

Буйновская Нина Сергеевна

**ГИБРИДНЫЕ БИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ЛИГАНД-СВЯЗЫВАЮЩИЕ
БЕЛКИ НА ОСНОВЕ ВЫСОКОАКТИВНОЙ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ
МОРСКОЙ БАКТЕРИИ *SOBETIA AMPHILECTI* КММ 296 (CтАР)**

1.5.4 – биохимия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Владивосток – 2023

Работа выполнена в Тихоокеанском институте биоорганической химии
им. Г.Б. Елякова ДВО РАН

Научный руководитель:

кандидат биологических наук
Балабанова Лариса Анатольевна

Официальные оппоненты:

Булгаков Виктор Павлович
доктор биологических наук, член-
корреспондент РАН, руководитель
подразделения, главный научный сотрудник
лаборатории биоинженерии ФНЦ
Биоразнообразия ДВО РАН.

Розанов Алексей Сергеевич
кандидат биологических наук, ведущий
научный сотрудник научного центра
трансляционной медицины АНО ВО
«Университет «Сириус»».

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки
Институт биоорганической химии им.
академиков М.М. Шемякина и Ю.А.
Овчинникова РАН, г. Москва.

Защита состоится «22» декабря 2023 г. в 10:00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.213.01 при Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН по адресу: 690022, г. Владивосток, проспект 100 лет Владивостоку, 159, ТИБОХ ДВО РАН. Факс: (423)231-40-50, e-mail: dissovet@piboc.dvo.ru

С диссертацией можно ознакомиться в филиале Центральной научной библиотеки ДВО РАН (г. Владивосток, проспект 100 лет Владивостоку, 159, ТИБОХ ДВО РАН). Текст диссертации и автореферата размещен на сайте www.piboc.dvo.ru

Автореферат разослан « » ноября 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Чингизова Е. А

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Одним из актуальных направлений белковой инженерии является генетическая модификация белков. Впечатляющим результатом применения такого подхода является получение гибридных и мутантных белков с новыми или улучшенными функциями для использования в биомедицинских технологиях. Получение гибридных белков генно-инженерным методом включает в себя создание генетической конструкции и оптимизацию условий экспрессии генов в рекомбинантных или трансгенных клетках организма-хозяина для обеспечения направленного синтеза целевых белков. Гибридные мультифункциональные белки можно использовать для диагностики, профилактики и терапии онкологических и инфекционных заболеваний.

Получение гибридных бифункциональных белков путем конструирования генетического вектора, содержащего ген высокоактивной щелочной фосфатазы (ЩФ) морской бактерии *Cobetia amphilecti* КММ 296 (*CmAP*) и ген лектина морской мидии *Crenomytilus grayanus* (*CGL*) или порина бактериального патогена *Yersinia pseudotuberculosis* (*OmpF*), может повысить специфичность и эффективность новых диагностических тест-систем для выявления соответственно онкологических или инфекционных заболеваний человека. Методом твердофазного лектин-иммуноферментного анализа (ТЛФА) показано, что лектин мидии *CGL* обладает способностью связывать галактозосодержащие антигены и онкомаркеры. Порообразующий белок *Y. pseudotuberculosis* – порин *OmpF* (иерсинин), реагирует с антисыворотками к штаммам патогенных для человека видов иерсиний, на основе чего был разработан метод диагностики псевдотуберкулеза с использованием иерсинина в качестве диагностического антигена.

Целью данной работы является получение гибридных бифункциональных аналогов лектина *CGL* и порина *OmpF* на основе генетической конструкции, несущей ген высокоактивной ЩФ *C. amphilecti* КММ 296 (*CmAP*), изучение свойств полученных гибридов белков и возможности их применения в молекулярной биотехнологии и медицине.

Задачи исследования:

1. Получить генетические конструкции гибридных аналогов лектина *CGL* и порина *OmpF*, соединенных со щелочной фосфатазой *CmAP*, для клонирования в клетках *Escherichia coli*.
2. Провести скрининг рекомбинантных клонов *E. coli* для выявления признаков синтеза рекомбинантных белков и получения штаммов-продуцентов гибридных бифункциональных полипептидов *CmAP/CGL* и *CmAP/OmpF*.
3. Разработать и оптимизировать схему выделения и очистки рекомбинантного белка *CmAP* и его гибридных бифункциональных аналогов *CmAP/CGL* и *CmAP/OmpF*.
4. Провести исследование лиганд-связывающих и ферментативных свойств гибридных бифункциональных белков *CmAP/CGL* и *CmAP/OmpF* методами ТЛФА и ИФА соответственно.
5. Показать возможность использования гибридных бифункциональных белков *CmAP/CGL* и *CmAP/OmpF* в молекулярной биотехнологии и медицине.
6. Показать возможность использования рекомбинантной высокоактивной щелочной фосфатазы *CmAP* в молекулярной биологии и медицине.
7. Провести исследование структурно-функциональных особенностей лектина *CGL* методами *in silico* и ПЦР-опосредованного сайт-направленного мутагенеза гибридного бифункционального белка *CmAP/CGL*.

