцию проводили в 50 мМ Na-фосфатном буфере, pH 5,0. Содержание о-гликозидазы и нейраминидазы в пробах составляла 0,75 и 1,5 мЕд на 200 нг proBNP, соответственно. Общий объем пробы составлял 70 мкл. Пробу инкубировали в течение 4 часов при 37°C.

Экспрессия рекомбинантного proBNP в присутствии ингибитора фурина

Для экспрессии репроBNP в клеточной линии НЕК 293 в присутствии ингибитора фурина (деcanoил-Arg-Val-Lys-Arg-хлорметилкетон) после проведения временной трансфекции клетки культивировали, заменяя ростовую среду каждые сутки. На третьи сутки в ростовую среду добавляли ингибитор фурина до конечной концентрации 0,05 мМ. Клетки культивировали в присутствии ингибитора в течение суток, после чего среды собирали для проведения исследований.

Расщепление proBNP фурином in vitro

Для расщепления proBNP фурином к образцу, содержащему 30 нг proBNP добавляли различные количества рекомбинантного фурина. Реакцию проводили в буфере, содержащем 100 мМ HEPES, 3 мМ CaCl₂, 0,1 % Triton X-100, pH 7,2. Общий объем пробы составлял 35 мкл. Пробы инкубировали при 37°C. Реакцию останавливали, замораживая образцы при -70°C. Образцы proBNP, не содержащие фурин, инкубировали в тех же условиях.

Результаты и обсуждения

Экспрессия рекомбинантного proBNP человека в эукариотических клеточных линиях

Экспрессия рекомбинантного proBNP человека в эукариотической клеточной линии HEK 293

На первом этапе нашей работы мы подбирали условия для экспрессии рекомбинантного proBNP (resproBNP) в эукариотической экспрессионной системе. В качестве эукариотической экспрессионной системы нами была выбрана клеточная линия HEK 293, которая в настоящее время широко используется для экспрессии рекомбинантных белков. Для клеточной линии HEK 293 показан высокий уровень экспрессии рекомбинантных белков. Мы предположили, что экспрессируемый в клеточной линии HEK 293 resproBNP по биохимическим и иммунохимическим свойствам будет соответствовать эндогенному (циркулирующему в кровотоке) proBNP, поскольку клетки этой линии представляют собой клетки человека. Нам представлялось возможным использование resproBNP, экспрессированного в клеточной линии HEK 293 (resproBNP (HEK 293)), в качестве модели для исследования биохимических и иммунохимических свойств эндогенного proBNP человека. Необходимо отметить, что использование в качестве экспрессионной системы кардиомиоцитов человека осложнено отсутствием линии клеток данного типа, а работа с первичной культурой осложнена необходимостью постоянного получения новых клеток и низким уровнем экспрессии рекомбинантных белков.

Для экспрессии resproBNP человека в эукариотической клеточной линии HEK 293 мы проводили временную трансфекцию вектором pCMV/мус/суто, содержащим кДНК proBNP человека (pCMV/hproBNP). После проведения трансфекции сбор кондиционированной среды проводили каждые 24 часа в течение 10 суток. Для определения оптимального времени культивирования клеток и сбора кондиционированной среды после проведения временной трансфекции мы проводили измерение концентрации proBNP в образцах кондиционированной среды методом сэндвич-ФИА. В качестве антител, иммобилизованных на подложку, мы использовали МАт 50E1, специфичные к участку молекулы proBNP 102-108 АК (50E1₁₀₂₋₁₀₈). В качестве детекторных нами были выбраны МАт 16F3, специфичные к участку молекулы proBNP 13-20 АК (16F3₁₃₋₂₀). Ранее в нашей лаборатории было показано, что данная пара МАт (50E1₁₀₂₋₁₀₈-16F3₁₃₋₂₀) способна детектировать эндогенный proBNP с высокой

чувствительностью. Результаты измерения концентрации гесргоBNP в образцах культуральной среды представлены на Рис. 6.

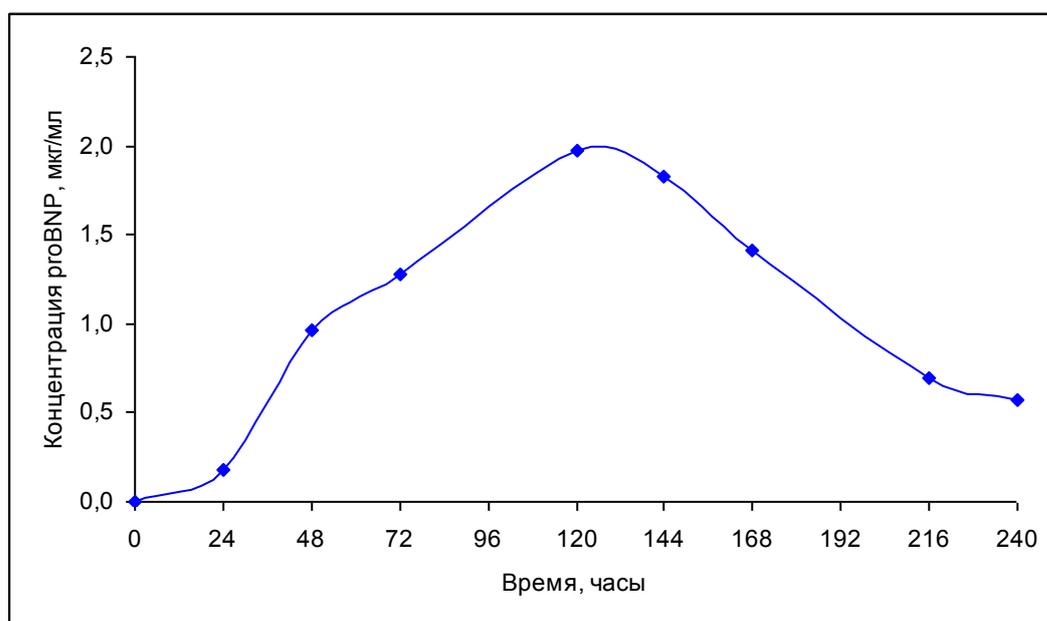


Рис. 6. Зависимость продукции гесргоBNP клетками HEK 293 от времени с момента проведения временной трансфекции. Концентрацию гесргоBNP в среде определяли методом сэндвич-ФИА в паре 50E1₁₀₂₋₁₀₈-16F3₁₃. 20.

Как видно из Рис. 6, продукция гесргоBNP клетками линии HEK 293 изменяется с течением времени. Максимум продукции гесргоBNP (HEK 293), наблюдается на пятые сутки (120 часов) после проведения трансфекции. Затем наблюдается уменьшение уровня продукции, вероятно, связанное с тем, что трансфицированные клетки менее жизнеспособны по сравнению с клетками, не содержащими плазмиду, и с тем, что при длительном росте клеток в монослое их жизнеспособность уменьшается. Основываясь на полученных результатах, в дальнейшем после проведения временной трансфекции мы проводили смену кондиционированной среды каждые 24 часа в течение 5 суток, для исследований использовали образцы кондиционированных сред, собранных на третьи, четвертые сутки (через 72-96 часов) после проведения временной трансфекции, поскольку в это время концентрация гесргоBNP в кондиционированной среде максимальна.

Анализ форм proBNP в кондиционированной среде клеток линии HEK 293, трансфицированных вектором pCMV/hproBNP, методом гель-фильтрации

Для того чтобы установить, происходит ли процессинг молекул предшественника при экспрессии гесргоBNP в клеточной линии HEK 293, мы провели разделение белков, содержащихся в кондиционированной среде, собранной после проведения временной трансфекции клеток HEK 293 вектором pCMV/hproBNP, методом гель-фильтрации. В полученных в результате разделения методом гель-фильтрации фракциях мы измерили

иммунохимическую активность форм proBNP методом сэндвич-ФИА в трех различных парах МАт: 50E1₁₀₂₋₁₀₈-16F3₁₃₋₂₀, 24C5₈₇₋₉₈-Ab2 и 15C4₆₃₋₇₁-13G12₁₃₋₂₀.

Измерение иммунохимической активности в паре 50E1₁₀₂₋₁₀₈-16F3₁₃₋₂₀ позволяет детектировать в образцах интактный (непроцессированный) proBNP, поскольку МАт 50E1₁₀₂₋₁₀₈, используемые в качестве антител, иммобилизованных на подложку, специфичны к С-концевому участку молекулы proBNP (соответствующему BNP-части), а детекторные антитела 16F3₁₃₋₂₀, специфичны к N-концевому участку молекулы proBNP (соответствующему NT-proBNP-части молекулы proBNP). Измерение иммунохимической активности в паре 24C5₈₇₋₉₈-Ab2 позволяет детектировать в образцах как proBNP, так и BNP. Это возможно благодаря тому, что антитела 24C5₈₇₋₉₈, используемые в качестве иммобилизованных на подложку специфичны к участку молекулы proBNP 87-98 АК, соответствующему BNP-части молекулы proBNP, а детекторные антитела Ab2 специфичны к иммунному комплексу, образованному МАт 24C5 с BNP.

Пара 15C4₆₃₋₇₁-13G12₁₃₋₂₀ была выбрана нами для определения содержания в образцах NT-proBNP, поскольку ранее в нашей лаборатории было показано, что измерение иммунохимической активности в данной паре позволяет определять концентрацию эндогенного NT-proBNP, но не proBNP в плазме больных, страдающих СН. Нами было показано, что возможность дифференциально определять в образцах содержание формы NT-proBNP при наличии формы proBNP связана с различиями в иммунохимических свойствах молекул NT-proBNP и proBNP, циркулирующими в крови больных на участке 63-76 АК. В нашей лаборатории было показано, что МАт 15C4₆₃₋₇₁ взаимодействуют с NT-proBNP с высоким аффинитетом, тогда как с proBNP они практически не взаимодействуют из-за высокой степени гликозилирования данного участка молекулы proBNP.

Таким образом, измерение иммунохимической активности методом сэндвич-ФИА в трех вышеперечисленных парах МАт позволяет определить содержание различных форм гесproBNP в кондиционированной среде и показать наличие или отсутствие процессинга гесproBNP в клетках НЕК 293. Результаты измерения иммунохимической активности во фракциях, полученных после разделения методом гель-фильтрации, представлены на Рис. 7.

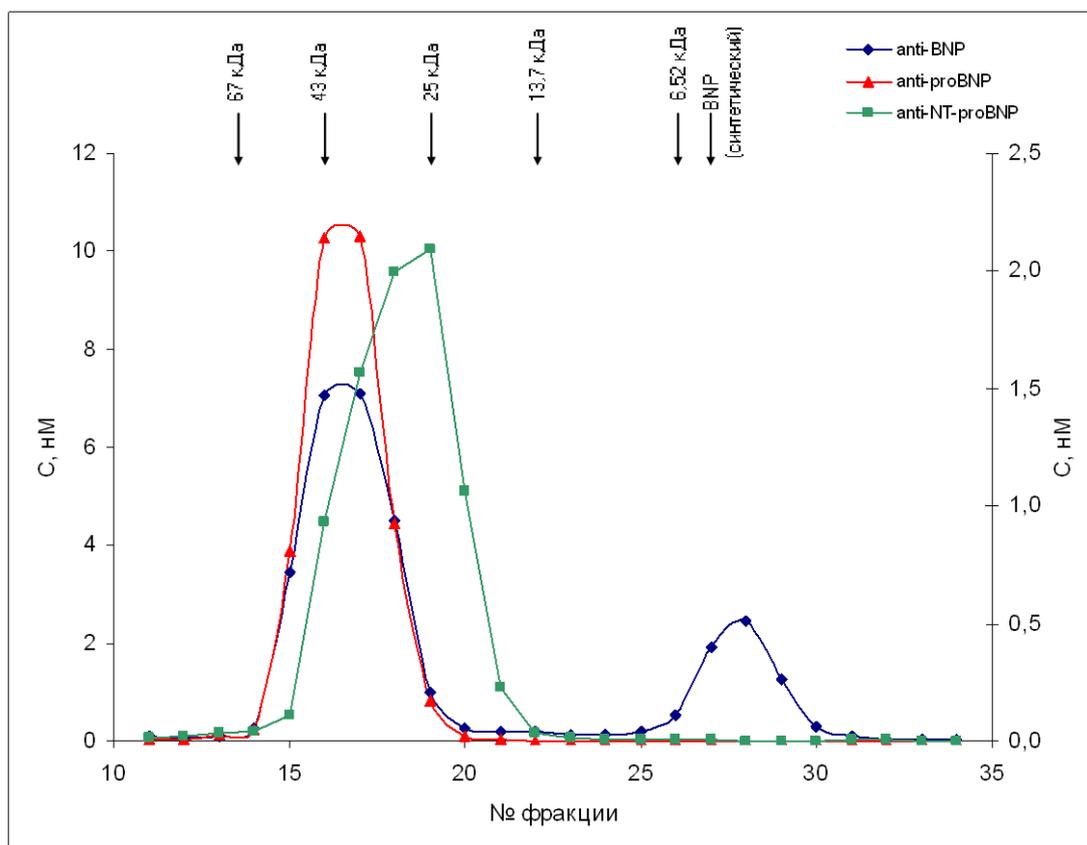


Рис. 7. Результаты измерения иммунохимической активности во фракциях, полученных после гель-фильтрации (Superdex 75) кондиционированной среды клеток НЕК 293, трансфицированных вектором рCMV/hproBNP. Иммунохимическая активность во фракциях была измерена методом сэндвич-ФИА в трех парах МАт: 24C5₈₇₋₉₈-Ab2 (anti-BNP), 50E1₁₀₂₋₁₀₈-16F3₁₃₋₂₀ (anti-proBNP), 15C4₆₃₋₇₁-13G12₁₃₋₂₀ (anti-NT-proBNP). Стрелками указаны положения маркеров молекулярной массы и положение пика синтетического BNP.

Анализируя результаты, полученные при измерении иммунохимической активности в паре МАт 24C5₈₇₋₉₈-Ab2, следует отметить наличие двух пиков активности. Первый пик соответствует высокомолекулярной форме — proBNP, второй пик соответствует низкомолекулярной форме пептида, вероятно, BNP. Данные предположения подтверждаются при сравнении результатов измерения иммунохимической активности в парах МАт 24C5₈₇₋₉₈-Ab2 и 50E1₁₀₂₋₁₀₈-16F3₁₃₋₂₀. Так, совпадение первого пика иммунохимической активности, измеренной в паре МАт 24C5₈₇₋₉₈-Ab2 с пиком, детектируемым в паре МАт 50E1₁₀₂₋₁₀₈-16F3₁₃₋₂₀, показывает, что этот пик соответствует интактному proBNP. Положение низкомолекулярного пика совпадает с положением синтетического BNP, что позволяет предполагать наличие формы BNP. Сравнивая данные, полученные при измерении иммунохимической активности в парах МАт 50E1₁₀₂₋₁₀₈-16F3₁₃₋₂₀ и 15C4₆₃₋₇₁-13G12₁₃₋₂₀, следует отметить, что пики иммунохимической активности в этих парах МАт сдвинуты друг относительно друга. По сравнению с пиком иммунохимической активности, полученным при измерении в паре МАт 50E1₁₀₂₋₁₀₈-16F3₁₃₋₂₀ (anti-proBNP), положение пика иммунохимической активности, определенное в

паре МАт 15С4₆₃₋₇₁-13G12₁₃₋₂₀, характерно для пептидов с меньшей молекулярной массой. Основываясь на различиях в подвижности при разделении методом гель-фильтрации, можно заключить, что пик иммунохимической активности, детектируемый при измерении в паре МАт 15С4₆₃₋₇₁-13G12₁₃₋₂₀, вероятно, обусловлен наличием в кондиционированной среде формы N-концевого фрагмента молекул предшественника (NT-proBNP). Можно предположить, что для NT-proBNP, содержащегося в кондиционированной среде, также как и для эндогенного NT-proBNP (циркулирующего в кровотоке) характерно отличие в иммунохимических свойствах по сравнению с proBNP.

