

## ОЛИГОМЕРЫ УРОМОДУЛИНА В РАСТВОРАХ РАЗЛИЧНОЙ ИОННОЙ СИЛЫ И pH

Верлов Н.А., Ланда С.Б., Эмануэль В.Л.

НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ

Мкр. Орлова роща д.1, 188300, РФ; e-mail: verlov\_na@npi.nrcki.ru

Поступила в редакцию: 21.07.2021

**Аннотация.** В работе рассматривается влияние ионной силы и pH раствора на фракционную композицию олигомерных форм уромодулина. Белок уромодулин в моче находится в виде олигомерных форм, в норме основной вклад относится к олигомерной форме массой 7МДа (UM(7)). Показано, что в растворах, содержащих монофракцию UM(7) при уменьшении pH и при увеличении ионной силы раствора, за счёт увеличения концентрации одновалентных ионов, наблюдается появление олигомерной формы массой 28МДа (UM(28)) на фоне уменьшения вклада UM(7). Полученные данные подтверждены на образцах нативной мочи методом анализа треков наночастиц при обессоливании раствора мочи и при увеличении концентрации ионов Na<sup>+</sup> при титровании 1М NaCl. В исследованном диапазоне концентрации солей показана стабильность белка уромодулина и его олигомерных форм методом дифференциальной сканирующей флуориметрии. Полученные данные позволили определить границу концентрации одновалентных ионов (находится в диапазоне 150 мМ Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>) при превышении которой в моче в норме наблюдается образование UM(28). Подтверждены данные о переходе UM(7) в UM(28) при увеличении концентрации одновалентных ионов, однако сам феномен, а также роль UM(28) в стабилизации коллоида мочи, требуют дальнейшего изучения.

**Ключевые слова:** Уромодулин, олигомеры, ионная сила, pH, титрование.

### ВВЕДЕНИЕ

Уромодулин является основным белком мочи (в норме). Уромодулин экспрессируется исключительно клетками эпителия, выстилающими просвет канальца в толстом восходящем сегменте петли Генле. После выхода в просвет канальца нефрона мономеры, за счёт ZP-домена в структуре белка, демонстрируют тенденцию к образованию олигомеров – высокомолекулярных фибрильных нитей, которые иногда можно обнаружить при микроскопическом исследовании осадка мочи в виде гиалиновых цилиндров. Олигомеры уромодулина играют важную роль в регуляции водно-ионного обмена, особенно в толстом восходящем сегменте петли Генле. Доказана их иммуномодулирующая роль и противобактериальная активность, а также показано, что именно олигомеры уромодулина играют существенную роль в стабилизации коллоида мочи за счёт ингибирования образования первичных микрокристаллитов и, возможно, препятствования агрегации уже образовавшихся микрокристаллов в более крупные конкременты. Несмотря на то, что белок экспрессируется исключительно в эпителиальных клетках канальца нефрона, его также можно определить в крови, где его концентрация почти в 1000 раз меньше, чем в моче. Уровень уромодулина в крови и моче является биомаркером функциональной активности почек [1].