Научная новизна работы. Впервые разработаны экспрессирующие генетические конструкции, несущие гены лектина мидии (CGL) и неспецифического порообразующего белка возбудителя псевдотуберкулеза (OmpF), объединённые с геном высокоактивной ЩФ *SmAP*, для направленного синтеза бифункциональных белков *SmAP/CGL* и *SmAP/OmpF* в клетках рекомбинантного штамма *E. coli* Rosetta (DE3); выделены гибридные белки *SmAP/CGL* и *SmAP/OmpF* и охарактеризованы их лиганд-связывающие и ферментативные свойства. Показана возможность использования *SmAP/CGL* и *SmAP/OmpF* для выявления муциноподобных онкомаркеров и антител к возбудителю псевдотуберкулеза соответственно.

Впервые обнаружена дефосфорилирующая активность рекомбинантной ЩФ *SmAP* в отношении бактериальных липополисахаридов (ЛПС), что является основой для разработки методов борьбы с эндотоксемией.

В процессе выполнения работы впервые на основе результатов структурного анализа *in silico* получены следующие мутантные формы галактозоспецифичного лектина CGL: с тройными мутациями в трех углеводсвязывающих сайтах - H16A/P17A/G19A (Site 1), H64A/P65A/G67A (Site 2) и H108A/P109A/G111A (Site 3); с одиночными мутациями в активном центре - His37Ala и Asn119Ala (Site 1), His85Ala и Asn27Ala (Site2) и His129Ala, Asp127Ala и Glu75Ala (Site 3). Мутантные CGL были использованы для изучения свойств лектина с помощью определения уровня активности ЩФ *SmAP* в составе гибридного аналога в комплексах «*SmAP/CGL* - лиганд». В результате удалось детализировать структуру сайтов связывания тримера CGL с углеводными эпитопами муциноподобных онкомаркеров, оценить вклад отдельных аминокислотных остатков активного центра CGL в его углевод-связывающую активность и установить механизм связывания с такими лигандами, как муцин (PSM) и глоботриоза (G3).

Практическая и теоретическая значимость работы. Теоретическая значимость работы заключается в возможности применения ее результатов для исследования структурно-функциональных особенностей лиганд-связывающих белков путем их мечения высокоактивной ЩФ *SmAP*. Результаты работы могут служить источником теоретических знаний в профильных институтах и университетах, а также могут быть включены в методические руководства.

К **практической** значимости работы относятся: возможности применения полученных данных для дальнейшего исследования взаимодействия лектинов и поринов с лигандами в клинических образцах пациентов, а также для структурно-функциональных исследований диагностических и терапевтических мишеней. Кроме того, в результате проведенных исследований выявлен терапевтический потенциал ЩФ морской бактерии.

Апробация работы и публикации. Результаты диссертационной работы были представлены на следующих международных и российских конференциях: Всероссийская научно-практическая конференция «Биологически активные вещества из морских гидробионтов в биотехнологии и медицине», г. Владивосток, 2014 г; Материалы региональной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых по естественным наукам, Владивосток, 15–30 апреля 2014 г; Проблемы развития высоких технологий «PhysioMedi»: сборник статей Восьмой международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине», Санкт-Петербург, Россия 20–22 мая, 2015 г; V съезд физиологов СНГ, V съезд биохимиков России, Конференция ADFLIM, Сочи – Дагомыс, Россия, 4–8 октября 2016 г; «Фундаментальная гликобиология» III Всероссийская конференция, Владивосток, 7–12 сентября 2016 г; The 3rd International symposium on Life Sciences, Vladivostok, Russia, September 4–8, 2018: proc. and abstrs. – Vladivostok, 2018; «Сохранение и преумножение генетических ресурсов микроорганизмов»

Всероссийская школа-конференция, Санкт-Петербург, 22–23 июня 2022 г.; The 9th annual student scientific conference in English, Vladivostok, 25–31 May 2022; Международная научная конференция по моделированию и анализу комплексных систем и процессов, Москва, 7-9 декабря, 2022 г.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 22 работы, в том числе 7 статей в ведущих рецензируемых зарубежных и отечественных научных журналах, определенных списком ВАК, 1 патент и 14 тезисов докладов в материалах научных конференций.