Таким образом, разделение методом гель-фильтрации показало наличие в образцах кондиционированной среды клеток НЕК 293, трансфицированных вектором рСМV/hproBNP, трех форм proBNP: непроцессированного proBNP и двух продуктов процессинга молекул предшественника, BNP и NT-proBNP. Полученный результат свидетельствует о присутствии в клетках линии НЕК 293 конвертазы прогормонов, способной осуществлять процессинг молекул proBNP. Однако наличие в кондиционированной среде трансфицированных клеток непроцессированных молекул предшественника в концентрациях, значительно превышающих концентрации продуктов процессинга, свидетельствует о неполном прохождении процессинга.

Исследование биохимических и иммунохимических свойств гесproBNP, экспрессированного в клеточной линии НЕК 293

Для исследования биохимических и иммунохимических свойств гесproBNP (НЕК 293), мы проводили его выделение из кондиционированной среды с последующей очисткой. На первой стадии была проведена экстракция гесproBNP из кондиционированной среды клеток НЕК 293, трансфицированных вектором рСМV/hproBNP, методом аффинной хроматографии. В качестве носителя для проведения аффинной экстракции мы использовали сефарозу CL-4B с иммобилизованными МАт 50E11₁₀₂₋₁₀₈ и 24C5₈₇₋₉₈, специфичными к BNP-части молекулы предшественника. Использование носителя, содержащего антитела, специфичные к С-концевому участку молекулы, позволяет проводить эффективную экстракцию гесproBNP из культуральной среды, так как по данным работы [49] этот участок молекулы гесproBNP не содержит углеводных остатков и, следовательно, хорошо доступен для взаимодействия с антителами. Вторая стадия очистки гесproBNP заключалась в ионообменной хроматографии на КМ-сефарозе (см. «Материалы и методы»). В полученных после проведения ионообменной хроматографии фракциях измеряли иммунохимическую активность гесproBNP методом сэндвич-ФИА в паре МАт 50E1102-108-16F313-20.

Фракции с максимальным содержанием гесproBNP объединяли для дальнейших исследований.

Образцы полученного после очистки рекомбинантного proBNP были проанализированы методом электрофореза в ПААГ в трис-трициновой системе в присутствии ДСН, также было проведено иммунохимическое окрашивание на нитроцеллюлозной мембране после электропереноса методом Western blotting. Результаты представлены на Рис. 8.

Рис. 8. А – результат окрашивания ПААГ раствором кумасси R-250 после проведения электрофоретического разделения. 1- рекомбинантный proBNP, экспрессированный в клеточной линии НЕК 293, 2 - рекомбинантный proBNP, экспрессированный в *E. coli*. Б – результата окрашивания рекомбинантного proBNP, экспрессированного в клеточной линии НЕК 293, при помощи набора для идентификации гликопротеинов в ПААГ после проведения электрофоретического разделения. В – иммунохимическое окрашивание МАт 15F11, специфичными к участку молекулы proBNP 13-24 АК. 1 - рекомбинантный proBNP, экспрессированный в клеточной линии НЕК 293, 2 - рекомбинантный proBNP, экспрессированный в *E. coli*.

После проведения электрофоретического разделения для идентификации белковых полос мы проводили окрашивание раствором кумасси R-250 (Рис. 8 А) и набором для идентификации гликопротеинов (Рис. 8 Б).

Из Рис. 8 А (дорожка 1) видно, что гесproBNP (НЕК 293) характеризуется значительно меньшей электрофоретической подвижностью по сравнению с гесproBNP, экспрессированным в *E. coli* (гесproBNP (*E. coli*)) (Рис. 8 А, дорожка 2). Это объясняется тем, что в эукариотических клетках proBNP подвергается посттрансляционной модификации — гликозилированию, тогда как в прокариотических клетках (*E. coli*) белки не подвергаются посттрансляционным модификациям. Также необходимо отметить, что полоса гесproBNP (НЕК 293) более диффузная по сравнению с полосой гесproBNP (*E. coli*), что, вероятно, объясняется гетерогенностью форм гесproBNP (НЕК 293), отличающихся по молекулярной массе из-за различного состава сахаров, входящих в углеводную часть гликопротеина. Окрашивание гесproBNP (НЕК 293) при помощи набора для идентификации гликопротеинов (Рис. 8 Б, дорожка 1) подтверждает наличие ковалентно связанных с гесproBNP (НЕК 293) углеводных остатков.

При помощи метода иммунохимического окрашивания на нитроцеллюлозной мембране после электропереноса методом Western blotting нами было показано, что антитела 15F1113-24, специфичные к N-концевой части молекулы proBNP человека, взаимодействуют с гесproBNP (НЕК 293) с высоким аффинитетом (Рис. 8 В, дорожка 1). Полоса, полученная при окрашивании гесproBNP (НЕК 293) (Рис. 8 В, дорожка 1), более

широкая и диффузная по сравнению с полосой гесproBNP (*E. coli*) (Рис. 8 В, дорожка 2), вероятно, это может быть связано с тем, что при экспрессии гесproBNP в клеточной линии НЕК 293 образуются формы предшественника, отличающиеся по составу и/или содержанию углеводной части. Однако следует отметить, что на N-конце молекулы гесproBNP (НЕК 293), вероятно, отсутствуют посттрансляционные модификации, поскольку МАт 15F11₁₃₋₂₄ взаимодействуют с гесproBNP (НЕК 293) с высоким аффинитетом. Таким образом, используя метод электрофореза в ПААГ и Western blotting в сочетании с тремя различными методами идентификации белков, мы показали, что гесproBNP, экспрессируемый в клеточной линии НЕК 293, является гликопротеином.

Сравнение иммунохимических свойств рекомбинантного proBNP со свойствами эндогенного proBNP

В данной работе для исследований свойств proBNP человека мы планировали использовать рекомбинантный proBNP, экспрессированный в эукариотической клеточной линии, поскольку исследование эндогенного осложнено низкими концентрациями proBNP в крови. Мы предполагали, что гесproBNP (НЕК 293) будет соответствовать по иммунохимическим свойствам эндогенному proBNP. Для проверки этого предположения мы проводили исследование и сравнение иммунохимических свойств гесproBNP (НЕК 293) со свойствами эндогенного proBNP человека методом сэндвич-ФИА. Нами были выбраны 6 МАт, специфичных к различным участкам молекулы proBNP (Таблица 1). Антитела были подобраны таким образом, что их эпитопы перекрывали всю последовательность N-концевого фрагмента молекулы proBNP (участок 1-76 АК, что соответствует последовательности молекулы NT-proBNP). Выбранные МАт мы использовали в качестве антител подложки. В качестве детекторных были выбраны МАт 24C5₈₇₋₉₈, специфичные к C-концевому участку молекулы proBNP человека, который, по данным, полученным ранее в нашей лаборатории, а также в работе [49], не содержит углеводных остатков и хорошо доступен для взаимодействия с антителами. Таким образом, использование в качестве детекторных антител МАт 24C5₈₇₋₉₈, позволяет нам выявлять различия в доступности участков молекулы proBNP для взаимодействия с антителами подложки. Все выбранные для проведения анализа МАт были способны взаимодействовать с гесproBNP (*E.coli*).

Таблица 1. Эпитопы МАт, специфичных к proBNP человека.

МАт	5B6	1D4	11D1	16D10	15C4	24E11
Эпитоп (АК)	1-12	13-24	31-39	46-56	63-71	67-76

Измерение иммунохимической активности hсproBNP мы проводили в образцах кондиционированной среды клеток НЕК 293, трансфицированных вектором рСМV/hproBNP; измерение иммунохимической активности эндогенного proBNP – в образцах объединенной плазмы больных СН. Выбранный нами метод измерения иммунохимической активности позволял дифференциально детектировать только proBNP в присутствии NT-proBNP и VNP, поскольку МАт подложки специфичны к различным участкам N-концевого фрагмента молекулы proBNP (соответствующего NT-proBNP), а детекторные МАт специфичны к С-концевой части молекулы proBNP (соответствующей VNP). Таким образом, используемые нами пары МАт позволяли детектировать proBNP в кондиционированной среде и в плазме без стадии выделения proBNP из образцов.

Методом сэндвич-ФИА мы определяли концентрации hсproBNP (НЕК 293) и эндогенного proBNP, используя в качестве калибратора hсproBNP (*E. coli*). В качестве контрольной была выбрана пара МАт 1D4₁₃₋₂₄-24C5₈₇₋₉₈, поскольку значение концентрации proBNP, измеренное в данной паре являлось максимальным. Результаты измерения иммунохимической активности с использованием различных пар МАт мы представляли в виде отношения значения концентрации proBNP в исследуемой паре к значению концентрации, измеренной в паре 1D4₁₃₋₂₄-24C5₈₇₋₉₈, выраженного в % (Рис. 9).

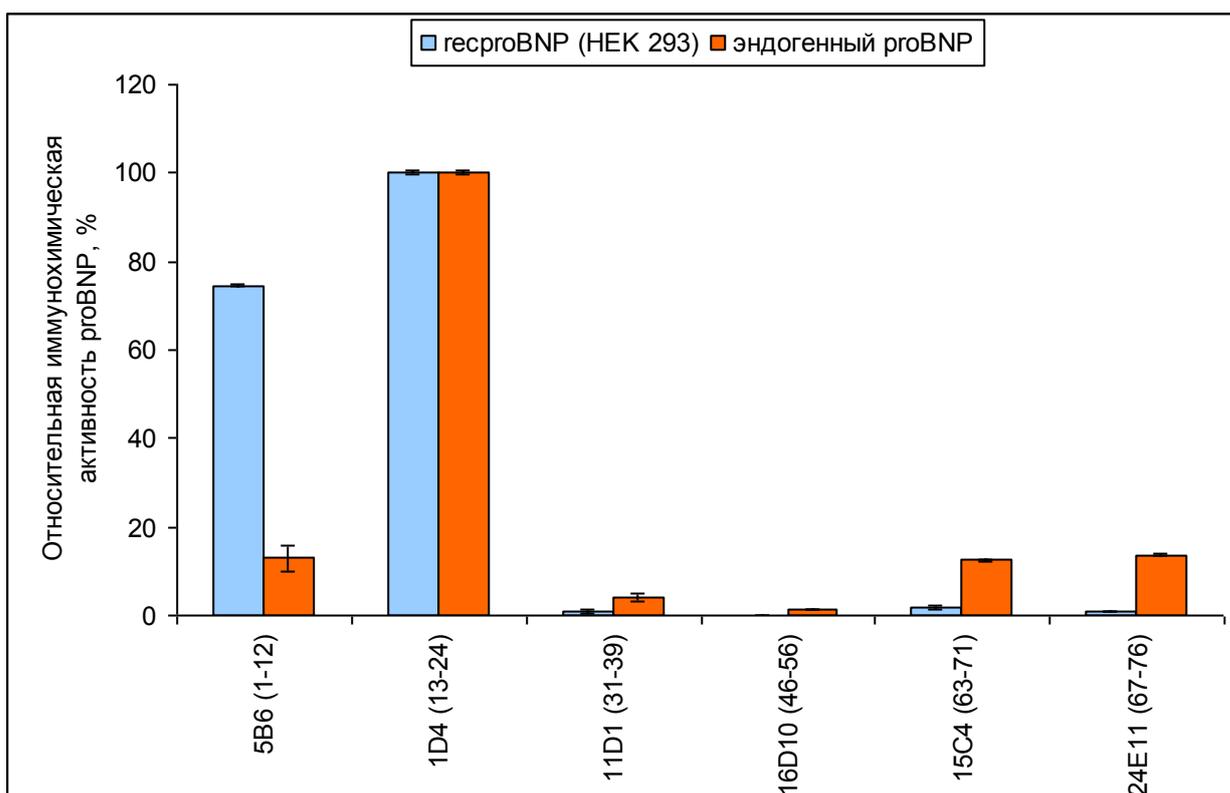


Рис. 9. Результаты измерения иммунохимической активности эндогенного и рекомбинантного proBNP. На оси абсцисс указаны МАт подложки, в скобках указаны участки молекулы proBNP (АК), к которым они специфичны; по оси ординат отложено соотношение значений концентраций, измеренных методом сэндвич-ФИА в исследуемой паре и в паре 1D4₁₃₋₂₄-24C5₈₇₋₉₈, выраженное в %.

Из Рис. 9 видно сходство в участках рекомбинантного и эндогенного proBNP, недоступных или мало доступных для взаимодействия с антителами. Эти данные позволяют предположить, что гесproBNP имеет сходные с эндогенным proBNP участки гликозилирования. Однако мы также наблюдаем различия в степени доступности некоторых участков эндогенного и рекомбинантного proBNP. Так, для участка 63-76 АК молекулы эндогенного proBNP характерна большая степень доступности для взаимодействия с антителами по сравнению с гесproBNP. Мы предполагаем, что наблюдаемые различия связаны с большей степенью гликозилирования молекул гесproBNP на участке молекулы 63-76 АК. Также следует отметить большую доступность гесproBNP для взаимодействия с МАт, специфичными к участку 1-12 АК. Вероятно, это связано с тем, что гесproBNP представлен в полноразмерной форме, в то время как для эндогенного proBNP характерно отщепление нескольких АК с N-конца молекулы. Предположение о протеолитической деградации молекул proBNP, циркулирующих в крови, подтверждается данными, [полученными в работе \(\)](#) и нашими экспериментами по изучению стабильности эндогенного proBNP (данные не представлены).

Таким образом, основываясь на полученных результатах, мы можем предположить, что при экспрессии в клеточной линии HEK 293 гесproBNP имеет сходные с эндогенным

сайты гликозилирования, но, вероятно, для рекомбинантного proBNP характерна большая степень гликозилирования по сравнению с эндогенным proBNP.

Иммунохимические свойства дегликозилированного гесproBNP (НЕК 293)

Исследование иммунохимических свойств гесproBNP (НЕК 293) позволило нам выявить различия в доступности разных участков молекулы предшественника для взаимодействия с антителами. По данным, полученным ранее в нашей лаборатории при исследовании свойств эндогенного proBNP, недоступность участков молекулы эндогенного proBNP для взаимодействия с МАт вызвана наличием в этих участках ковалентно связанных углеводных остатков. Мы предположили, что недоступность участков молекул гесproBNP (НЕК 293) также объясняется О-гликопротеиновой природой гесproBNP.