В настоящее время опубликовано множество работ, описывающих связь концентрации уромодулина с тяжестью развития патологического процесса в почках, в том числе работ, в которых показано, что при мутациях в гене UMOD, кодирующем уромодулин, радикально возрастает риск возникновения уролитиаза и, как следствия тубулоинтестинальных повреждений - хронической болезни почек. Тем не менее, в настоящее время отсутствует единое мнение относительно механизмов, лежащих в основе стабилизирующего действия, которое оказывают на коллоид мочи олигомеры уромодулина. Важно отметить, что мономер уромодулина, вышедший в просвет канальца, является сильноотрицательным полианионом (за счет высокого содержания силовых кислот в 7 сайтах гликозилирования изоэлектрическая точка – 3,2). Олигомеры уромодулина, в т.ч. наиболее широко представленная в моче в норме олигомерная форма с массой 7МДа – UM(7), также сохраняют выраженные электроотрицательные свойства. Вклад крупной электроотрицательной молекулы в стабилизацию коллоида мочи является значимым в широком диапазоне pH и концентрации неорганических ионов в моче. Однако в области низких значений pH и при высокой концентрации литогенных ионов имеет место превращение формы UM(7) в олигомерную форму с молекулярной массой 28 МДа – UM(28), характеризующуюся меньшим поверхностным зарядом и демонстрирующую выраженную тенденцию к гелеобразованию. Данный феномен наблюдается в норме, но существенно более выражен при уролитиазе. Ранее авторами исследования было показано, что UM(7) обладает выраженными электроотрицательными свойствами (величина дзета-потенциала -23,7±3,2 мВ), тогда как UM(28) характеризуется существенно меньшим поверхностным зарядом - -3,5±3,1 мВ. Можно предположить, что стабилизация коллоида мочи в норме, в физиологически адекватном диапазоне концентраций одновалентных ионов, происходит за счет связывания избыточных ионов вблизи поверхности электроотрицательных молекул UM(7). При увеличении концентрации ионов, когда электроотрицательных свойств заряженной молекулы UM(7) становится недостаточно для ингибирования процесса кристаллогенеза в моче, наблюдается образование микрокристаллитов и их последующий рост в конкременты более крупных размеров.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для определения влияния pH и концентрации одновалентных катионов на олигомерные формы UM готовили универсальный буфер из смеси уксусной фосфорной и борной кислот в эквимолярном соотношении по 40 мМ каждая. До требуемого pH смесь доводили 200 мМ NaOH. В выбранном диапазоне pH ионная сила (IF) буферного раствора колебалась от 123 мМ для pH - 2.56 до 136 мМ для pH – 9,91. Для получения необходимой ионной силы раствор буфера либо разбавляли дистиллированной водой до нужной концентрации, либо доводили до нужной концентрации 1М или 3М раствором NaCl. Аликвоты белка, выделенного и очищенного, как описано выше, разбавлялись буфером в соотношении 1:1000 и помещались в кювету лазерного корреляционного спектрометра для определения фракционного состава. Для формы UM(7) (Rh = 100 нм) строили кривые зависимости вклада в рассеяние от pH раствора для каждой ионной силы отдельно. Для выяснения различий в действии одновалентных катионов буферные растворы готовили также, только NaOH заменяли на KOH или водный раствор аммиака, а NaCl на KCl или NH<sub>4</sub>Cl.

При исследовании образцов мочи проводилась оценка осадка мочи и общеклинический анализ мочи. При исследовании осадка мочи для осаждения конкрементов мочи использовали центрифугу Cytospin 4 (Thermo Fisher Scientific) с последующим микроскопическим анализом полученного осадка. Клинический анализ производился на анализаторе DocUReader (77 Elektronika) с использованием тест-полосок Labstrip U-11 Plus. Критерием включения в исследуемую группу являлось отсутствие в поле кристаллов оксалата.

Обессоливание образца мочи проводили двумя способами, с применением гель-фильтрации на колонке Sephadex G25 Coarse) и с применением процедуры диализа с использованием мембраны с размером пор 12-14 кДа. Контроль проводимости образца при диализе проводился с использованием Analog Electrical Conductivity Sensor /Meter V2 (DFRobot Gravity). Полученный в результате диализа ретентат отбирался через равные промежутки времени, для проведения анализа методом анализа треков наночастиц и методом корреляционной спектроскопии.

Метод анализа треков наночастиц позволяет исследовать состав коллоида и определять абсолютную концентрацию частиц коллоида и их размеров. Измерение проводилось на приборе NanoSight LM10 (Malvern instruments) с использованием лазерного источника 405 нм.

Метод корреляционной спектроскопии в настоящем исследовании реализован на лазерном корреляционном спектрометре DLS (ООО “ИнтоксМед”) с гетерогенной схемой измерения [2]. Результатом измерения образца является гистограмма распределения размеров частиц и вклада частиц, заданного размера, в рассеяние, при этом общее рассеяние всех частиц образца берется за 100%.