Личный вклад автора. Основные результаты работы получены автором лично, включая конструирование рекомбинантных плазмид, наработку препаративных количеств плазмидных ДНК, трансформацию клеток *E. coli*, гетерологическую экспрессию полученных конструкций в *E. coli*, разработку схемы выделения и очистки рекомбинантных белков, оценку специфической активности белков методами ИФА и гемагглютинации, ПЦР-опосредованный сайт-направленный мутагенез гибридного лектина. *In silico* анализ сайтов связывания лектина и предсказание структуры лиганд-связанных комплексов лектина и его мутантов выполнены канд. физ.-мат. наук Лихацкой Галиной Николаевной (Лаборатория биоиспытаний и механизма действия биологически активных веществ ТИБОХ ДВО РАН) при активном участии автора. Оценка лиганд-связывающей активности гибридных лектинов *StAR/CGL* проведена при консультативной помощи канд. биол. наук Чикаловец Ирины Владимировны (Лаборатория химии неинфекционного иммунитета ТИБОХ ДВО РАН). Оценка связывающей активности гибридного порина *StAR/OmpF* в отношении антител к рекомбинантному *OmpF* порину и сывороток крови больных иерсиниозом проведена под руководством канд. биол. наук Портнягиной Ольги Юрьевны (Лаборатория молекулярных основ антибактериального иммунитета ТИБОХ ДВО РАН). Оценка ферментативной активности рекомбинантной *StAR* в отношении ЛПС проведена под руководством канд. биол. наук Бахолдиной Светланы Ивановны (Лаборатория молекулярных основ антибактериального иммунитета ТИБОХ ДВО РАН). Эксперимент по определению влияния рекомбинантной *StAR* на пролиферацию раковых клеток линий Т-47D, MDA-MB-231 и HT-29 проведен при участии млад. науч. сотр. Кузьмич Александры Сергеевны (Лаборатория химии неинфекционного иммунитета ТИБОХ ДВО РАН). Метод ТЛФА на основе использования лектина *StAR/CGL* с активностью ЩФ и муциноподобных онкомаркеров разработан под руководством доцента, канд. биол. наук Ковальчук Светланы Николаевны (Лаборатория морской биохимии ТИБОХ ДВО РАН).

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 149 страницах, включает 30 рисунков, 9 таблиц. Список литературы включает 203 источника.

Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю к.б.н. Балабановой Л.А. за помощь в выполнении диссертационной работы и безграничное терпение, а также д.х.н. Новиковой О.Д.; к.б.н. Портнягиной О.Ю.; к.б.н. Чикаловец И.В. за консультацию при определении связывающей активности гибридных белков; к.б.н. Бахолдиной С.И. и м.н.с. Кузьмич А.С. за консультации при проведении экспериментов по оценке активности *StAR*; к.ф.м.н. Лихацкой Г.Н. за проведение *in silico* анализа сайтов связывания лектина *CGL* и предсказание структуры его лиганд-связанных комплексов; к.б.н. Ковальчук С.Н. за консультацию и помощь в разработке методов ТЛФА на основе гибридного лектина, за поддержку научного интереса автора.

Работа выполнена при участии Молодежной научно-исследовательской лаборатории

рекомбинантных ДНК-технологий Передовой инженерной школы ДВФУ.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Материалы и методы исследования.

Получение генетических конструкций гибридных аналогов лектина CGL и порина OmpF с щелочной фосфатазой CmaAP. Рекомбинантные плазмидные ДНК pET40CmaAP/CGL и pET40CmaAP/OmpF, кодирующие полноразмерные последовательности ЩФ CmaAP, лектина CGL и порина OmpF соответственно, и линкерного пептида (Gly₄Ser)₃, получали встраиванием гена CGL или OmpF в SacI/SalI-фрагмент плазмиды pET 40(b+) (Novogen).