Для того чтобы подтвердить, что недоступность участков молекул гесproBNP для взаимодействия с антителами связана с гликозилированием молекул гесproBNP, мы проводили дегликозилирование гесproBNP (НЕК 293) с помощью ферментов, специфичных к углеводным структурам О-типа. Полученный нами после очистки методом аффинной и ионообменной хроматографии гесproBNP (НЕК 293) был обработан гликозидазами, специфичными к О-типу гликозилирования, — о-гликозидазой и нейраминидазой (см. «Материалы и методы»). В образцах гесproBNP (НЕК 293), полученных после дегликозилирования и не обработанных гликозидазами, проводили измерение иммунохимической активности методом сэндвич-ФИА по методике, описанной выше. В данном эксперименте вместо МАт 1D4₁₃₋₂₄ были взяты МАт 15F11₁₃₋₂₄ с такой же эпитопной специфичностью. В качестве контрольной пары была выбрана пара МАт 15F11₁₃₋₂₄-24C5₈₇₋₉₈, поскольку значение концентрации proBNP, измеренное в данной паре являлось максимальным. Результаты измерения иммунохимической активности представлены на Рис. 10.

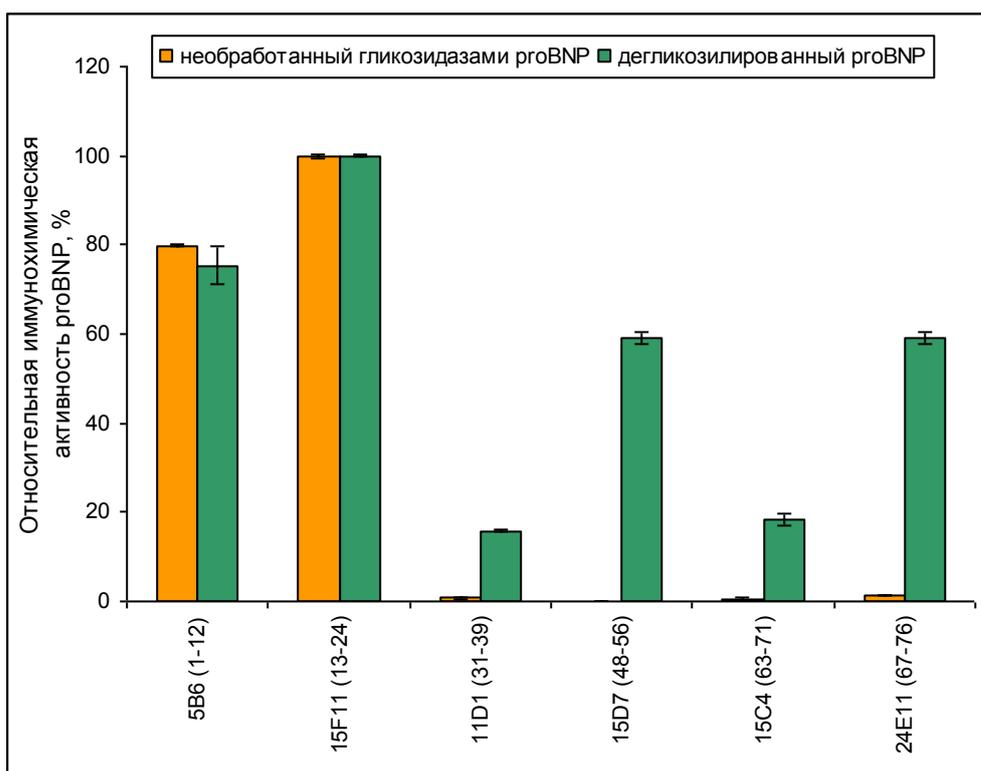


Рис. 10. Результаты измерения иммунохимической активности в образцах гесргоBNP (HEK 293) до и после обработки гликозидазами. На оси абсцисс указаны МАТ подложки, в скобках указаны участки молекулы proBNP (АК), к которым они специфичны; по оси ординат отложено соотношение значений концентраций, измеренных методом сэндвич-ФИА в исследуемой паре и в паре 15F11-24C5, выраженное в %.

Анализируя полученные результаты (Рис. 10), можно отметить увеличение степени доступности гесргоBNP (HEK 293) на центральном участке (31-76 АК) для взаимодействия с антителами после обработки гликозидазами. Центральный участок молекулы необработанного гликозидазами гесргоBNP практически недоступен для взаимодействия с МАТ, в то время как в образцах дегликозилированного гесргоBNP на данном участке наблюдается значительное увеличение иммунохимической активности. Так, на участках молекулы 48-56 АК и 67-76 АК иммунохимическая активность увеличивается на 60 %, на участках 31-39 АК и 63-71 АК — на 16 и 18 %, соответственно. На N-концевом участке (1-24 АК) молекулы гесргоBNP (HEK 293) дегликозилирование не приводит к увеличению иммунохимической активности в образцах. Обработка образцов гликозидазами не приводит к увеличению доступности N-концевого участка (1-24 АК) молекулы proBNP для взаимодействия с антителами. Это, вероятно, объясняется отсутствием ковалентно присоединенных углеводных остатков на данном участке молекул предшественника BNP.

Иммунохимическое окрашивание гесproBNP (НЕК 293) до и после дегликозилирования

Иммунохимические свойства гесproBNP (НЕК 293) мы исследовали также методом иммунохимического окрашивания на нитроцеллюлозной мембране после электропереноса методом Western blotting. Для данного исследования нами были использованы образцы очищенного методом аффинной и ионообменной хроматографии гесproBNP (НЕК 293). Дегликозилирование очищенного гесproBNP проводили по стандартной методике (см. «Материалы и методы»). Иммунохимическое окрашивание образцов гесproBNP (необработанных гликозидазами и после проведения дегликозилирования) на НЦ мембране после электропереноса методом Western blotting проводили с помощью МАт, специфичных к трем различным участкам молекулы proBNP человека, конъюгированными с пероксидазой хрена (Рис. 11).

Рис. 11. Иммунохимическое окрашивание гесproBNP (НЕК 293) МАт 29D12₅₋₁₂ (А), 15F11₁₃₋₂₄ (Б), 24E11₆₇₋₇₆ (В). 1 – образцы, необработанные гликозидазами; 2 – образцы дегликозилированного гесproBNP (НЕК 293).

Анализируя полученные данные (Рис. 11) можно отметить, что МАт, специфичные к N-концевой части молекулы proBNP (29D12₅₋₁₂ и 15F11₁₃₋₂₄) взаимодействуют с высоким аффинитетом как с необработанным гликозидазами, так и с дегликозилированным гесproBNP (НЕК 293). Данный результат подтверждает полученные нами ранее данные о том, что N-концевой участок молекул гесproBNP не содержит ковалентно связанных углеводных остатков. Также следует отметить большую электрофоретическую подвижность дегликозилированного proBNP по сравнению с образцом гесproBNP, необработанным гликозидазами. Это, по-видимому, связано с уменьшением молекулярной массы гесproBNP после отщепления остатков сахаров при дегликозилировании. Из Рис. 11 В видно, что МАт 24E11₆₇₋₇₆, специфичные к участку, примыкающему к области расщепления молекулы proBNP, не взаимодействуют с образцом необработанного гликозидазами гесproBNP (НЕК 293), в то время как с дегликозилированным гесproBNP эти антитела связываются с высоким аффинитетом. Полученный результат подтверждает наше предположение о том, что недоступность участков гесproBNP для взаимодействия с антителами обусловлена O-гликозилированием молекул гесproBNP.

Таким образом, используя метод энзиматического дегликозилирования в сочетании с методами сэндвич-ФИА и иммунохимического окрашивания на НЦ мембране, мы показали, что недоступность участков молекулы гесproBNP (НЕК 293) для

взаимодействия с антителами, также как и в случае эндогенного proBNP (показано ранее), обусловлена наличием ковалентно присоединенных углеводных остатков.

Иммунохимические свойства гesproBNP, экспрессированного в различных эукариотических клеточных линиях

В данной работе нами было показано, что при экспрессии гesproBNP в клеточной линии НЕК 293 образующийся рекомбинантный пептид имеет сходные участки гликозилирования с эндогенным proBNP, однако наблюдаются некоторые отличия в иммунохимических свойствах рекомбинантного и эндогенного proBNP. Мы предположили, что при экспрессии в других эукариотических клеточных линиях будут наблюдаться различия в иммунохимических свойствах гesproBNP. Для дальнейших исследований свойств proBNP помимо НЕК 293 для экспрессии гesproBNP нами были выбраны две другие эукариотические клеточные линии: CHO-K1 и NIH 3T3. Выбранные клеточные линии являются клетками млекопитающих и также широко используются для получения рекомбинантных белков. Линия CHO-K1 (Chinese hamster ovary) представляет собой эпителиальные клетки яичника китайского хомяка, NIH 3T3 (National Institutes of Health 3T3) — фибробласты мыши. Мы планировали провести сравнение иммунохимических свойств гesproBNP, полученных в различных эукариотических клеточных линиях, для более детального исследования свойств proBNP и его процессинга. Также предполагалось исследовать иммунохимические свойства NT-proBNP, образующиеся при процессинге молекул предшественника в различных клеточных линиях.

Для экспрессии гesproBNP мы проводили трансфекцию клеток линий НЕК 293, CHO-K1 и NIH 3T3 вектором pCMV/hproBNP. Основываясь на результатах, полученных ранее при подборе условий экспрессии proBNP в клеточной линии НЕК 293, для исследований иммунохимических свойств proBNP мы проводили сбор кондиционированной среды на четвертые или пятые сутки после проведения трансфекции. Собранные кондиционированные среды анализировали методом сэндвич-ФИА по методике, описанной выше для исследования иммунохимических свойств гesproBNP (НЕК 293). Результаты, полученные при измерении иммунохимической активности гesproBNP в кондиционированных средах НЕК 293, CHO-K1 и NIH 3T3, трансфицированных вектором pCMV/hproBNP, представлены на Рис. 12.

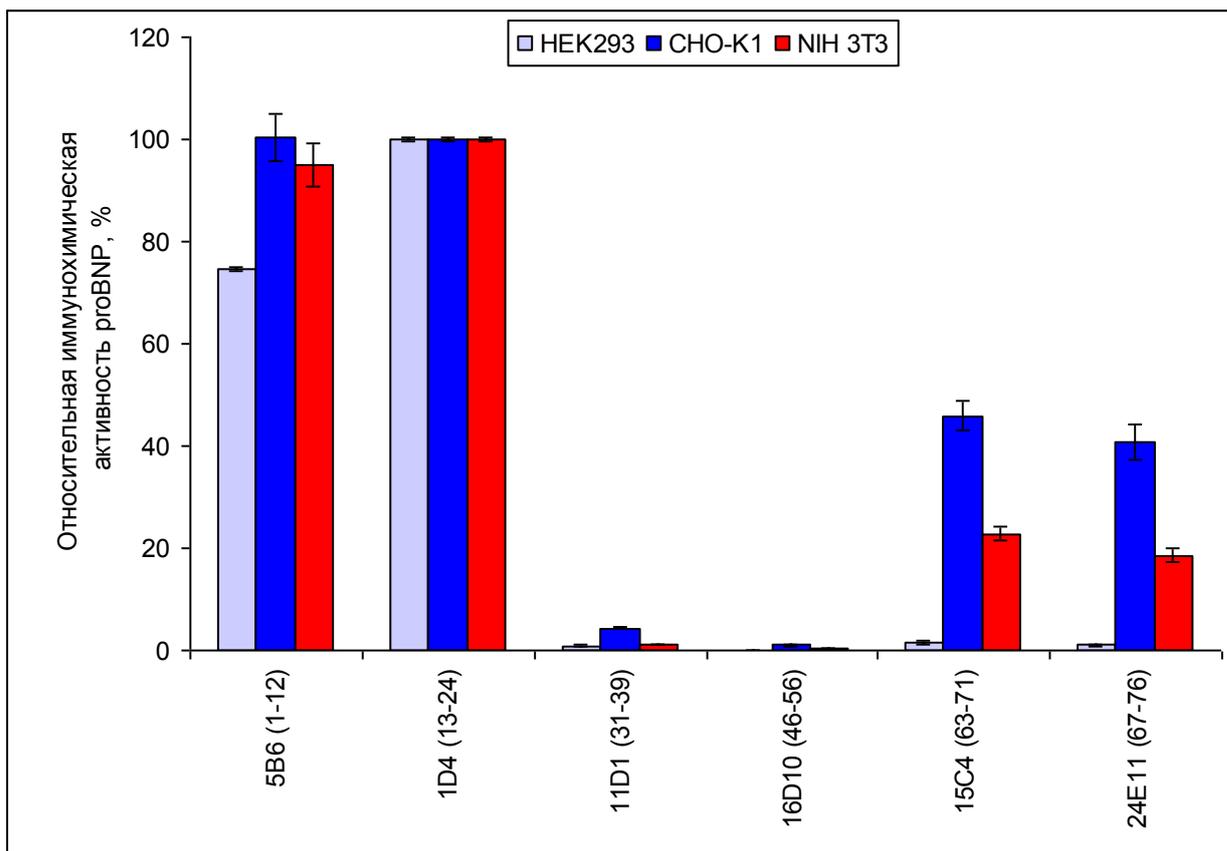


Рис. 12. Результаты измерения иммунохимической активности геср70BPN в образцах культуральных сред HEK 293, CHO-K1 и NIH 3T3, трансфицированных вектором pCMV/hp70BPN. На оси абсцисс указаны МАТ подложки, в скобках указаны участки молекулы р70BPN (АК), к которым они специфичны; по оси ординат отложено соотношение значений концентраций, измеренных методом сэндвич-ФИА в исследуемой паре и в паре 1D4-24C5, выраженное в %.

Анализируя полученные результаты (Рис. 12), можно отметить сходство молекул геср70BPN, экспрессированных различными клеточными линиями, по степени доступности для взаимодействия с МАТ на участке молекулы р70BPN 1-56 АК. Так, N-концевые части всех исследуемых геср70BPN (1-24 АК) хорошо доступны для взаимодействия с МАТ, вероятно, из-за отсутствия гликозилирования на данном участке молекул. Центральный участок молекул геср70BPN (31-56 АК), напротив, практически недоступен для взаимодействия с МАТ, что, по-видимому, связано с высокой степенью гликозилирования молекул на данном участке. На С-концевом участке молекулы геср70BPN (63-76 АК), экспрессированные в разных клеточных линиях, отличаются по степени доступности для взаимодействия с МАТ. Степень доступности молекул геср70BPN на участке 63-76 АК для взаимодействия с МАТ увеличивается в ряду: геср70BPN (HEK 293), геср70BPN (NIH 3T3) и геср70BPN (CHO-K1). Данные различия связаны, по-видимому, с различной степенью гликозилирования на данном участке молекул геср70BPN, экспрессированных в разных клеточных линиях. Полученные результаты

свидетельствуют о различиях иммунохимических свойств рекомбинантных белков, экспрессируемых в различных эукариотических линиях.

Исследование иммунохимических свойств NT-proBNP, полученных при процессинге proBNP, экспрессированного в клеточных линиях HEK 293, CHO-K1 и NIH 3T3

Основываясь на данных, полученных при анализе содержания форм гесproBNP в образцах кондиционированной среды, собранной после проведения временной трансфекции клеток HEK 293 вектором pCMV-hproBNP, мы предположили, что иммунохимические свойства NT-proBNP, образующегося при процессинге молекул предшественника (proBNP), могут отличаться от иммунохимических свойств гесproBNP. Нами было проведено исследование иммунохимических свойств NT-proBNP, полученных при процессинге гесproBNP, экспрессированных в клеточных линиях HEK 293, CHO-K1 и NIH 3T3. Мы предполагали, что сравнение иммунохимических свойств гесproBNP и NT-proBNP, полученного при его процессинге, может быть полезным для понимания механизмов процессинга молекул предшественника BNP.