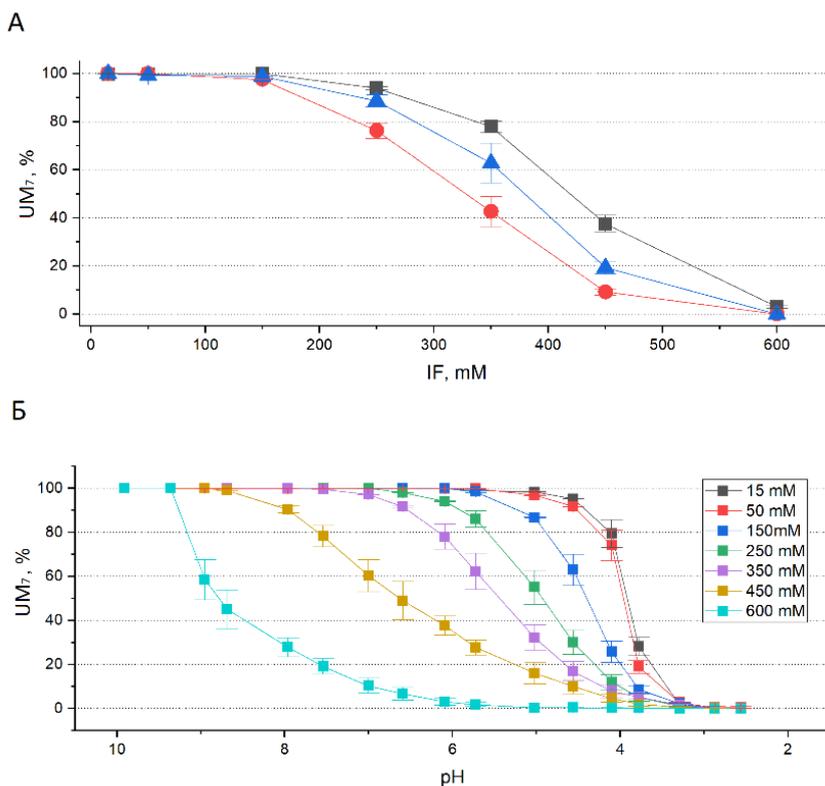
Оценка конформационной стабильности уромодулина в образцах нативной и разбавленной мочи проводилась с использованием метода дифференциальной сканирующей флуориметрии (nanoDSF) на установке Tycho (NanoTemper). Данным методом можно обнаруживать изменения флуоресценции ароматических остатков аминокислот (триптофан, тирозин) исследуемого белка при нагревании образца в капилляре, в процессе измерения производится регистрация флуоресценции на длинах волн 330/350 нм. Флуоресценция белка зависит окружения триптофанов и тирозинов входящих в его структуру, внутри гидрофобного ядра белков, аминокислоты экранируются от окружающего водного растворителя и не флуоресцируют в выбранном диапазоне, в процессе разворачивания происходит изменение интенсивности флуоресценции и/или длины волны максимума излучения.

Статистический анализ проводился в R – язык и среда для статистических вычислений (v. 4.0.4; R Core Team, Австрия) с использованием пакетов: rstatix (v. 0.7.0.; Alboukadel Kassambara, 2021), ggpubr (v. 0.4.0.; Alboukadel Kassambara, 2020), tidyverse (Wickham et al., 2019), PerformanceAnalytics (Brian G. Peterson., 2020). Различия в средних значениях для соседних групп анализировали с использованием критерия Стьюдента. Коэффициент корреляции Пирсона использовали для оценки статистической значимости взаимосвязи между двумя непрерывными переменными. Различия считались статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании образцов выделенного белка и образцов нативной мочи, на основании данных, полученных методом анализа треков наночастиц и динамического рассеяния света, количество олигомерной формы UM(7), с характерным размером 100 нм, у здоровых людей всегда близко к 100 %, при титровании кривая имеет вид типичной «пороговой кривой» с точкой перегиба при концентрации 250 мМ для натрия и аммония и 150 мМ для калия. До достижения пороговой величины ионной силы при увеличении концентрации одновалентных ионов образования формы UM(28) идет медленно, а при достижении порога концентрации резко ускоряется. Уровень в 10% достигается при концентрации равной 580 мМ для натрия, 545 мМ для аммония и 450 мМ для калия. Для натрия точка перегиба близка к физиологическому верхнему референтному интервалу концентрации этого катиона в моче (220 мМ). Для калия точка перегиба наступает при 150 мМ и еще больший запас имеется по аммонiu.

