

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭНДОЛИЗОСОМАЛЬНОЙ ДЕГРАДАЦИИ РЕКОМБИНАНТНОГО АЛЛЕРГЕНА ЧЕЧЕВИЦЫ LEN С3

Е.И. Финкина¹, И.В. Богданов¹, Н.Н. Строкач², Т.В. Овчинникова^{1,2}

¹ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

² Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Аллергия является заболеванием, которым по разным оценкам подвержено 25–30 % населения в развитых странах. Эффективным способом лечения аллергии, направленным на блокирование развития реакции гиперчувствительности, является аллерген-специфическая иммунотерапия (АСИТ), которая приобретает все большую популярность и значение в последнее время. Для создания современных аллерговакцин на основе рекомбинантных аллергенов и их гипоаллергенных аналогов важным является понимание механизмов развития В- и Т-клеточного иммунного ответа.

Процессинг аллергенной молекулы в лизосомах антиген-презентирующих клеток (АПК), последующее взаимодействие образовавшихся антигенных пептидов с белками главного комплекса гистосовместимости и их презентация В- и Т-клеткам играют фундаментальное значение в развитии иммунного ответа. К АПК относятся моноциты, дендритные клетки, В-лимфоциты, макрофаги и др., и протеолитическая деградация аллергенов идет в них с разной скоростью. В данной работе мы исследовали эндолизосомальную деградацию аллергена чечевицы Len с 3, используя макрофаги человека. Данный аллерген относится к классу липид-транспортирующих белков (LTP), представители которого являются одними из самых распространенных и клинически значимых растительных пищевых и пылевых аллергенов.

Макрофаги человека получали культивированием в CO₂-инкубаторе линии моноцитов человека THP-1 во флаконах в полной среде RPMI 1640 (среда RPMI 1640, 10 % FCS, 0,05 мМ ВМЕ, 2 мМ НЕРЕС, 100 МЕ/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 25 мкг/мл амфотерицина В), с последующей индукцией дифференцировки моноцитов в макрофаги 100 нг/мл форбол-12-миристан-13-ацетата (РМА) в течение 3 дней. Макрофаги собирали, разрушали в буфере, содержащем 250 мМ сахарозу, используя стеклянный гомогенизатор Поттера. Микросомальную фракцию получали, центрифугируя постядерный супернатант 60 мин при 100000g. Для высвобождения лизосомальных ферментов проводили несколько циклов замораживания / оттаивания полученной фракции. Суммарную концентрацию белков в лизосомальной фракции определяли по методу Бредфорд.

Известно, что в лизосомах макрофагов содержится набор протеолитических ферментов, основную массу которых составляют цистеиновые протеазы катепсины; многие из них расщепляют пептидные связи после остатка аргинина. Поэтому ферментативную активность полученной лизосомальной фракции макрофагов человека проверяли, используя хромогенные субстраты Z-AFR-pNA, Z-ALLR-pNa или L-BAPNA в соотношениях смесь ферментов: субстрат 1:20 и 1:100 (w/w). Было показано, что субстрат z-ALLR-pNA обладает большей чувствительностью к смеси лизосомальных ферментов, чем субстрат z-AFR-pNa. Полученная смесь лизосомальных ферментов была практически не активна в отношении субстрата L-BAPNA.

Рекомбинантный аллерген чечевицы Len с 3 получали путем гетерологичной экспрессии в клетках *Escherichia coli*. Эндолизосомальную деградацию аллергена проводили в 50 мМ буфере Tris/HCl, pH 4,8, содержащем 1 мМ DTT. Содержимое лизосом макрофагов человека брали в соотношении аллерген: смесь ферментов 3:1 (w/w). Реакционную смесь инкубировали длительно, отбирая аликвоты каждые 24 часа. Отсутствие контаминации проверяли по отрицательному контролю, который не содержал лизосомальную фракцию. Для сравнения проводили реакцию в тех же условиях с аллергеном персика Pru p 3, который является мажорным сенсибилизатором класса LTP. Результаты реакции оценивали с помощью SDS-электрофореза. Было показано, что Len с 3 очень устойчив к действию лизосомальных ферментов, даже через 96 часов расщепление белка не происходило. Наоборот, расщепление Pru p 3 персика происходило с большой скоростью, и уже через 48 часов аллерген был полностью деградирован. Возможно, это связано с тем, что в структуре Pru p 3 персика присутствует большее количество аргининов. Такая значительная разница в скорости деградации может свидетельствовать о разной иммуногенности и аллергенности двух этих аллергенов.