Исследование иммунохимических свойств мы проводили методом сэндвич-ФИА. Нами были выбраны 6 МАт, специфичных к различным участкам молекулы NT-proBNP человека. Все выбранные для проведения анализа МАт были способны взаимодействовать с рекомбинантным NT-proBNP, экспрессированным в *E. coli* (recNT-proBNP (*E.coli*)). Антитела были подобраны таким образом, что их эпитопы перекрывали всю последовательность молекулы NT-proBNP человека. Выбранные для анализа МАт мы использовали в качестве иммобилизованных на подложку антител. В качестве детекторных антител в парах с антителами подложки, эпитопы которых расположены на N-концевом участке молекулы NT-proBNP (1-24 АК), мы использовали МАт 24E11₆₇₋₇₆, специфичные к C-концевому участку молекулы NT-proBNP. В парах с антителами подложки, эпитопы которых расположены на центральном и C-концевом участках молекулы NT-proBNP (28-76 АК), — МАт 13G12₁₃₋₂₀, специфичные к N-концевому участку молекулы NT-proBNP. Использование двух детекторных МАт, эпитопы которых пространственно удалены друг от друга, вызвано тем, что при анализе методом сэндвич-ФИА в парах МАт, в которых эпитопы иммобилизованных на подложку антител расположены вблизи эпитопов детекторных антител, наблюдается отсутствие сигнала, тогда как использование двух детекторных МАт, имеющих пространственно удаленные эпитопы, позволяет исследовать иммунохимические свойства всех участков молекулы NT-proBNP.

Исследование иммунохимических свойств гесNT-proBNP мы проводили в образцах кондиционированной среды клеток НЕК 293, CHO-K1 и NIH 3T3, трансфицированных вектором рCMV/hproBNP. Однако измерение иммунохимической активности NT-proBNP непосредственно в кондиционированной среде, по методике, использованной для исследования свойств proBNP, было невозможно из-за присутствия в кондиционированной среде большого количества гесproBNP. Пропуская образцы кондиционированных сред через аффинный носитель с иммобилизованными МАт, специфичными к BNP-части молекулы proBNP (24C5₈₇₋₉₈ и 50E1₁₀₂₋₁₀₈), мы удаляли proBNP из исследуемых образцов кондиционированных сред. Иммунохимическая активность proBNP, измеренная методом сэндвич-ФИА в паре МАт 50E1₁₀₂₋₁₀₈-16F3₁₃₋₂₀, в полученных образцах составляла не более 5 % от исходной. Таким образом, после удаления proBNP из кондиционированной среды становилось возможным исследование иммунохимических свойств NT-proBNP, полученных при процессинге молекул предшественника в клеточных линиях НЕК 293, CHO-K1 и NIH 3T3. В каждой паре МАт методом сэндвич-ФИА мы определяли концентрации NT-proBNP в полученных после удаления proBNP образцах кондиционированной среды, используя в качестве калибратора гесNT-proBNP (*E. coli*). В качестве контрольной пары была выбрана пара МАт 15C4₆₃₋₇₁-13G12₁₃₋₂₀, поскольку значение концентрации NT-proBNP, измеренное в данной паре было максимальным. Результаты измерения иммунохимической активности в различных парах МАт мы представляли в виде процентного отношения значения концентрации NT-proBNP в исследуемой паре к значению концентрации, измеренной в контрольной паре (Рис. 13).

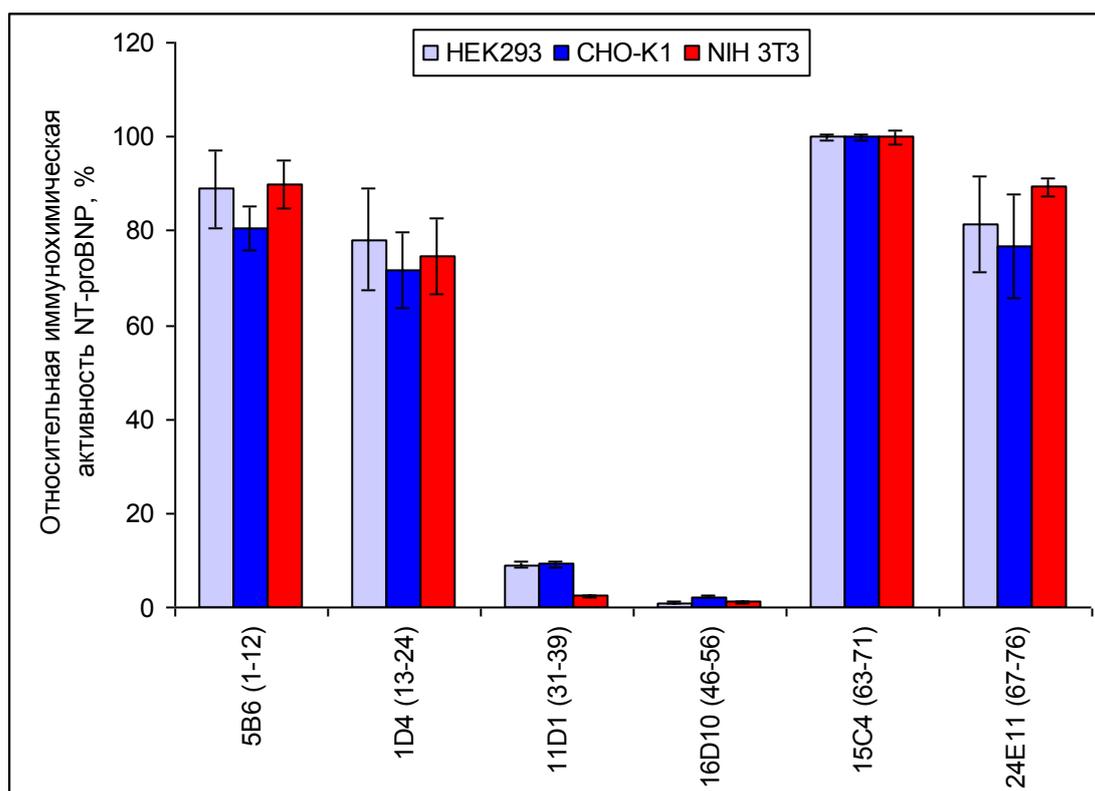


Рис. 13. Результаты измерения иммунохимической активности NT-proBNP в культуральной среде HEK 293, CHO-K1 и NIH 3T3 после временной трансфекции вектором pCMV/hproBNP. На оси абсцисс указаны МАт подложки, в скобках указаны участки молекулы NT-proBNP (АК), к которым они специфичны; по оси ординат отложено процентное отношение значений концентраций, измеренных методом сэндвич-ФИА в исследуемой паре и в паре 15C4₆₃₋₇₁-13G12₁₃₋₂₀.

Анализируя полученные результаты (Рис. 13), можно отметить сходство молекул NT-proBNP по степени доступности для взаимодействия с МАт. Так, N-концевой участок молекул NT-proBNP (1-24 АК) доступен для взаимодействия с МАт, что, по-видимому, связано с отсутствием гликозилирования на данном участке молекулы NT-proBNP. Центральные участки молекул NT-proBNP (31-56 АК) практически недоступны для взаимодействия с МАт, что, вероятно, объясняется высокой степенью гликозилирования данного участка молекулы NT-proBNP. Для С-концевых участков молекул NT-proBNP характерна высокая степень доступности для взаимодействия с МАт, что, по-видимому, объясняется отсутствием углеводных остатков на данном участке молекулы.

Сравнение полученных результатов (Рис. 12 и Рис. 13) позволило выявить различия в иммунохимических свойствах гесproBNP, экспрессированного в эукариотических клеточных линиях, и NT-proBNP, образующегося в результате процессинга молекул гесproBNP. Так, С-концевые участки молекул NT-proBNP (63-76 АК) отличаются гораздо большей доступностью для взаимодействия с антителами по сравнению с аналогичными участками молекул гесproBNP, экспрессированных во всех исследуемых эукариотических клеточных линиях. Следует также отметить, что NT-proBNP, образующиеся при

процессинге гесproBNP, экспрессированных в клеточных линиях НЕК 293, CHO-K1 и NIH 3T3, практически не отличаются друг от друга по иммунохимическим свойствам, в то время как для proBNP были показаны значительные отличия в степени доступности для взаимодействия с антителами участков, примыкающих к области расщепления молекул предшественника (63-76 АК). Как было показано ранее в нашей лаборатории для эндогенного proBNP и в данной работе для гесproBNP (НЕК 293) недоступность центральных участков молекул proBNP для взаимодействия с антителами обусловлена наличием гликозилирования предшественника на данном участке молекулы. Основываясь на полученных данных, мы предположили, что существует отрицательная корреляция между степенью доступности участков молекул и степенью их гликозилирования, т. е. чем меньше степень доступности участка молекулы proBNP, тем больше степень гликозилирования молекулы на данном участке.

Опираясь на полученные данные, и также учитывая тот факт, что NT-proBNP является продуктом процессинга proBNP, мы предполагаем, что при экспрессии в эукариотических клеточных линиях процессингу подвергается лишь часть молекул proBNP, для которой не характерно гликозилирование на участке, примыкающем к области расщепления (63-76 АК) конвертазой прогормонов. Молекулы proBNP с высокой степенью гликозилирования участка 63-76 АК не подвергаются расщеплению конвертазой прогормонов. Таким образом, можно заключить, что гликозилирование участка молекулы, примыкающего к сайту расщепления, подавляет процессинг proBNP.

Уровень процессинга гесproBNP при экспрессии в клеточных линиях НЕК 293, CHO-K1 и NIH 3T3

Проведенное нами ранее исследование иммунохимических свойств гесproBNP, экспрессированных в трех эукариотических клеточных линиях, показало, что гесproBNP (НЕК 293) отличается большей степенью гликозилирования молекул на участке 63-76 АК по сравнению с гесproBNP (CHO-K1) и гесproBNP (NIH 3T3). Для проверки гипотезы о влиянии гликозилирования на участке, примыкающем к сайту расщепления proBNP (участок 63-76 АК), на уровень процессинга под действием конвертазы прогормонов мы исследовали корреляцию между уровнем гликозилирования данного участка молекулы и уровнем процессинга proBNP. Уровень процессинга молекул гесproBNP мы оценивали по соотношению концентрации [NT-proBNP] к суммарной концентрации [NT-proBNP + proBNP]. Такой способ оценки процессинга позволяет определить долю proBNP, подвергающегося расщеплению под действием конвертазы прогормонов. В данном случае концентрации определяли методом сэндвич-ФИА в паре МАт 5В6₁₋₁₂-13G12₁₃₋₂₀. МАт

5B6₁₋₁₂ и 13G12₁₃₋₂₀ специфичны к N-концевой части молекул proBNP и NT-proBNP, для которых показана высокая доступность для взаимодействия с антителами из-за отсутствия гликозилирования на данных участках молекул, поэтому данная пара МАт нечувствительна к гликозилированию и измерение иммунохимической активности в данной паре позволяет детектировать как proBNP, так и NT-proBNP. Суммарная концентрация [NT-proBNP + proBNP] была определена при измерении иммунохимической активности в кондиционированной среде клеток HEK 293, CHO-K1 и NIH 3T3 после временной трансфекции вектором pCMV/hproBNP. Определение концентрации NT-proBNP мы проводили, измеряя иммунохимическую активность в кондиционированной среде после удаления proBNP, которое мы проводили, пропуская образцы кондиционированной среды через аффинный носитель с МАт, специфичными к BNP-части молекулы proBNP (24C5₈₇₋₉₈ и 50E1₁₀₂₋₁₀₈). В качестве калибратора в обоих случаях использовали гесproBNP (E. coli). Результаты представлены на Рис. 14.

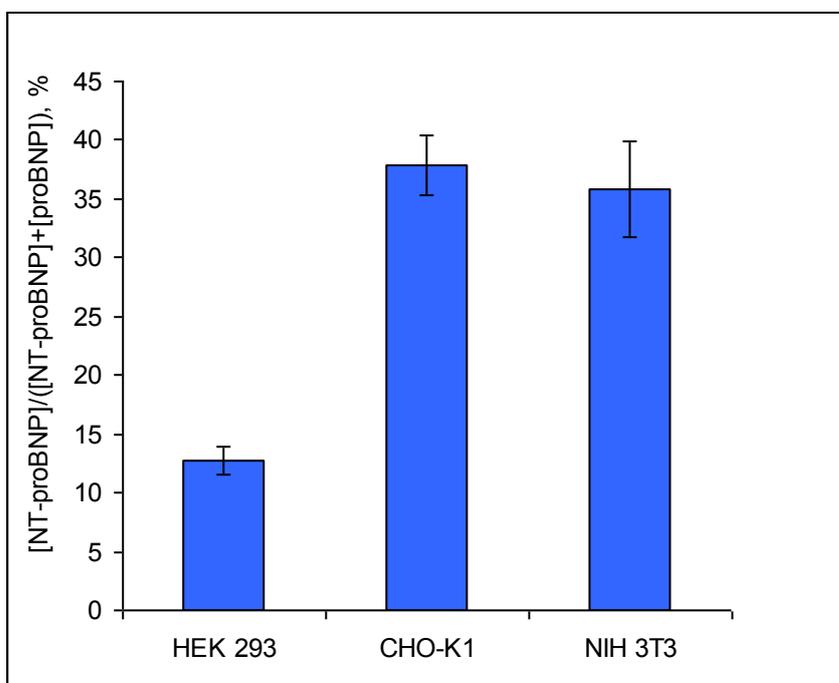


Рис. 14. Уровень процессинга proBNP в клеточных линиях HEK 293, CHO-K1 и NIH 3T3.

В результате проведенного исследования, нами было показано, что уровень процессинга предшественника различен при экспрессии гесproBNP в трех выбранных эукариотических клеточных линиях. Так, в клеточной линии HEK 293 процессингу подвергается не более 13 % синтезируемого proBNP, в клеточных линиях CHO-K1 и NIH 3T3 уровень процессинга составляет 38 и 36 % от исходного количества proBNP, соответственно.

Следует отметить, что при сравнении иммунохимических свойств гесproBNP, экспрессированного в разных клеточных линиях, нами было показано, что гесproBNP (HEK

293) отличается большей степенью гликозилирования по сравнению с гесproBNP (СНО-К1) и гесproBNP (НИН 3Т3). Оценка уровня процессинга proBNP в исследуемых клеточных линиях позволила выявить корреляцию между уровнем процессинга и степенью гликозилирования участка, примыкающего к области расщепления молекулы proBNP (63-76 АК). Таким образом, полученные результаты подтверждают нашу гипотезу о негативном влиянии гликозилирования участка 63-76 АК молекулы proBNP на процессинг предшественника под действием конвертазы прогормонов.