Переход из формы UM(7) в форму UM(28) происходит и при увеличении кислотности раствора. Кривые зависимости количества формы UM(7) от pH так же, как и в случае с одновалентными катионами, носят ярко



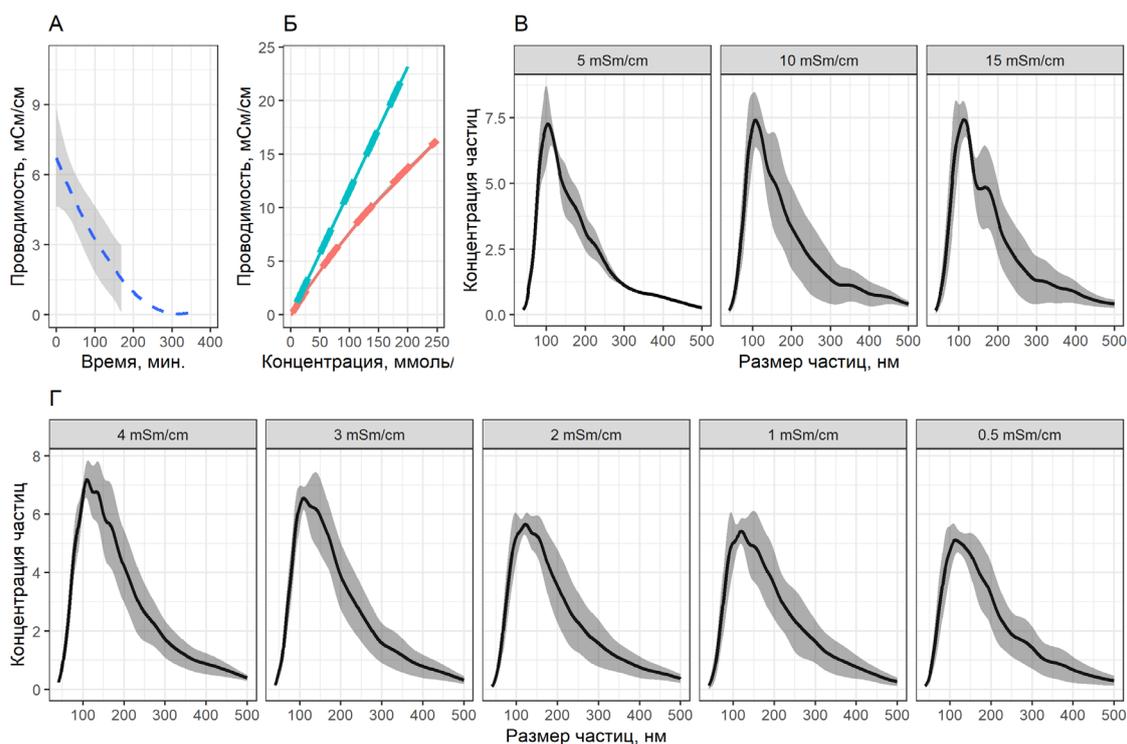
**Рисунок 1.** А - зависимость вклада в рассеяние UM(7) от ионной силы растворителя (при титровании NaOH, KOH и водным раствором NH<sub>4</sub>); Б - зависимость вклада в рассеяние UM(7) от pH (в т.ч. при титровании при титровании NaOH)

выраженный пороговый характер. Особенно это заметно, когда концентрация соли в растворе не превышает физиологического диапазона (250 mM Na). В этом случае резкое уменьшение содержания формы UM(7) происходит при pH менее 4, то есть вблизи изоэлектрической точки нормального UM, при этом уровень 10% достигается при pH 3,5–4,0. При увеличении концентрации соли выше физиологического предела точка перегиба смещается сначала в область pH = 6, а затем и в область щелочных pH: при концентрации Na 450 mM точка перегиба находится при pH = 8, а при 600 mM NaCl кривая становится беспороговой. При этом 10ти% предел при концентрации соли 450 мм достигается при pH = 4,5, а при 600мM NaCl при pH = 7.