Аmplификацию гена CGL (JQ314213) проводили с использованием кДНК мидии *S. grayanus* и геноспецифичных праймеров, содержащих сайты рестрикции SacI и SalI (Fermentas) для клонирования в плазмиду pET 40(b+) после гена CmaAP и линкера. Амплификацию гена OmpF (AY855840) проводили с использованием ДНК *Y. pseudotuberculosis* и геноспецифичных праймеров, включающих те же сайты. Плазмидную ДНК pET40CmaAP и ПЦР-фрагмент гена CGL или OmpF обрабатывали рестриктазами SacI и SacII в соответствии с методикой производителя. Гидролизаты ДНК очищали набором Cleanup (Евроген). Очищенные гены и векторную часть плазмиды pET40CmaAP лигировали в 50 мкл буфера согласно инструкции производителя T4-лигазы (Fermentas). 10 мкл реакционной смеси использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* DH5 α . Трансформанты высевали на LB-агар, содержащий 25 мкг/мл канамицина, инкубировали 16 ч при 37 °С, клоны отсеивали в жидкую среду LB для выделения плазмид pET40CmaAP/CGL или pET40CmaAP/OmpF и проводили скрининг на наличие мутаций при помощи автоматического секвенирования.

Экспрессия, выделение и очистка рекомбинантных белков. Рекомбинантные клетки *E. coli* Rosetta (DE3), трансформированные плазмидой, высевали в 10 мл жидкой среды LB, содержащей 25 мкг/мл канамицина и инкубировали 12 ч на шейкере при 37 °С, 250 об/мин. Затравку инокулировали в 150 мл среды LB (25 мкг/мл канамицина) и выращивали при 37 °С, 250 об/мин до достижения OD₆₀₀ 0,6-0,8. Далее в среду добавляли индуктор изопропил-D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до 1 мМ и инкубировали 12-16 ч при 18 °С, 250 об/мин.

Затем клетки центрифугировали при 4000 об/мин в течение 15 мин, ресуспандировали в 250 мл буфера А, содержащем 20 мМ Трис-НСl (рН 9,0), 5 мМ имидазола, 0,5 М NaCl, 20% глицерин (Sigma-Aldrich), обрабатывали ультразвуком на ледяной бане до осветления лизата, центрифугировали при 11000 об/мин в течение 20 мин. Супернатант насыщали сухим сульфатом аммония до 30%. Осадок удаляли центрифугированием 15 мин, 11000 об/мин, 4 °С. Супернатант собирали и донасыщали сульфатом аммония до 70% в течение 1 ч. Осадок центрифугировали 15 мин при 11000 об/мин при комнатной температуре и ресуспандировали в буфере А. Результирующий супернатант наносили на металлоафинный сорбент Ni²⁺- IMAC-Sepharose (160 мл, GE Healthcare), уравновешенный в буфере А, скорость нанесения - 1 мл/мин. Колонку промывали буфером А, после чего рекомбинантный белок элюировали линейным градиентом 0,005–0,5 М имидазола в буфере А (2 мл/мин). После этого проводили диализ в течение 12 ч против буфера А, содержащего 50% глицерина. Гис-таг рекомбинантного белка удаляли в течение 12 ч инкубации с энтеропептидазой L-NEP (1-2 ед/1 мг). После рехроматографии на металлоафинном сорбенте несвязавшиеся фракции собирали и наносили на ионнообменный сорбент Sours 15 Q (8 мл, GE Healthcare). Элюцию проводили градиентом 0,15-1,0 М NaCl в буфере А (2 мл/мин). Фракции целевого белка идентифицировали с помощью субстрата *n*-НФФ

по наличию ферментативной активности ЩФ и по молекулярной массе, определенной методом ДСН-ПААГ электрофореза (Laemmli, 1970).

Определение ферментативной активности щелочной фосфатазы CmAP. Для определения активности ЩФ рекомбинантных белков использовали стандартную процедуру: 5 мкл образца, 495 мкл буфера для определения активности ЩФ и (2 mM п-нитрофенилфосфата (п-НФФ), 0,1 M Трис-НСl, 0,2 M КCl, pH 10,0 или 15 mM п-НФФ, 1 M диэтанолamina (ДЭА), pH 10,3) инкубировали 30 мин. при 37 °C. Реакцию останавливали 0,5 M NaOH (2 мл). Количество образовавшегося п-НФ определяли спектрофотометром при 400 нм против контрольного образца (без фермента). За единицу активности использовали количество фермента, необходимого для образования 1 mM п-НФ за 1 мин.