Исследование иммунохимических свойств NT-proBNP, экспрессированного в различных клеточных линиях

В данной работе помимо свойств NT-proBNP, образующегося в результате процессинга гесproBNP, экспрессированного в клеточных линиях НЕК 293, СНО-К1 и НИН 3Т3, мы исследовали также свойства рекомбинантного NT-proBNP (recNT-proBNP), экспрессированного в данных клеточных линиях после трансфекции вектором pCMV/мус/cyto, содержащим кДНК NT-proBNP человека (pCMV/hNT-proBNP). Свойства recNT-proBNP мы исследовали методом сэндвич-ФИА. В качестве иммобилизованных на подложку антител были выбраны 5 МАт, специфичных к различным участкам молекулы NT-proBNP. Все МАт были способны взаимодействовать с гесproBNP (E. coli). Антитела были выбраны так, что их эпитопы перекрывали практически всю молекулу NT-proBNP (за исключением участка 13-30 АК). В качестве детекторных были выбраны МАт 13G12₁₃₋₂₀, специфичные к N-концевому участку молекулы NT-proBNP человека. В данном случае исследовать иммунохимические свойства NT-proBNP, используя метод, описанный выше (см. главу «Исследование иммунохимических свойств NT-proBNP, полученных при процессинге proBNP, экспрессированного в клеточных линиях НЕК 293, СНО-К1 и НИН 3Т3»), было невозможно, т. к. предварительные эксперименты показали отсутствие сигнала (либо слабый сигнал) при измерении иммунохимической активности в образцах кондиционированных сред методом сэндвич-ФИА в парах МАт с использованием в качестве детекторных МАт, специфичных к участку молекулы 61-76 АК.

Измерение иммунохимической активности проводили в образцах кондиционированных сред клеток НЕК 293, СНО-К1 и НИН 3Т3, трансфицированных вектором pCMV/hNT-proBNP. В качестве калибратора был использован гесNT-proBNP (E. coli). В качестве контрольной была выбрана пара МАт 5В₆₁₋₁₂-13G12₁₃₋₂₀, поскольку значение концентрации NT-proBNP, измеренное в данной паре являлось максимальным. Результаты измерения иммунохимической активности в различных парах МАт мы

представляли в виде отношения значения концентрации NT-proBNP в исследуемой паре к значению концентрации, измеренной в паре 5B6₁₋₁₂-13G12₁₃₋₂₀, выраженного в % (Рис. 15).

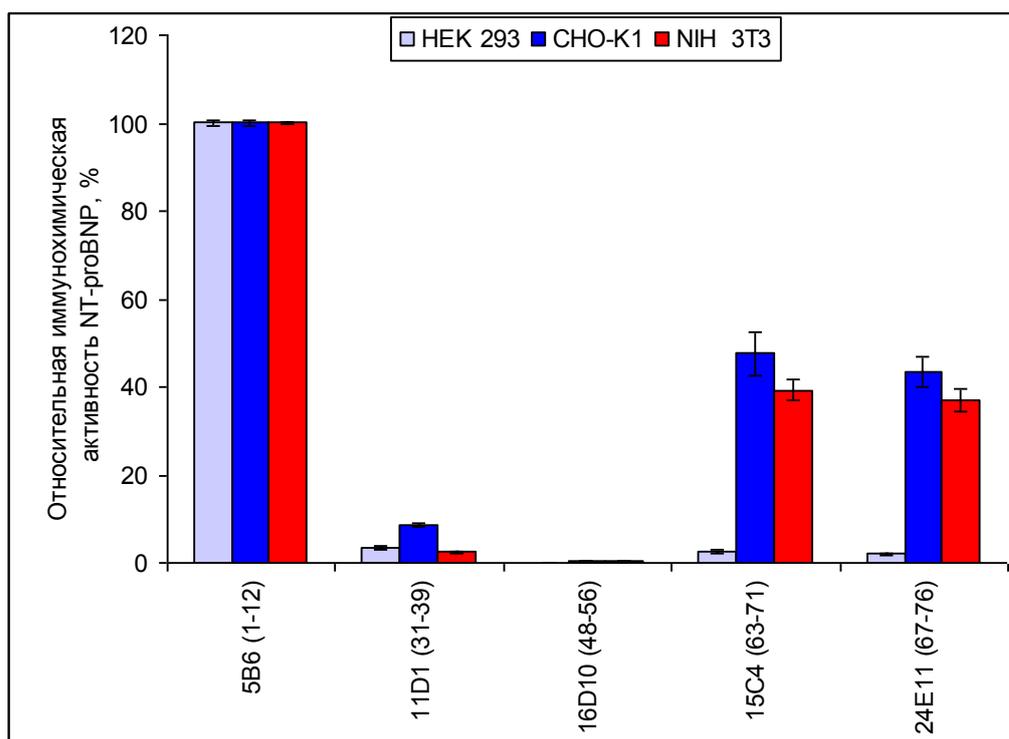


Рис. 15. Результаты измерения иммунохимической активности рекомбинантного NT-proBNP, экспрессированного в клетках HEK 293, CHO-K1 и NIH 3T3, трансфицированных вектором pCMV/hNTproBNP. На оси абсцисс указаны МАт подложки, в скобках указаны участки молекулы NT-proBNP (АК), к которым они специфичны; по оси ординат отложено процентное отношение значений концентраций, измеренных методом сэндвич-ФИА в исследуемой паре и в паре 5B6₁₋₁₂-13G12₁₃₋₂₀.

Анализируя полученные результаты (Рис. 15), следует отметить практически полную недоступность для взаимодействия с МАт центральных участков молекул (31-56 АК) recNT-proBNP, экспрессированного в исследуемых эукариотических клеточных линиях. Также можно отметить различную степень доступности для взаимодействия с МАт С-концевого участка молекулы recNT-proBNP. Так, участок молекулы 63-76 АК recNT-proBNP, экспрессированного в HEK 293, практически недоступен для взаимодействия с МАт, в то время как для NT-proBNP, экспрессированного в клеточных линиях CHO-K1 и NIH 3T3, показана большая степень узнавания (около 40 %). Однако, сравнивая результаты данного исследования с результатами, полученными при исследовании иммунохимических свойств NT-proBNP, образующегося в результате процессинга proBNP, экспрессированного в тех же клеточных линиях (Рис. 13), следует отметить различия иммунохимических свойств двух анализируемых форм NT-proBNP. Так, для NT-proBNP, полученного при процессинге молекул предшественника, показана полная доступность для взаимодействия с антителами С-концевого участка молекулы. Тогда как для recNT-proBNP степень доступности данного участка для взаимодействия с антителами

не превышает 40 %, кроме того, *recNT-proBNP*, экспрессированные в разных клеточных линиях, отличаются по степени доступности. Данные различия в иммунохимических свойствах двух анализируемых форм *NT-proBNP*, по всей видимости, обусловлены тем, что гликозилирование и процессинг молекул предшественника пространственно отделены друг от друга. Так, известно, что посттрансляционные модификации происходят в цис-Гольджи, тогда как процессинг происходит в транс-Гольджи сети. Из результатов, полученных при экспрессии *recNT-proBNP*, можно сделать вывод о том, что гликозилирование *NT-proBNP* возможно и после его образования в результате процессинга *proBNP*. Однако при исследовании иммунохимических свойств *NT-proBNP*, образованного в результате процессинга, было показано, что гликозилирования на участке 63-76 АК молекулы *NT-proBNP* не происходит. Таким образом, полученные нами результаты позволяют сказать, что в клетках сначала происходит гликозилирование молекул *proBNP*, а после этого происходит их процессинг, и *NT-proBNP*, образующийся при процессинге, не подвергается дальнейшим посттрансляционным модификациям.

Идентификация *recNT-proBNP* на нитроцеллюлозной мембране методом ECL

Мы проводили сравнение иммунохимических свойств *recNTproBNP*, экспрессированных в клеточных линиях НЕК 293 и CHO-K1, методом иммунохимического окрашивания белковых полос на НЦ мембране после электрофоретического разделения и электропереноса методом Western blotting. Для идентификации *NT-proBNP* мы использовали МАТ 24E11₆₇₋₇₆, специфичные к С-концевому участку молекулы *NT-proBNP* человека. В качестве контроля на взаимодействие антител с антигеном был взят *recNT-proBNP* (*E. coli*). Результат идентификации белковых полос на НЦ мембране после электрофоретического разделения в ПААГ и электропереноса методом Western blotting представлен на Рис. 16.

Рис. 16. Результат идентификации белковых полос на нитроцеллюлозной мембране методом иммунохимического окрашивания после электрофоретического разделения в ПААГ и электропереноса методом Western blotting. 1 – *recNT-proBNP* (CHO-K1), 2 – *recNTproBNP* (НЕК 293), 3 – *recNT-proBNP* (*E. coli*).

Анализируя полученный результат (Рис. 16), можно сказать, что МАТ 24E11₆₇₋₇₆, специфичные к С-концевой части молекулы *NT-proBNP* человека, взаимодействуют с *recNT-proBNP* (CHO-K1) (дорожка 1 на Рис. 16), в то время как *recNT-proBNP* (НЕК 293) (дорожка 2 на Рис. 16) данными антителами не идентифицируется, что, по-видимому, объясняется гликозилированием С-концевого участка *recNT-proBNP* (НЕК 293). Как было

показано нами при исследовании иммунохимических свойств recNT-proBNP методом сэндвич-ФИА, recNT-proBNP (CHO-K1) доступен для взаимодействия с МАт 24E11₆₇₋₇₆ на 40 %, поэтому возможно его идентификация методом иммунохимического окрашивания. Таким образом, при исследовании иммунохимических свойств recNT-proBNP, экспрессированных в различных эукариотических линиях, нами были показаны различия в степени гликозилировании С-концевых участков исследуемых recNT-proBNP. Кроме того, были показаны различия в степени гликозилирования молекул recNT-proBNP и NT-proBNP, получающихся при процессинге recproBNP, экспрессированного в тех же клеточных линиях. Таким образом, основываясь на полученных результатах, мы предполагаем существование пространственного разделения стадий гликозилирования proBNP и его процессинга.

Экспрессия recproBNP (НЕК 293) в присутствии ингибитора фурина

Исследуя иммунохимические свойства recproBNP (НЕК 293), мы показали, что, по-видимому, при экспрессии recproBNP в клеточной линии НЕК 293 образуются формы предшественника BNP, отличающиеся по составу и/или содержанию углеводной части. Нами было показано, что центральная часть молекулы recproBNP (НЕК 293) гликозилирована и недоступна для взаимодействия с антителами. Кроме того, нами было показано, что в клетках НЕК 293, трансфицированных вектором pCMV/hproBNP, происходит процессинг молекул предшественника BNP, и в кондиционированной среде помимо интактного proBNP присутствуют BNP и NT-proBNP, образующиеся в результате процессинга молекул предшественника под действием конвертазы прогормонов. Основываясь на результатах исследований иммунохимических свойств и оценке уровня процессинга recproBNP, экспрессированного в разных эукариотических клеточных линиях, мы высказали гипотезу о том, что гликозилирование участка молекулы 63-76 АК proBNP препятствует процессингу предшественника под действием конвертазы прогормонов. Основываясь на данных, полученных при оценке уровня процессинга молекул предшественника BNP в клеточной линии НЕК 293, мы предположили, что при экспрессии proBNP в клеточной линии НЕК 293 образуется около 10 % негликозилированной на участке 63-76 АК формы proBNP, которая и подвергается процессингу под действием конвертазы прогормонов (Рис. 14). Для того чтобы проверить данное предположение, мы проводили трансфекцию клеток НЕК 293 вектором pCMV/hproBNP, которые затем культивировали в среде, содержащей ингибитор фурина. Используемый нами ингибитор фурина обладает широким спектром действия, поэтому

можно было предположить, что нам удастся заингибировать потенциальную конвертазу, осуществляющую процессинг молекул предшественника.

Затем мы проводили сравнение иммунохимических свойств гесргоBNP, экспрессированных в клеточной линии НЕК 293, в присутствии и в отсутствие ингибитора фурина, по методике, описанной выше (см. главу «Сравнение иммунохимических свойств рекомбинантногоргоBNP со свойствами эндогенногоргоBNP»). Результаты, полученные при измерении иммунохимической активности методом сэндвич-ФИА, представлены на Рис. 17.

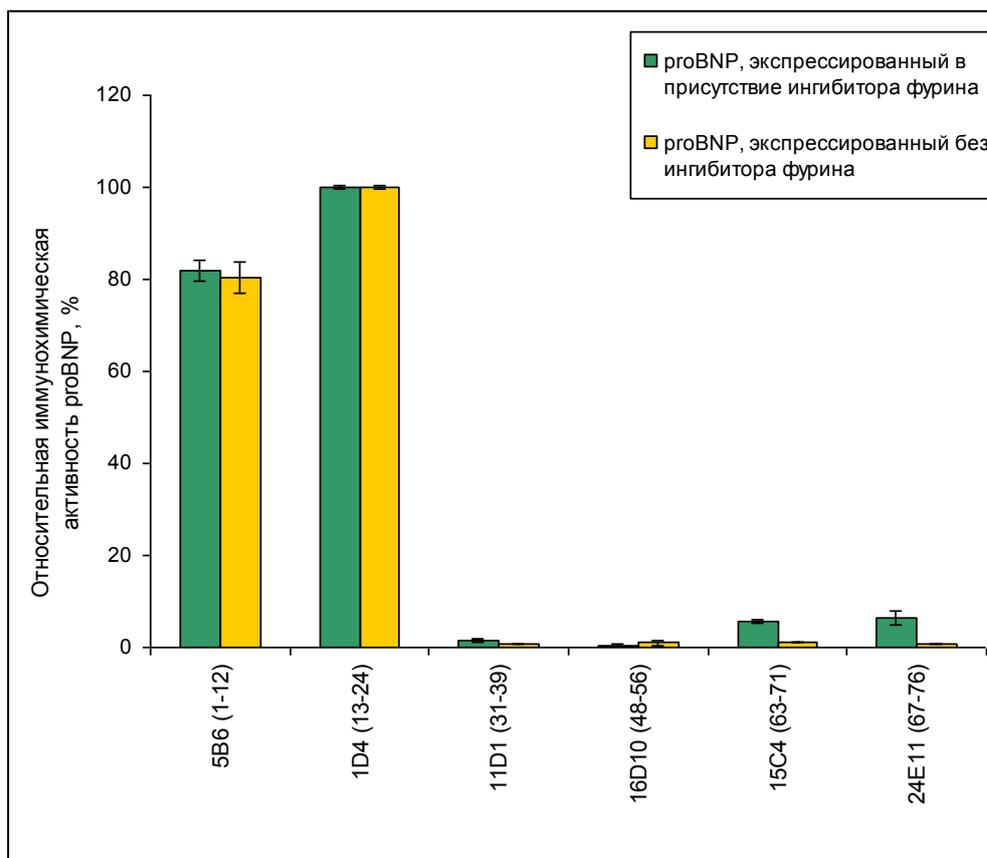


Рис. 17. Иммунохимическая активность гесргоBNP (НЕК 293), экспрессированного в присутствии и в отсутствие ингибитора фурина. На оси абсцисс указаны МАТ подложки, в скобках указаны участки молекулыргоBNP (АК), к которым они специфичны; по оси ординат отложено соотношение значений концентраций, измеренных методом сэндвич-ФИА в исследуемой паре и в паре 1D4-24C5, выраженное в %.

Анализируя полученные результаты (Рис. 17), можно сказать, что гесргоBNP, экспрессированный в присутствии ингибитора фурина, отличается большей степенью доступности для взаимодействия с антителами на участке молекулы 63-76 АК по сравнению сргоBNP, экспрессированным в клетках НЕК 293 в отсутствие ингибитора. Так, для взаимодействия с МАТ 24E11₆₇₋₇₆ доступно около 6 %ргоBNP, экспрессированного в присутствии ингибитора, и не больше 1,5 %ргоBNP, экспрессированного в отсутствие ингибитора фурина. В то же время формы гесргоBNP, полученные при экспрессии в присутствии и отсутствие ингибитора фурина, не

отличаются по иммунохимическим свойствам на других участках молекулы. Следует отметить, что иммунохимическая активность, измеренная в паре МАт 24Е11₆₇₋₇₆-24С5₈₇₋₉₈, составляет около 6 % в присутствии в кондиционированной среде клеток НЕК 293 ингибитора фурина. Это значение меньше ожидаемой нами величины (10 %). По всей видимости, это может быть связано с неполным ингибированием конвертазы прогормонов, присутствующих в клетках НЕК 293.