Исходя из полученных зависимостей, можно сделать вывод, что превышение содержания одновалентных ионов сверх порогового значения приводит к трансформации UM(7) в UM(28) в тестовом растворе. Чувствительность раствора белка к концентрации ионов Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> и NH<sub>4</sub><sup>+</sup> также различна, так перегиб для K<sup>+</sup> наблюдается при 150 mM, а для Na<sup>+</sup> - 250 mM. Зависимость содержания UM(7) от величины pH раствора также имеет пороговый характер (обратная шкала выбрана для того, чтобы показать переход от 100% UM(7) до 0%). Можно отметить, что pH и ионная сила раствора обладают аддитивным эффектом в части инициации процесса трансформации UM(7) в UM(28). Полученные зависимости позволяют сделать вывод о наличии процессов агрегации UM(7) и образования UM(28) внутри физиологически адекватного (для мочи в норме) диапазона параметров растворителя.

Сопоставление полученных данных с данными, полученными из литературных источников и данных, полученных в рамках исследования дзета-потенциала уромодулина, полученного от здоровых добровольцев, позволяют предположить следующее: изоэлектрическая точка белка уромодулина в норме располагается вблизи точки 3,5 [3], что можно видеть на кривых титрования (рис. 1Б) – точка перегиба находится в 3,5, при увеличении pH раствора наблюдаем увеличение абсолютной величины дзета-потенциала до величины -23,7±3,2 мВ.

При диализе образца мочи происходит обессоливание и удаление из образца низкомолекулярных соединений, в ретентате содержится олигомеры уромодулина UM(7) и UM(28) и альбумин. Предварительно образец мочи охарактеризован на предмет отсутствия кристаллов оксалатов в осадке мочи, для каждого образца в эксперименте проводили общеклинический анализ мочи, pH образцов мочи в эксперименте находилась в диапазоне от 5,5 до 7,5, остальные параметры мочи находились в диапазоне нормы. Проводимость нативной мочи в исследованных образцах находилась в диапазоне от 6,3 до 10,1 мСм/см, динамика изменения проводимости образца при диализе представлена на рисунке 2А. Проводимость раствора мочи в основном определяется содержанием ионов Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup>, данные зависимости проводимости от суммарной концентрации Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup> в моче и данные, полученные при титровании хлорида натрия в водном растворе, представлены на рисунке 2Б. Измерение фракционного состава исследуемых образцов при различной проводимости представлены на Рисунке 2В. Можно отметить, что при увеличении проводимости раствора до 15 мСм/см (ионной силы раствора по Na<sup>+</sup>



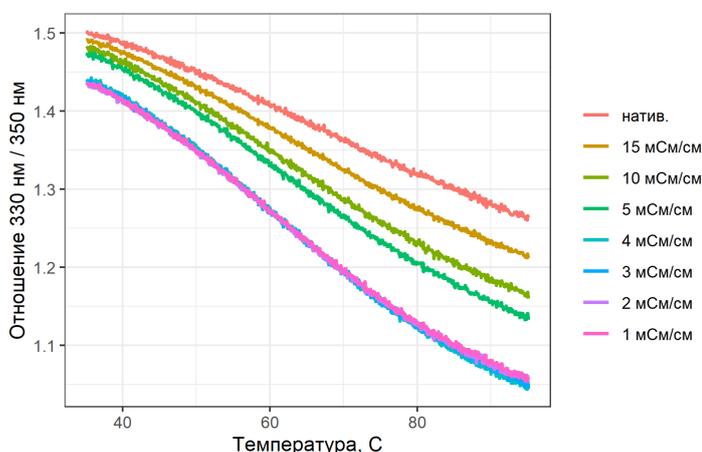
**Рисунок 2.** А – зависимость проводимости образца мочи от длительности диализа; Б – Зависимость проводимости образца мочи от концентрации ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  (синяя кривая) [4], кривая зависимости проводимости от концентрации  $\text{NaCl}$  (красная кривая); В – Фракционный состав мочи при титровании  $\text{NaCl}$ ; Г – фракционный состав мочи при диализе

и  $\text{K}^+$  до 150 мМ см. рис. 2Б) можно наблюдать появление пика в области 150–200 нм соответствующий UM(28). Диализ раствора и постепенное снижение проводимости (ионной силы) до величины 0,5 мСм/см не приводит к изменению фракционного состава образца, при этом наблюдается изменения концентрации образца, что обусловлено разбавлением образца при диализе.