***In silico* и ПЦР-опосредованный сайт-направленный мутагенез гибридного бифункционального белка CmAP/CGL.** Модель пространственной структуры CGL получали на основе кристаллической структуры лектина MytiLec (PDB: 3WMV). Анализ контактов CGL и лигандов, мутагенез *in silico*, молекулярный докинг и визуализацию результатов проводили с помощью модулей Ligand Interaction и Dock-программы MOE 2018.01 с использованием кристаллических структур комплексов CGL с лигандами Gal (5F8W), GalNAc (5F8Y), Gb3 (PDB: 5F90), а также эпитопного трисахарида HBGA гистогруппы А крови человека GalNAc α 1-3Gal [Fuc α 1-2] (2WMI), идентичному эпитопу муцина желудка свиньи (PSM) (Tian et al., 2008). Молекулярный докинг PSM-трисахарида с CGL проводили с использованием комплекса с GalNAc (5F8Y) в качестве матрицы. Энергия связи лиганда представляла собой несвязанную энергию взаимодействия между рецептором и лигандом и включала энергии Ван-дер-Ваальса, Кулона и обобщенную борновскую неявную энергию взаимодействия с растворителем (Labute, 2008).

Для выявления вклада консервативных участков НPY/KG углевод-связывающих сайтов каждой субъединицы тримера CGL (Site 1, Site 2 и Site 3), а также отдельных аминокислотных остатков (а.о.) активного центра в лектинную активность CGL, получали *in vitro* мутантные формы гибрида CmAP/CGL методом ПЦР с использованием матричной ДНК pET40CmAP/CGL с немутантным лектином CGL. Аланиновые замены а.о. His, Pro и Gly вводили в участки НPY/KG каждого сайта лектина в составе гибридного белка CmAP/CGL методом ПЦР с использованием специфических олигонуклеотидов (Табл. 1).

Табл. 1. Олигонуклеотиды для введения тройных и одиночных Ala замен в CmAP/CGL

Мутация	Прямой праймер (5'-3')	Обратный праймер (5'-3')
HPY/KG (Site 1)	AAGGCCAGTGGAAAGTTTCTTGCTGCATACGC TGGCAGTAGCAAC	AGCAGGGTTGCTACTGCCAGCGTATGCAGCAA GAAACTTTCCAC
HPY/KG (Site 2)	GTTGCAAGTGGAAAAATTGTCGCTGCCTACGC CGGACAAGCTAAT	TGGTGGATTAGCTTGTCCGGCGTAGGCAGCGA CAATTTTCCAC
HPY/KG (Site 3)	CACAAAGGAGGTAAATATATCGTCGTCAAGGC AGGATCCCCGAAT	CGGTGGATTCCGGGATCCTGCCTTGGCGGCCGA TGATTTACCTC
Asn27 (Site 2)	AGTAGCAACCCTGCTAACGCCACTAAGTTG	GCAGGACCAACTTAGTGGCGTTAGCAGGGT
His37 (Site 1)	GTCCTGCATAGCGATATCGCTGAAAGAATG	GGAAGTACATTCTTTCAGCGATATCGCTAT
Glu 75 (Site 3)	AGСТААТССАССАААТGCCАССААТATGGTTC	TGATGCAGAACCATATTGGTGGCATTTGGTG
His85 (Site 2)	GTTCTGCATCAAGATCGTGCTGATCGGGCA	GAATAGTGCCCGATCAGCACGATCTTGAT
Asn119 (Site 1)	ATCCCCGAATCCACCGAATGCTACCGAAACAG	GTATAACTGTTTCGGTAGCATTCCGGTGGAT

Asp127 (Site 3)	CAGTTATACATGGAGCTAAACATGCAGCCA	GAATTCCATGGCTGCATGTTTAGCTCCATGTA
His129 (Site 3)	ATACATGGAGATAAAGCTGCAGCCATGGAA	CAAAAATGAATTCCATGGCTGCAGCTTATCT

Определение лиганд-связывающих свойств рекомбинантных гибридных белков.

Лектинную активность гибридного лектина *СmAP/СGL* определяли методом ТЛФА по способности связываться со специфическим лигандом. Для процесса сенсibilизации лунок планшета (Nunc™ Maxisorp) использовали муцин PSM в концентрации 20 мкг/мл в буфере 1 (TBS - 0,01 М Трис-НСl, рН 9,0, 0,15 М NaCl). Раствор PSM наносили по 150 мкл в каждую лунку планшета и инкубировали в течение 12 ч при +4 °С. После проводили серийную отмывку планшета дистиллированной водой, затем буфером 2 (TBS Triton X 100 - 0,01 М Трис-НСl, рН 9,0, 0,15 М NaCl, 0,05% тритон X-100). Для предотвращения неспецифического связывания *СmAP/СGL* использовали раствор БСА (1 мг/мл, 300 мкл/лунка, 1 ч инкубации при 37 °С). Затем проводили еще одну серию отмывок, как описано выше. Далее в первый вертикальный ряд лунок планшета вносили по 300 мкл образца *СmAP/СGL* (0,2 мкг/мл в буфере 2). В остальные лунки вносили *СmAP/СGL* в серии двукратных разведений. В качестве контроля в последние лунки планшета вносили буфер 2. Планшет с образцами инкубировали при комнатной температуре в течение 90 мин., затем следовала серия отмывки планшета от несвязавшихся белков буфером 2. Далее в лунки вносили по 150 мкл буфера 1 М ДЭА (рН 10,3) и 15 мМ *n*-НФФ. Планшет инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 1 М NaOH. Концентрацию образовавшихся лектин-лигандных комплексов определяли по активности *СmAP* спектрофотометрически (A_{400}).