Таким образом, нами было показано, что в присутствии в кондиционированной среде ингибитора фурина в клетках НЕК 293 происходит синтез молекул proBNP, негликозилированных на участке 63-76 АК. Данный результат позволяет нам предположить, что конвертазой прогормонов, по-видимому, расщепляется форма proBNP, негликозилированная на участке 63-76 АК. Таким образом, полученный результат подтверждает нашу гипотезу о негативном влиянии гликозилирования на участке 63-76 АК на уровень процессинга молекул proBNP.

Гетерогенность форм proBNP, экспрессированного в клеточных линиях CHO-K1 и NIH 3T3

Результаты, полученные нами при исследовании иммунохимических свойств гесproBNP, экспрессированного в разных клеточных линиях, позволяют предполагать, что экспрессируемый клетками гесproBNP представляет собой гетерогенную смесь молекул, различающихся по степени гликозилирования. Измеряя иммунохимическую активность в кондиционированной среде CHO-K1 и NIH 3T3, трансфицированных вектором pCMV/hproBNP, методом сэндвич-ФИА в паре МАт 24Е11₆₇₋₇₆-24С5₈₇₋₉₈, мы показали, что участок, примыкающий к области расщепления молекулы предшественника, доступен для взаимодействия с антителами на 43 % и 20 %, соответственно (Рис. 12). Основываясь на данных по доступности участка 63-76 АК гесproBNP для взаимодействия с антителами, мы предположили, что в кондиционированной среде клеток CHO-K1 и NIH 3T3, трансфицированных вектором pCMV/hproBNP, присутствует форма гесproBNP, негликозилированного или слабо гликозилированного на участке, примыкающем к области расщепления (63-76 АК) («открытого» на участке 63-76 АК proBNP). Для проверки нашего предположения о наличии proBNP, негликозилированного (или слабо гликозилированного) на участке 63-76 АК, мы проводили выделение гесproBNP из кондиционированных сред клеток CHO-K1 и NIH 3T3 после трансфекции вектором pCMV/hproBNP, используя два аффинных носителя с иммобилизованными антителами, специфичными к различным участкам молекулы proBNP. Образцы кондиционированных сред мы пропускали через аффинный носитель с иммобилизованными МАт 24Е11₆₇₋₇₆,

специфичными к участку молекулы proBNP, примыкающему к области расщепления. Мы предполагали, что в случае наличия в кондиционированной среде молекул «открытого» на участке 63-76 АК гесproBNP, на носителе будет сорбироваться именно эта форма, а гесproBNP, гликозилированный на данном участке («закрытый» на участке 63-76 АК proBNP), будет содержаться во фракции белков, несорбировавшихся на носителе (фракция «проскок»). Тогда как, в том случае, если частичная доступность участка 63-76 АК для взаимодействия с антителами вызвана меньшей по сравнению с гесproBNP (НЕК 293) степенью гликозилированием, мы ожидали, что фракция гесproBNP несорбировавшегося и сорбировавшегося на носитель не будут отличаться по иммунохимическим свойствам на участке 63-76 АК.

Результаты измерения иммунохимической активности методом сэндвич-ФИА в паре МАт 24Е11₆₇₋₇₆-24С5₈₇₋₉₈ показали наличие во фракции «проскока» с носителя, содержащего МАт 24Е11₆₇₋₇₆, полностью недоступной для взаимодействия с антителами формы гесproBNP, а в элюате — формы гесproBNP, хорошо доступной для взаимодействия с антителами 24Е11₆₇₋₇₆. Таким образом, нами было показано, что в кондиционированной среде CHO-K1 и NIH 3T3, трансфицированных вектором pCMV/hproBNP, присутствует форма гесproBNP, негликозилированного на участке, примыкающем к области расщепления. Фракцию белков, несорбировавшихся на носителе с МАт 24Е11₆₇₋₇₆, мы подвергали еще одной аффинной хроматографии на носителе с иммобилизованными МАт 50Е1₁₀₂₋₁₀₈ и 24С5₈₇₋₉₈, специфичными к BNP. Такой метод экстракции позволяет выделить все формы proBNP, оставшиеся во фракции «проскока», независимо от степени их гликозилирования, поскольку используемые антитела не чувствительны к гликозилированию, так как специфичны к С-концевой части молекулы proBNP, не имеющей посттрансляционных модификаций.

Таким образом, в результате двух последовательных хроматографий мы выделяли из кондиционированной среды две основные формы гесproBNP: «открытого» и «закрытого» на участке 63-76. Далее мы проводили сравнение иммунохимических свойств данных форм гесproBNP методом сэндвич-ФИА по методике, описанной выше (см. раздел «Сравнение иммунохимических свойств рекомбинантного proBNP со свойствами эндогенного proBNP»). Результаты измерения иммунохимической активности данных форм proBNP представлены на Рис. 18 и Рис. 19.

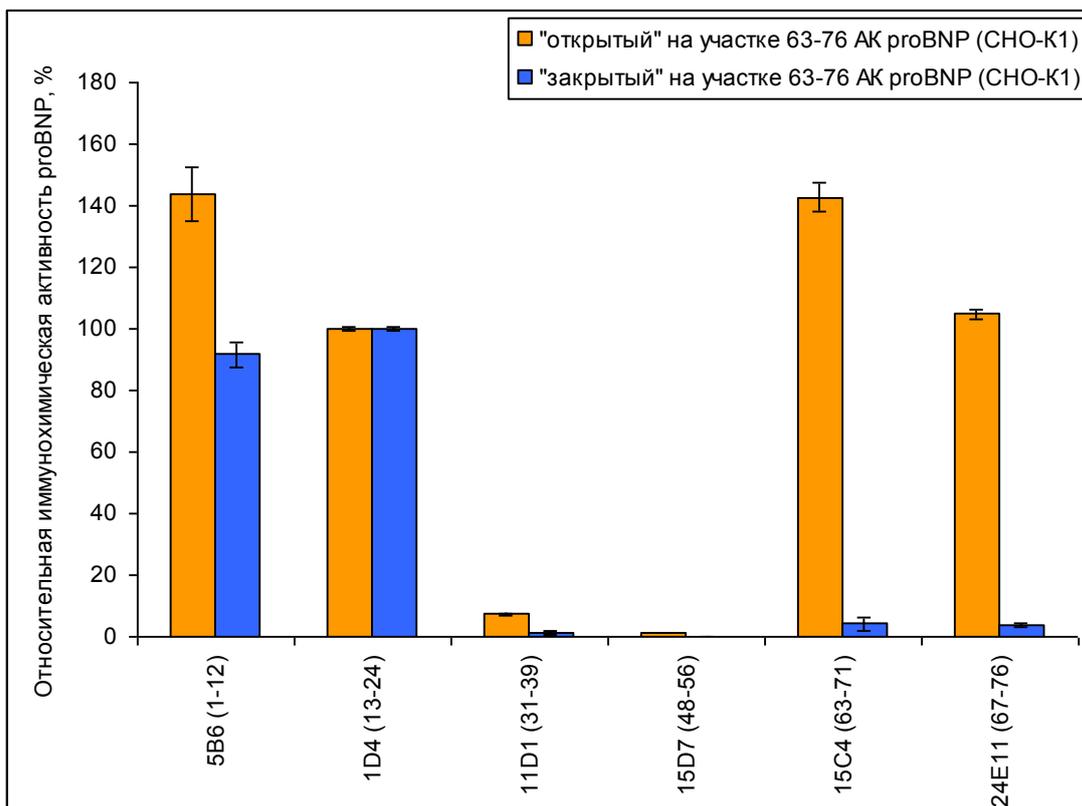


Рис. 18. Результаты измерения иммунохимической активности проBNP в образцах негликозилированной («открытой») и гликозилированной («закрытой») на участке 63-76 АК форм проBNP, экспрессированного в клеточной линии CHO-K1.

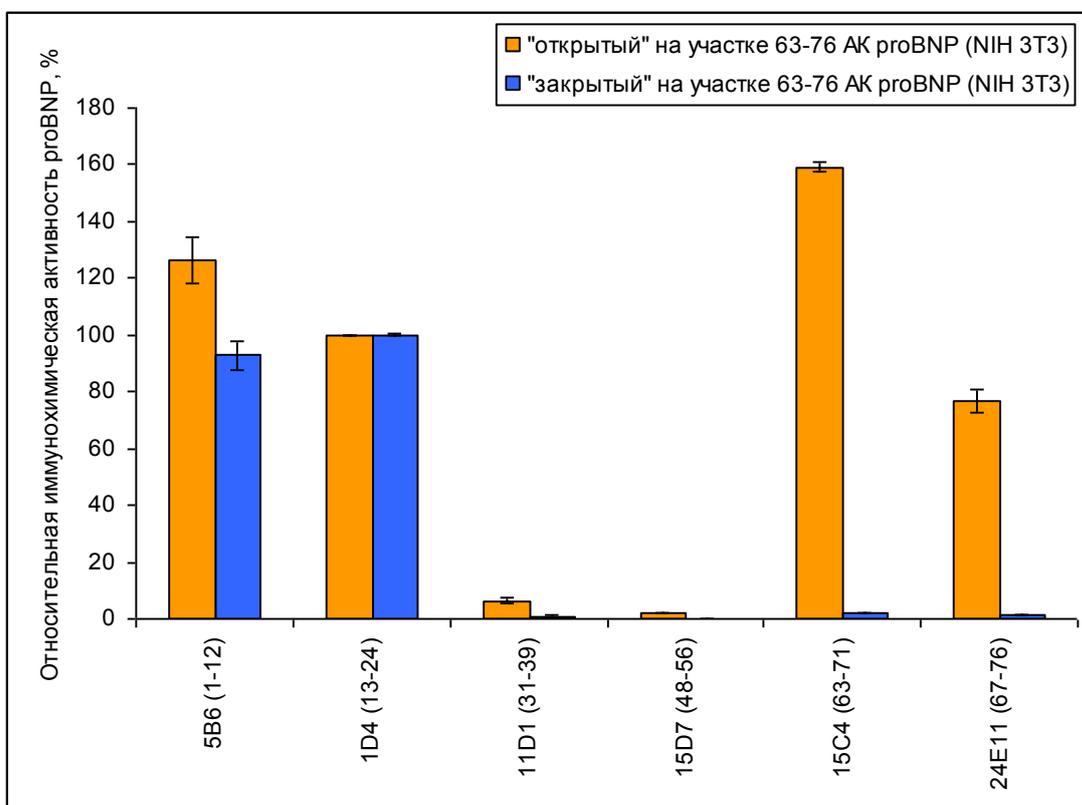


Рис. 19. Результаты измерения иммунохимической активности проBNP в образцах негликозилированной («открытой») и гликозилированной («закрытой») на участке 63-76 АК форм проBNP, экспрессированного в клеточной линии NIH 3T3.

Из Рис. 18 и Рис. 19 видно, что участок молекулы 63-76 АК у «открытой» формы гесproBNP полностью доступен для взаимодействия с антителами в отличие от формы «закрытого» на данном участке гесproBNP. Тогда как на других участках молекул «закрытая» и «открытая» формы гесproBNP значительно не отличаются друг от друга по иммунохимическим свойствам.

Таким образом, используя метод аффинной хроматографии на носителях с антителами, специфичными к различным участкам молекулы proBNP, в сочетании с измерениями иммунохимической активности методом сэндвич-ФИА мы показали наличие гетерогенности молекул гесproBNP в кондиционированной среде клеток CHO-K1 и NIH 3T3, трансфицированных вектором pCMV/hproBNP, а именно наличие форм гесproBNP гликозилированной и негликозилированной на участке, примыкающем к области расщепления.

Подбор условий для проведения расщепления proBNP фурином in vitro

В следующей части работы мы планировали провести сравнение степени расщепления фурином гликозилированной и негликозилированной в области расщепления (участок 63-76 АК) форм гесproBNP. Для этого были проведены эксперименты по подбору оптимальных условий для расщепления фурином гесproBNP (*E. coli*). Сначала было определено оптимальное количество фурина, необходимое для эффективного процессинга (более 90 % от исходного количества proBNP в пробе) 30 нг гесproBNP (*E. coli*). Для этого были приготовлены пробы с различным количеством фурина от 0,25 до 2,5 Ед. Пробы инкубировали в течение 2 часов при температуре 37°C. Реакцию останавливали заморозкой проб при – 70°C. После этого в полученных пробах методом сэндвич-ФИА в паре 50E1₁₀₂₋₁₀₈-16F3₁₃₋₂₀ определяли концентрацию гесproBNP. Измерение иммунохимической активности в паре МАт 50E1₁₀₂₋₁₀₈-16F3₁₃₋₂₀ позволяет оценить убыль интактного proBNP, поскольку эта пара МАт детектирует только полноразмерную форму предшественника BNP. Эффективность расщепления оценивали по количеству расщепившегося proBNP (Рис. 20).

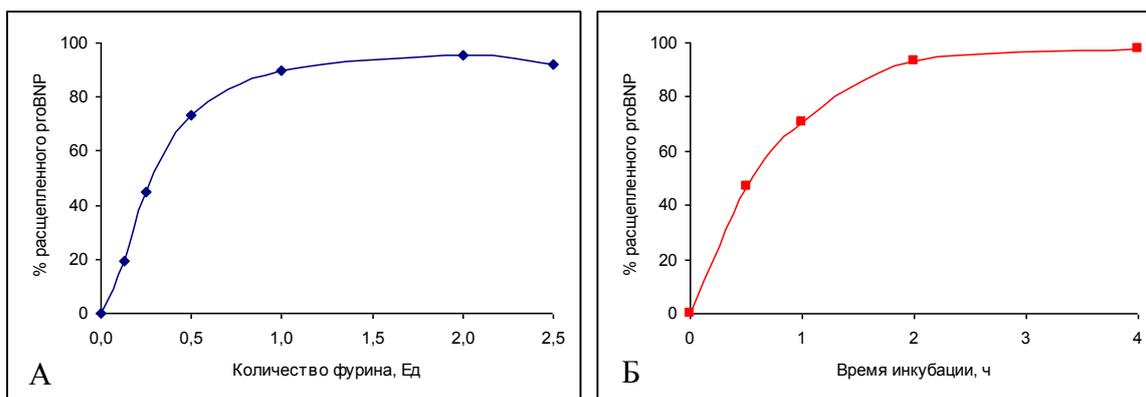


Рис. 20. Зависимость эффективности расщепления proBNP от количества фурина в пробе.

По полученным результатам (Рис. 20 А) было определено оптимальное количество фурина в пробе, содержащей 30 нг гесproBNP – 1 Ед. В следующем эксперименте было определено оптимальное время инкубации проб. Пробы, содержащие 30 нг proBNP и 1 Ед фурина, инкубировали в течение различного времени от 0,5 до 4 часов при 37°С. Эффективность расщепления оценивали по количеству расщепившегося proBNP. По полученным результатам (Рис. 20 Б) было определено оптимальное время инкубации пробы для расщепления максимального количества гесproBNP. Таким образом, было выбрано количество фурина – 1 Ед на 30 нг гесproBNP, и время инкубации пробы – 2,5 часа при 37°С.