Для диализованных образцов и для образцов мочи для которых проводили титрование  $\text{NaCl}$  проводили процедуру оценку конформационной стабильности методом дифференциальной сканирующей флуорометрии. Ни Рисунок 3 представлены полученные данные, можно отметить, что несмотря на сдвиг на константу, а также отсутствие перегиба характерного для кривой плавления белка, зависимость отношения флуоресценции 330 нм / 350 нм в зависимости от температуры идентичны для всех исследованных образцов, что позволяет говорить о том, что структура и упаковка уромодулин в исследованных образцах идентична и не меняется в зависимости от проводимых манипуляций.

## ВЫВОДЫ

В рамках исследования показана зависимость содержания UM(7) и UM(28) в образцах выделенного белка уромодулина и в нативной моче при титровании в растворах с измененных рН и в растворах различной ионной



**Рисунок 3.** Данные дифференциальной сканирующей флуорометрии для исследованных образцов мочи при титровании  $\text{NaCl}$  и при диализе

силы. Можно отметить, что в исследованном диапазоне проводимости, данные динамического рассеяния света на образцах, полученных при титровании выделенного белка, совпадают с данными, полученными при титровании разбавлении и титровании NaCl нативной мочи. Можно сделать вывод, что в норме для уромодулина, как выделенного из мочи, так и находящегося в нативных условиях мочи диапазон начала образования UM(28) находится в диапазоне 150 mM Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>.

**Список литературы / References:**

1. Devuyst O., Olinger E., Rampoldi L. Uromodulin: from physiology to rare and complex kidney disorders. *Nat. Rev. Nephrol.*, 2017, vol. 13, no. 9, pp. 525-544.
2. Lebedev A.D. et al. Heterodyne quasi-elastic light-scattering instrument for biomedical diagnostics. *Appl. Opt.*, 1997, vol. 36, no. 30, pp. 7518-7522.
3. Pesce A.J. et al. Renal tubular interactions of proteins. *Clin. Biochem.*, 1980, vol. 13, no. 5, pp. 209-215.
4. Parkin W.G., Dickinson R.W. The use of electrical conductivity measurement in the calculation of ion-free water loss in urine. *Anaesth. Intensive Care*, 1987, vol. 15, no. 4, pp. 379-383.

**OLIGOMERS OF UROMODULIN IN SOLUTIONS OF DIFFERENT IONIC STRENGTH AND PH**

**Verlov N.A., Landa S.B., Emanuel V.L.**

NRC "Kurchatov Institute" - PNPI

*Mkr. Orlova Roshcha 1, 188300, Russia; e-mail: verlov\_na@pnpi.nrcki.ru*

**Abstract.** We investigated effect of ionic strength and pH solution on fractional composition uromodulin oligomeric forms. Uromodulin in urine exist in oligomeric forms: normally, main contribution belongs oligomeric form with a mass 7MDa (UM(7)). It has been shown that in solutions, monofraction UM(7) with a decrease in pH and with an increase in the ionic strength of the solution, due to an increase monovalent ion concentration, appearance oligomeric form with a mass 28MDa (UM(28)) against background of a decrease in contribution UM(7). Obtained data were confirmed on native urine samples by method of nanoparticle track analysis during urine solution desalting and with increasing Na<sup>+</sup> ions concentration during titration with 1M NaCl. Stability of the uromodulin protein and its oligomeric forms in salt concentration range was shown by differential scanning fluorometry. Data obtained made it possible to determine limit of the concentration of monovalent ions (in range of 150 mM Na<sup>+</sup> / K<sup>+</sup>), above which the formation UM(28) is observed in urine of healthy patients. The data on the transition of UM (7) to UM (28) with an increase in the concentration of monovalent ions have been confirmed; however, the phenomenon itself, as well as the role of UM (28) in stabilizing the urine colloid, require further study.

**Key words:** *Uromodulin, oligomers, ionic strength, pH, titration.*