Антигенные свойства гибридного белка *СmAP/OmpF* определяли методом ИФА по эффективности взаимодействия со специфическими антителами к рекомбинантному *OmpF*-порину (Портнягина и др., 2009). Проведение ИФА осуществляли в двух вариантах, которые отличались сенситинами, наносимыми на микропланшет (Costar). Первый вариант: лунки микропланшета сенсibilизировали мышинной поликлональной специфической сывороткой к рекомбинантному *OmpF* порину или пуловой сывороткой крови больных псевдотуберкулезом в разведении 1/800. Сенсibilизированные планшеты выдерживали 12 ч при 4 °С, планшет отмывали от несвязавшихся антител и затем добавляли различные количества белка *СmAP/OmpF* (0,625-10 мкг/100 мкл в 25 мМ Трис-НСl, рН 8,5). Инкубацию проводили 12 ч при 4 °С и затем добавляли 2 мМ *n*-НФФ в буфере 0,1 М Трис-НСl, 0,2 М KCl, рН 10,0, для определения активности ЩФ. Второй вариант: лунки микропланшета сенсibilизировали гибридным белком *СmAP/OmpF* в количестве 5 мкг/100 мкл, выдерживали 12 ч при 4 °С, планшет отмывали от несвязавшегося антигена и добавляли мышинные поликлональные специфические антитела к рекомбинантному *OmpF*-порину или сыворотки крови больных псевдотуберкулезом в серии двойных разведений. Инкубацию проводили в течение ночи при 4 °С и затем добавляли буфер для определения активности ЩФ (2 мМ *n*-НФФ, 0,1 М Трис-НСl, 0,2 М KCl, рН 10,0). Результаты реакции учитывали на спектрофотометре μ Quant BioTek (США) при длине волны 405 нм.

Определение ЛПС-дефосфорилирующей активности ЩФ *СmAP*. В качестве субстратов использовали ЛПС *E. coli* 0:55 (S-ЛПС, мол. масса 22000 Да) и Ra-ЛПС *E. coli* EH100 (Sigma-Aldrich). ЛПС (0,2 мг/мл) растворяли в буфере (0,1 М Трис-НСl буфере, рН 7,7, 0,1 М KCl) тремя способами: инкубация при 24 °С в течение 12 ч (образец №1); инкубация при 37 °С в течение 12 ч (образец № 2); инкубация при 24 °С в течение 12 ч в том же буфере с добавлением триэтиламина (ТЭА) до рН 10,0 (образец № 3). Образцы № 4 и 5 готовили следующим образом: ЛПС *E. coli* 0:55 (1 мг/мл) растворяли в 1 М ДЭА (рН 10,3) при комнатной температуре в течение

1 ч (образец № 4); Ра-ЛПС *E. coli* 0,2 мг/мл растворяли в 1 М ДЭА буфере (рН 10,3) при 24 °С в течение 12 ч (образец № 5). Активность ЩФ *SmAP* определяли по количеству фосфора, оставшегося в ЛПС после гидролиза. Аликвоту фермента (0,0003 – 0,024 мг/мл) в 1 М ДЭА (рН 10,3) и образцы ЛПС смешивали в стеклянных виалах с крышками (общий объем 1 мл) и инкубировали при 37 °С при перемешивании в течение 30 мин, 2 ч, 6 ч и 12 ч. После окончания реакции образцы переносили в диализные трубки (3000 Да) и диализовали против дистиллированной воды в течение 2 сут в холодной комнате для удаления свободного фосфора.