Идентификация форм proBNP до и после расщепления гесproBNP (E. coli) фурином

В нашей работе мы исследовали формы proBNP, полученные в результате расщепления гесproBNP (E. coli) под действием фурина *in vitro*, методом иммунохимического окрашивания белковых полос на нитроцеллюлозной мембране после электрофоретического разделения и электропереноса методом Western blotting. Для идентификации форм proBNP, содержащихся в образцах гесproBNP (E. coli) до и после расщепления фурином мы использовали два различных антитела: МАт 24C5₈₇₋₉₈, специфичные к С-концевой части молекулы proBNP (соответствует участку 11-22 АК BNP), и МАт 24E11₆₇₋₇₆, специфичные к области расщепления предшественника BNP (соответствует С-концевой части молекулы NT-proBNP). Использование МАт 24C5₈₇₋₉₈ позволяет идентифицировать интактные молекулы proBNP и образовавшийся в результате его расщепления BNP. МАт 24E11₆₇₋₇₆ были выбраны нами для того, чтобы идентифицировать proBNP и NT-proBNP. Результаты идентификации образцов гесproBNP (E. coli) до и после расщепления фурином *in vitro* представлены на Рис. 21.

Рис. 21. Результат иммунохимического окрашивания белковых полос на нитроцеллюлозной мембране методом ECL после электрофоретического разделения в ПААГ и электропереноса методом Western blotting. А – иммунохимическое окрашивание с помощью МАт 24С5₈₇₋₉₈, Б – иммунохимическое окрашивание с помощью МАт 24Е11₆₇₋₇₆. 1 – образец гесргоBNP (*E. coli*), необработанный фурином, 2- образец гесргоBNP (*E. coli*) после обработки фурином.

Анализируя полученный результат (Рис. 21), можно сказать, что МАт 24С5₈₇₋₉₈, специфичные к BNP, в образце гесргоBNP (*E. coli*), не обработанном фурином, детектируют интактныйргоBNP (дорожка 1 на Рис. 21 А), в то время как в образце после обработки фурином (дорожка 2 на Рис. 21 А) данные МАт взаимодействуют с более низкомолекулярной формой, по-видимому, соответствующей BNP, образуемому при расщеплении молекул предшественника. МАт 24Е11₆₇₋₇₆ также детектируют разные формы, отличающиеся по подвижности. Так, в образце гесргоBNP (*E. coli*) после обработки фурином (дорожка 2 на Рис. 21 Б) детектируется более низкомолекулярная форма по сравнению с образцом гесргоBNP (*E. coli*), не обработанного фурином (дорожка 1 на Рис. 21 А).

Сравнивая результаты, полученные при использовании МАт 24С5₈₇₋₉₈ и 24Е11₆₇₋₇₆, можно сказать, что формыргоBNP, детектируемые обоими антителами в образце гесргоBNP (*E. coli*), не обработанного фурином, одинаковы по электрофоретической подвижности, из чего можно заключить, что данная форма представляет собой интактныйргоBNP. Форма, детектируемая МАт 24С5₈₇₋₉₈ в образце гесргоBNP (*E. coli*) после обработки фурином (дорожка 2 на Рис. 21 А), отличается заметно большей электрофоретической подвижностью по сравнению с формой, детектируемой МАт 24Е11₆₇₋₇₆ в том же образце (дорожка 2 на Рис. 21 Б). Как было показано нами ранее, в образце гесргоBNP (*E. coli*) после расщепления фурином остается не больше 10 % исходного количестваргоBNP. В связи с этим можно сказать, что, по-видимому, форма, детектируемая МАт 24Е11₆₇₋₇₆ в образце гесргоBNP (*E. coli*) после обработки фурином, соответствует NT-ргоBNP, образуемому в результате протеолиза под действием фурина, а низкомолекулярная форма, детектируемая в том же образце МАт 24С5₈₇₋₉₈, соответствует BNP.

Поскольку для идентификации гесNT-ргоBNP мы использовали антитела, специфичные к области расщепления молекулы предшественника BNP (67-76 АК), которые детектируют NT-ргоBNP, можно заключить, что расщепление гесргоBNP (*E. coli*) происходит на участке, соответствующем сайту расщепленияргоBNP человека. Таким образом, при иммунохимическом окрашивании белковых полос на нитроцеллюлозной мембране методом ECL после электрофоретического разделения с последующим

электропереносом методом Western blotting нами было показано, что при обработке геспроBNP (*E. coli*) фурином *in vitro* происходит протеолиз молекул предшественника с образованием молекул BNP и NT-proBNP.

Анализ форм proBNP, образующихся после обработки геспроBNP (E. coli) фурином in vitro, методом гель-фильтрации

В данной работе нами было проведено разделение белков, содержащихся в пробе геспроBNP (*E. coli*) после обработки фурином, для того чтобы подтвердить результат, полученный при исследовании иммунохимических свойств форм proBNP, содержащихся в образцах геспроBNP (*E. coli*) после обработки фурином. В данном эксперименте гель-фильтрации был подвергнут образец геспроBNP (*E. coli*), обработанный фурином *in vitro*. В полученных в результате проведения гель-фильтрации фракциях мы измеряли иммунохимическую активность методом сэндвич-ФИА в паре МАт 24C5₈₇₋₉₈-Ab2 (Рис. 22). Измерение иммунохимической активности в данной паре позволяет детектировать в образце как proBNP, так и BNP, поскольку МАт 24C5₈₇₋₉₈ специфичны к BNP-части молекулы proBNP, а МАт Ab2 специфичны к иммунному комплексу, образованному BNP и МАт 24C5₈₇₋₉₈.

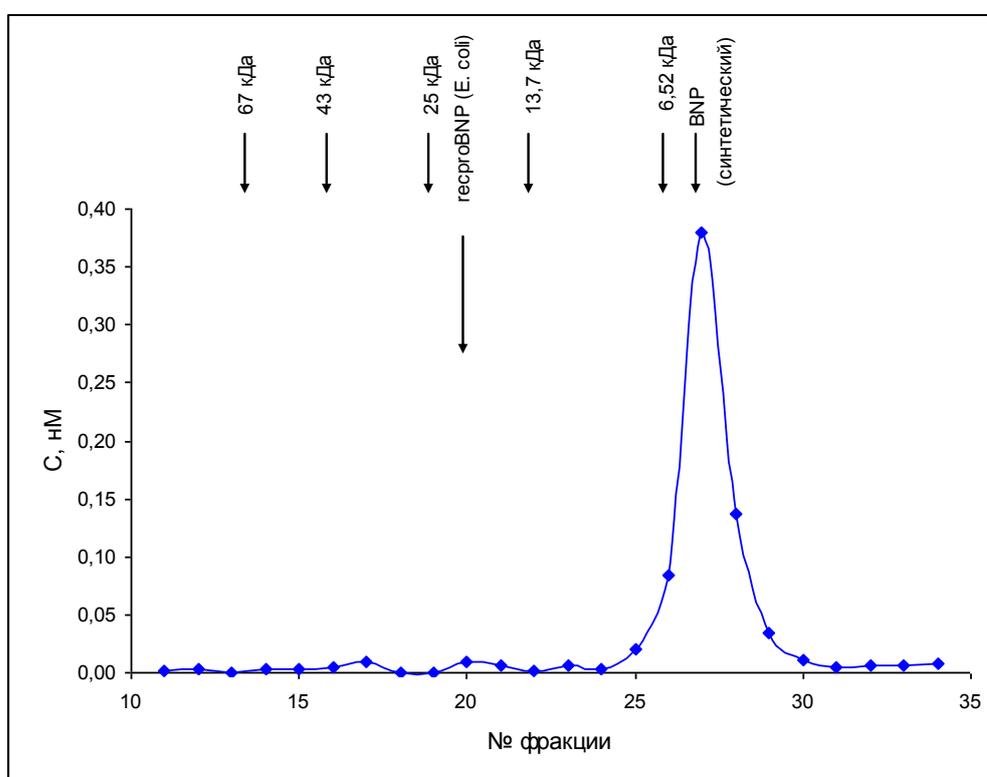


Рис. 22. Результаты измерения иммунохимической активности методом сэндвич-ФИА в паре МАт 24C5₈₇₋₉₈-Ab2 во фракциях, полученных после гель-фильтрации образца геспроBNP (*E. coli*), обработанного фурином *in vitro*. Стрелками указаны положения маркеров молекулярной массы, синтетического BNP и геспроBNP (*E. coli*).

Анализируя полученный результат (Рис. 22), можно сказать, что во фракциях, полученных в результате разделения белков методом гель-фильтрации в образце гесргоBNP (*E. coli*), обработанного фурином, пара МАт 24С5₈₇₋₉₈-Ab2 детектирует один пик иммунохимической активности. Положение данного пика совпадает с положением синтетического BNP. Отсутствие более высокомолекулярного пика, соответствующего по подвижности рргоBNP, позволяет заключить, что после обработки фурином гесргоBNP (*E. coli*) в образце не остается интактных молекул предшественника BNP. Полученные при гель-фильтрации результаты подтверждают наличие BNP в образце гесргоBNP (*E. coli*) после его обработки фурином *in vitro*.

Таким образом, методами иммунохимического окрашивания белков на нитроцеллюлозной мембране и гель-фильтрации было показано, что в результате обработки гесргоBNP (*E. coli*) фурином *in vitro* происходит его расщепление на BNP и NT-ргоBNP.

Расщепление гесргоBNP фурином *in vitro*

Далее мы проводили расщепление полученных в результате разделения на аффинных носителях форм гесргоBNP (СНО-К1), гликозилированных и негликозилированных в области расщепления (участок молекулы 63-76 АК) и гесргоBNP (НЕК 293). Расщеплению фурином подвергали одинаковое количество гесргоBNP, которое оценивали по результатам измерения иммунохимической активности в паре МАт 50Е1₁₀₂₋₁₀₈-16F3₁₃₋₂₀. Эффективность расщепления различных гесргоBNP фурином в данном случае мы также оценивали по доле оставшегося интактного рргоBNP. Для этого измеряли концентрацию рргоBNP в пробах до и после обработки фурином методом сэндвич-ФИА в паре МАт 50Е1₁₀₂₋₁₀₈-16F3₁₃₋₂₀. Результаты представлены на Рис. 23.

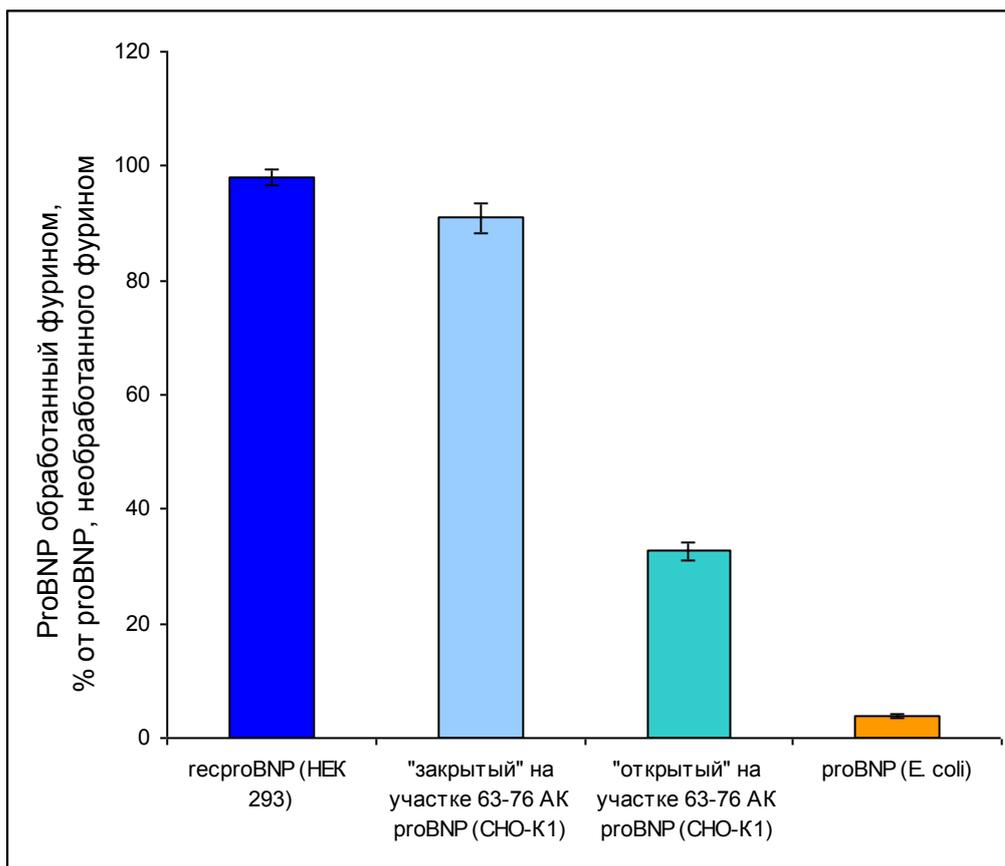


Рис. 23. Эффективность расщепления геспроBNP фурином in vitro.

Из Рис. 23 видно, что «закрытый» на участке 63-76 АК геспроBNP (CHO-K1) практически не подвергается процессингу под действием фурина, в то время как эффективность расщепления «открытого» на данном участке геспроBNP (CHO-K1) сравнима с эффективностью расщепления геспроBNP (E. coli). Так, расщеплению подвергается около 70% «открытой» на участке расщепления формы proBNP.

Из Рис. 23 видно, что геспроBNP (НЕК 293) очень устойчив к обработке фурином. Так, нами было показано, что после обработки фурином 98 % proBNP остается нерасщепленным. При исследовании иммунохимических свойств геспроBNP (НЕК 293) нами было показано, что участок молекулы 63-76 АК практически полностью недоступен для взаимодействия с антителами, что, по-видимому, связано с очень высокой степенью гликозилирования данного участка молекулы предшественника BNP.

Таким образом, в экспериментах с расщеплением различных форм геспроBNP in vitro конвертазой прогормонов фурином мы показали, что негликозилированная в области расщепления форма геспроBNP подвержена расщеплению фурином, тогда как гликозилированная на данном участке молекулы форма геспроBNP, устойчива к обработке фурином. Полученные данные подтверждают наше предположение о негативном влиянии

гликозилирования на участке расщепления proBNP на уровень процессинга молекул proBNP.

Заключение

В нашей работе мы провели сравнение иммунохимических свойств гесproBNP, полученного в трех эукариотических экспрессионных системах (НЕК 293, СНО-К1 и НИН 3Т3) со свойствами эндогенного proBNP. Кроме того, мы провели исследование и сравнение уровня процессинга proBNP в перечисленных клеточных линиях. В данной работе мы использовали метод сэндвич-ФИА для характеристики иммунохимических свойств и оценки уровня процессинга, поскольку этот метод обладает высокой чувствительностью и специфичностью.

Нами были показаны различия иммунохимических свойств участков 63-76 АК молекул proBNP и NT-proBNP, образующегося в результате его процессинга. На основании полученных результатов мы предположили, что процессингу подвергается часть молекул proBNP, для которых не характерно гликозилирование участка 63-76 АК молекулы. При исследовании уровня процессинга гесproBNP в данных клеточных линиях была выявлена отрицательная корреляция между степенью гликозилирования и уровнем процессинга.