Для определения фосфора в растворе ЛПС до и после обработки ЩФ *SmAP* использовали универсальный молибдатный реагент (Vaskovsky et.al, 1975). Аликвоту раствора ЛПС отбирали в пробирку и упаривали досуха в термошкафу при 100 °С. К сухому остатку добавляли 0,05 мл 72 % хлорной кислоты и сжигали в дюралевом блоке при 180-200 °С в течение 20 мин. После охлаждения в пробирки добавляли 0,45 мл рабочего реагента. Смесь в пробирке тщательно перемешивали с помощью вортекса и помещали в кипящую водяную баню на 15 мин. После образования фосфорномолибденовой сини пробирки охлаждали и измеряли оптическую плотность образцов в кварцевой кювете (1 см) при 815 нм на спектрофотометре Specol (Carl Zeiss). Для каждой пробы делали по 3 параллельных измерения. Контроль - буфер без ЛПС с той же концентрацией фермента *SmAP*, поглощение которой не превышало 0,04-0,05 единиц оптической плотности.

Определение цитотоксической активности ЩФ *SmAP*. Для определения цитотоксической активности ЩФ *SmAP* использовали стандартный MTS-метод (Barltrop et al, 1991). Количество образующегося формазана из MTS-реагента (5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4,5-диметилтиазолил)-3-(4-сульфофенил) тетразолий (382 нм) в формазан (492 нм), которое определяется спектрофотометрически, находится в прямой зависимости от количества живых клеток. Клетки высевали в 96-луночный планшет и инкубировали 12 ч в клеточной среде 100 мкл/лунку (6×10^3 клеток). Далее среду заменяли на свежую, содержащую различное количество единиц активности (2,3 ед, 1,15 ед, 0,15 ед, 0,023 ед, 0,0046 ед) рекомбинантной ЩФ *SmAP* (0,7 мг/мл, 0,25 М Трис-НСl (рН 8,5) у.а. 2300 ед/мг), после чего клетки инкубировали в течение 24 и/или 48 ч. В контрольные лунки добавляли 5 мкл буфера (0,25 М Трис-НСl, рН 8,5) без фермента. Затем 20 мкл раствора MTS-реагента добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 2 ч. Степень трансформации MTS-реагента в формазан измеряли спектрофотометрически при 492 нм и 690 нм (фон) на спектрофотометре μ Quant BioTek (США). После вычитания фонового поглощения для вычисления количества живых клеток, оставшихся в экспериментальных лунках, использовали выраженное в процентах отношение интенсивности поглощения в экспериментальных лунках к аналогичным показателям в контрольных лунках, где клетки не обрабатывали раствором рекомбинантной ЩФ *SmAP*. Цитотоксическую активность представляли как количество единиц активности ЩФ на 6×10^3 клеток, способную ингибировать 50% жизнеспособных клеток (half-maximal inhibition concentration, IC₅₀).

2. Результаты исследования и их обсуждение

2.1. Получение гибридных белков *SmAP/CGL* и *SmAP/OmpF* с активностью ЩФ морской бактерии *SmAP*. Полученные плазмиды pET40*SmAP/OmpF* и pET40*SmAP/CGL* характеризуются наличием рекомбинантной ДНК размером 2577 и 2028 пар оснований (п.о.), определяющей синтез гибридных белков *SmAP/OmpF* и *SmAP/CGL* соответственно (Рис. 1), у которых последовательности ЩФ *SmAP* и лиганд-связывающих белков соединены гибким линкером (G₄S)₃, не препятствующим независимому фолдингу и проявлению активности

(Balabanova et al., 2014). В результате гетерологической экспрессии данных конструкций в клетках *E. coli* Rosetta (DE3) получены растворимые недеградируемые гибридные белки *CmAP/CGL* и *CmAP/OmpF*, обладающие активностью ЩФ. По данным ДСН-ПААГ-электрофореза *CmAP/OmpF* и *CmAP/CGL*, содержащие плазмидный шаперон DsbC (32,5 кДа), имели молекулярную массу 127,5 и 104,5 кДа соответственно (Рис. 1, 2).