Нами было показано, что гесproBNP, экспрессированный в клеточных линиях СНО-К1 и НИН 3Т3, гетерогенен по своему составу: в кондиционированной среде данных клеток присутствует proBNP, гликозилированный и негликозилированный на участке 63-76 АК молекулы. Нами было показано, что форма proBNP, негликозилированная на данном участке молекулы, подвержена расщеплению фурином *in vitro*, в то время как гликозилированная на данном участке форма proBNP устойчива к протеолизу. Кроме того, мы показали, что при экспрессии proBNP в клеточной линии НЕК 293 в присутствии ингибитора фурина образуется 6 % негликозилированной на участке 63-76 АК формы proBNP, которая отсутствует при экспрессии proBNP в отсутствие ингибитора фурина.

Таким образом, основываясь на полученных результатах, можно заключить, что данное исследование показало уникальную роль гликозилирования участка 63-76 АК молекулы proBNP в регуляции процессинга молекул предшественника BNP.

Выводы:

1. Подобраны условия экспрессии гесproBNP в клеточной линии HEK 293.
2. Показано, что при экспрессии гесproBNP в клеточной линии HEK 293 происходит процессинг молекул предшественника с образованием NT-proBNP и BNP.
3. Охарактеризованы биохимические и иммунохимические свойства гесproBNP (HEK 293). При сходстве в участках гликозилирования показаны различия в степени гликозилирования молекул гесproBNP (HEK 293) и эндогенного proBNP.
4. Показаны различия в иммунохимических свойствах гесproBNP, экспрессированного в клеточных линиях HEK 293, CHO-K1 и NIH 3T3.
5. Показаны различия в иммунохимических свойствах гесproBNP и NT-proBNP, образующегося при процессинге молекул предшественника.
6. Показано наличие отрицательной корреляции между степенью гликозилирования участка 63-76 АК молекулы гесproBNP и уровнем его процессинга.
7. Показано пространственное разделение гликозилирования и процессинга proBNP.
8. Показана гетерогенность форм гесproBNP, экспрессированного в клеточных линиях CHO-K1 и NIH 3T3.
9. Показана уникальная роль гликозилирования участка 63-76 АК молекулы proBNP в регуляции процессинга молекул предшественника BNP.

Список литературы

1. Levin ER., Gardner DG., Samson WK.. Natriuretic peptides. *N. Engl. J. Med.* 1998; 339: 321-328.
2. Cowie MR., Mendez GF.. BNP and congestive heart failure. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 2002; 44: 293-320.
3. Schweitz H., Vigne P., Moinier D., Frelin CH., Lazdunski M.. A new member of the natriuretic peptide family present in the venom of green mamba (*Dendroaspis angusticeps*). *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 13928-32.
4. Nakao K., Ogawa Y., Suga S., Imura H.. Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system. II: Natriuretic peptide receptors. *J. Hypertens.* 1992; 10: 1111-4.
5. Hall C.. Essential biochemistry and physiology of (NT-pro)BNP. *Eur. J. Heart Fail.* 2004; 6: 257-260.
6. Sudoh T., Kangawa K., Minamino N., Matsuo H.. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* 1988; 332: 78-81.
7. Song DL., Kohse KP., Murad F.. Brain natriuretic factor. Augmentation of cellular cyclic GMP, activation of particulate guanylate cyclase and receptor binding. *FEBS. Lett.* 1988; 232(1): 125-9.
8. Togashi K., Hirata Y., Ando K., Takei Y., Kawakami M., Marumo F.. Brain natriuretic peptide-like immunoreactivity is present in human plasma. *FEBS. Lett.* 1989; 250:235-7.
9. Sudoh T., Maekawa K., Kojima M., Minamino N., Kangawa K., Matsuo H.. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding a precursor for human brain natriuretic peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989; 159: 1427-1434.
10. Kambayashi Y., Nakao K., Mukoyama M., Saito Y., Ogawa Y., Shiono S., et al. Isolation and sequence determination of human brain natriuretic peptide in human atrium. *FEBS. Lett.* 1990; 259: 341-345.
11. Hino J., Tateyama H., Minamino N., Kangawa K., Matsuo H.. Isolation and identification of human brain natriuretic peptides in cardiac atrium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990; 167: 693-700.
12. Mukoyama M., Nakao K., Hosoda K., Suga S., Saito Y., Ogawa Y., et al. Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. Evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide. *J. Clin. Invest.* 1991; 87: 1402-1412.
13. De Lemos JA., McGuire DK., Drazner MH.. B-type natriuretic peptide in cardiovascular disease. *Lancet* 2003; 362: 316-22.

14. Nakao K., Ogawa Y., Suga S., Imura H.. Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system. I: Natriuretic peptides. *J. Hypertens.* 1992; 10: 907-912.
15. Yasue H., Yoshimura M., Sumida H., et al. Localization and mechanism of secretion of B-type natriuretic peptide in comparison with those of A-type natriuretic peptide in normal subjects and patients with heart failure. *Circulation* 1994; 90: 195-203.
16. Mair J., Hammerer-Lercher A., Puschendorf B.. The impact of cardiac natriuretic peptide determination on the diagnosis and management of heart failure. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2001;39: 571-88.
17. He Q., Wang D., Yang X., Carretero OA., LaPointe MC.. Inducible regulation of human brain natriuretic peptide promoter in transgenic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001; 280: H368-H376.
18. Hama N., Itoh H., Shirakami G., Nakagawa O., Suga S., Ogawa Y., et al. Rapid ventricular induction of BNP gene expression in experimental acute myocardial infarction. *Circ.* 1995
19. Hosoda K., Nakao K., Mukoyama M., Saito Y., Jougasaki M., Shirakami G., et al. Expression of brain natriuretic peptide gene in human heart. *Hypertension* 1991; 17: 1152-1156.
20. Gerbes AL., Dagnino L., Nguyen T., Nemer M.. Transcription of brain natriuretic peptide and atrial natriuretic peptide genes in human tissues. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994; 78: 1307-1311.
21. Ma K., Banas K., de Bold J. Determinants of inducible brain natriuretic peptide promoter activity. *Reg. Peptides* 2005 Jan;169-170.
22. He Q., LaPointe MC.. Interleukin-1 β regulation of the human brain natriuretic peptide promoter involves Ras-, Rac-, and p38 kinase-dependent pathways in cardiac myocytes. *J. Hypertens.* 1999 ;33: 283-289.
23. Goetze JP.. Biochemistry of pro-B-type natriuretic peptide-derived peptides: the endocrine heart revisited. *Clin Chem.* 2004; 50: 1503-1510.
24. Tsuruda T., Boerrigter G. Huntley BK., Noser JA., Cataliotti A., Costello-Boerrigter LC., et al. Brain natriuretic peptide is produced in cardiac fibroblasts and induces matrix metalloproteinases. *Circ. Res.* 2002; 91: 1127-31.
25. Casco VH., Veinot JP., Kuroski de Bold ML., Masters RG., Stevenson MM., de Bold AJ. Natriuretic peptide system gene expression in human coronary arteries. *J. Histochem. Cytochem.* 2002; 50: 799-809.
26. Liang F., O'Rear J., Schellenberger U., Tai L., Lasecki M., Schreiner GF., Apple FS., Maisel AS., Pollitt NS., Protter AA.. Evidence for functional heterogeneity of circulating B-type natriuretic peptide. *J Am Coll Cardiol.* 2007; 49: 1071-8.

27. Rockwell NC., Krysan DJ., Komiyama T., Fuller RS.. Precursor processing by Kex2/Furin proteases. *Chem Rev.* 2002; 102: 4525-4548.
28. Sawada Y., Inoue M., Kanda T., Sakamaki T., Tanaka S., Minamino N., Nagai R., Takeuchi T.. Co-elevation of brain natriuretic peptide and proprotein-processing endoprotease furin after myocardial infarction in rats. *FEBS Lett.* 1997; 400: 177-182.
29. Sawada Y., Suda M., Yokoyama H., Kanda T., Sakamaki T., Tanaka S., et al. Stretch-induced hypertrophic growth of cardiocytes and processing of brain-type natriuretic peptide are controlled by proprotein-processing endoprotease furin. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 20545-20554.
30. Wu F., Yan W., Pan J., Morser J., Wu Q.. Processing of pro-atrial natriuretic peptide by corin in cardiac myocytes *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 16900-16905.
31. Yan W., Wu F., Morser J., Wu Q.. Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme. *PNAS.* 2000; 27 (15): 8525-8529.
32. Liao X., Wang W., Chen S., Wu Q.. Role of glycosilation in corin zymogen activation. *J. Biol. Chem.* 2007; 282 (38): 27728-27735.
33. Knappe S., Wu F., Masikat MR., Morser J., Wu Q.. Functional analysis of the transmembrane domain and activation cleavage of human corin. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 52363-52370.
34. Kinnunen P., Vuolteenaho O., Ruskoaho H.. Mechanisms of atrial and brain natriuretic peptide release from rat ventricular myocardium: effect of stretching. *Endocrinol.* 1993; 132: 1961-1970.
35. Vaderheyden M., Bartunek J., Goethals M.. Brain and other natriuretic peptides: molecular aspects. *Eur. J. Heart Fail.* 2004; 6: 261-268.
36. Valli N., Gobinet A., Bordenave L.. Review of 10 years of the clinical use of brain natriuretic peptide in cardiology. *J. Lab. Clin. Med.* 1999; 134: 437-444.
37. Potter LR., Hunter T.. Guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors: structure and regulation. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 6057-60.
38. Matsukawa N., Grzesik WJ., Takahashi N., Pandey KN., Pang S., Yamauchi M., Smithies O.. The natriuretic peptide clearance receptor locally modulates the physiological effects of the natriuretic peptide system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; 96: 7403-7408.
39. Suga S., Nakao K., Hosoda K., Mukoyama M., Ogawa Y., Shirakami G., et al. Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide. *Endocrinology* 1992; 130: 229-239.
40. Rademaker MT., Charles CJ., Kosoglou T., Protter AA., Espiner EA., Nicholls MG., Richards AM.. Clearance receptors and endopeptidase: equal role in natriuretic peptide metabolism in heart failure. *Am. J. Physiol.* 1997; 273: H2372-H2379.

41. Shimizu H., Aono K., Masuta K., Asada H., Misaki A., Teraoka H.. Degradation of human brain natriuretic peptide (BNP) by contact activation of blood coagulation system. *Clin. Chim. Acta.* 2001; 305: 181-186.
42. Hunt PJ., Espiner EA., Nicholls MG., Richards AM., Yandle TG.. The role of the circulation in processing pro-brain natriuretic peptide (proBNP) to amino-terminal BNP and BNP-32. *Peptides.* 1997; 18 (10): 1475-1481.
43. Pankow K., Wang Y., Gembardt F., Krause E., Sun X., Krause G., Schultheiss H., Siems W., Walther T.. Successive action of meprin A and neprilysin catabolizes B-type natriuretic peptide. *Circ Res.* 2007; 101: 875-882.
44. Jensen KT., Carstens J., Pedersen EB.. Effect of BNP on renal hemodynamics, tubular function and vasoactive hormones in humans. *Am. J. Physiol.* 1998; 274: F63-72.
45. Kita T., Kida O., Yokota N., Eto T., Minamino N., Kangawa K., et al. Effect of brain natriuretic peptide-45, a circulating form of brain natriuretic peptide, in spontaneously hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol.* 1991; 202: 73-79.
46. Shimizu H., Masuta K., Aono K., Asada H., Sasakura K., et al. Molecular forms of human brain natriuretic peptide in plasma. *Clin. Chim. Acta.* 2002; 316: 129-135.
47. Hunt PJ., Yandle TG., Nicholls MG., Richards AM., Espiner EA.. The amino-terminal portion of pro-brain natriuretic peptide (Pro-BNP) circulates in human plasma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995; 214: 1175-83.
48. Ala-Kopsala M., Magga J., Peuhkurinen K., Leipala J., Ruskoaho H., Leppaluoto J., Vuolteenaho O.. Molecular heterogeneity has a major impact on the measurement of circulating N-terminal fragments of A- and B-type natriuretic peptides. *Clin. Chem.* 2004; 50:9: 1576-1588.
49. Schellenberger U., O'Rear J., Guzzetta A., Jue RA., Protter AA., Pollitt NS.. The precursor to B-type natriuretic peptide is an O-linked glycoprotein. *Arch. Biochem. Biophys.* 2006; 451(2): 160-6.
50. Huang W., Lee M., Perng H., Yang S., Kuo S., Chang H.. Circulating brain natriuretic peptide values in healthy men before and after exercise. *Metabolism* 2002; 51: 1423-1425.
51. Minamino N., Aburaya M., Ueda S., Kangawa K., Matsuo H.. The presence of brain natriuretic peptide of 12,000 daltons in porcine heart. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988; 155: 740-746.
52. Tateyama H, Hino J, Minamino N, Kangawa K, Ogihara T, Matsuo H. Characterization of immunoreactive brain natriuretic peptide in human cardiac atrium. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990; 14;166(3): 1080-7.
53. Ationu A, Carter ND. Molecular forms of brain and atrial natriuretic peptides in transplanted human heart. *Br J Biomed Sci.* 1994; 51 (4) :316-20.

54. Sagnella GA.. Measurement and importance of plasma brain natriuretic peptide and related peptides. *Ann. Clin. Biochem.* 2001; 38: 83-93.
55. Hughes D., Talwar S., Squire I. B., Davies J. E., Ng L. L.. An immunoluminometric assay for N-terminal pro-brain natriuretic peptide: development of a test for left ventricular dysfunction. *Clin. Sci.* 1999; 96: 373-380.
56. Seino Y., Ogawa A., Yamashita T., Fukushima M., Ogata K., Fukumoto H., Takano T.. Application of NT-proBNP and BNP measurements in cardiac care: a more discerning marker for the detection and evaluation of heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* 2004; 6: 295-300.
57. Hunt PJ., Richards AM., Nicholls MG., Yandle TG., Doughty RN., Espiner EA.. Immunoreactive amino-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-PROBNP): a new marker of cardiac impairment. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 1997; 47(3): 287-96.
58. Masson S., Vago T., Baldi G., Salio M., De Angelis N., Nicolis E., et al. Comparative measurement of N-terminal pro-brain natriuretic peptide and brain natriuretic peptide in ambulatory patients with heart failure. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2002; 40 (8): 761-763.
59. Hammerer-Lercher A., Neubauer E., Müller S., Pachinger O., Puschendorf B., Mair J.. Head-to-head comparison of N-terminal pro-brain natriuretic peptide, brain natriuretic peptide and N-terminal pro-atrial natriuretic peptide in diagnosing left ventricular dysfunction. *Clin. Chim. Acta* 2001; 310: 193-197.
60. Pfister R, Scholz M, Wielckens K, Erdmann E, Schneider CA. Use of NT-proBNP in routine testing and comparison to BNP. *Eur. J. Heart. Fail.* 2004; 6: 289-93.
61. Troughton RW., Frampton CM., Yandle TG., Espiner EA., Nicholls MG., Richards AM.. Treatment of heart failure guided by plasma aminoterminal brain natriuretic peptide (N-BNP) concentrations. *Lancet* 2000; 355: 1126-30.
62. Colucci WS., Elkayam U., Horton DP., Abraham WT., Bourge RC., Johnson AD., Wagoner LE., et al. Intravenous nesiritide, a natriuretic peptide, in the treatment of decompensated congestive heart failure. *N. Engl. J. Med.* 2000; 27: 246-253.
63. Schagger H, Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 1987; 166: 368-379.