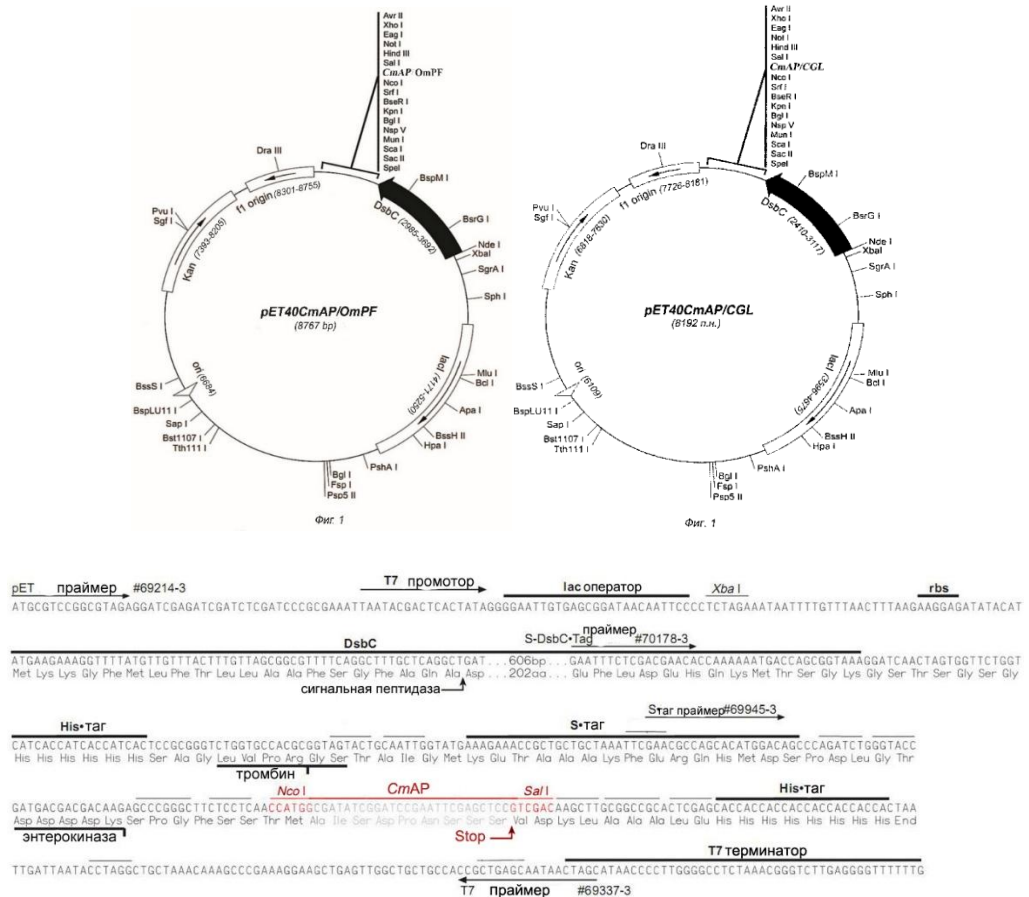


Рис. 1. Схема рекомбинантных плазмид pET40CmAP/OmpF (вверху слева) и CmAP/CGL (вверху справа). Полилинкер плазмиды pET40CmAP (внизу) с встроенным геном ЩФ CmAP по сайтам рестрикции NcoI и SalI (выделено красным), использовали для лигирования генов лиганд-связывающих белков по сайтам SalI и SacI для получения конструкций pET40CmAP/OmpF и pET40CmAP/CGL (С). Специфические праймеры на плазмиду pET40 (#69945-3 и #69337-3) использовали для скрининга рекомбинантных колоний (указаны черными стрелочками); область кодирования шаперона DsbC и сайта энтеропептидазы (Asp4Lys) находится выше полилинкера (подчеркнуто жирной черной линией); гис-таг (His-tag) закодирован выше сайта энтерокиназы для использования в аффинной хроматографии с металлосвязывающим сорбентом; стоп-кодон (Stop) для рекомбинантного белка вводили через обратный геноспецифичный праймер; Rbs – участок связывания с рибосомой.

2.2. Оптимизация схемы очистки рекомбинантного белка CmAP и гибридов CmAP/CGL и CmAP/OmpF. Ранее многостадийной очисткой рекомбинантного белка CmAP получали гомогенные препараты с выходом 1 мг белка из 1 л культуры клеток *E. coli* с удельной активностью (у.а.) ЩФ до 12700 ед/мг (1 М ДЭА, pH 10,3), что соответствует активности ≈ 3500 ед/мг в 0,25 М Трис-HCl буфере, pH 9,5-10,0) (Nasu et al., 2012; Golotin et al., 2015). В результате оптимизации схемы очистки CmAP с использованием глицерина удалось получить 18 мг

препарата гомогенного белка из 1 л культуры с у.а. 7116 ед/мг в буфере 0,20 М TrisHCl, pH 9,5 (20000 ДЭА ед/мг) (Рис. 2). У гибридных белков у.а. ЩФ составляла 1000-1500 ед/мг, в зависимости от степени очистки, однако их растворимость увеличивалась в присутствии плазмидного шаперона DsbC (Рис. 2).

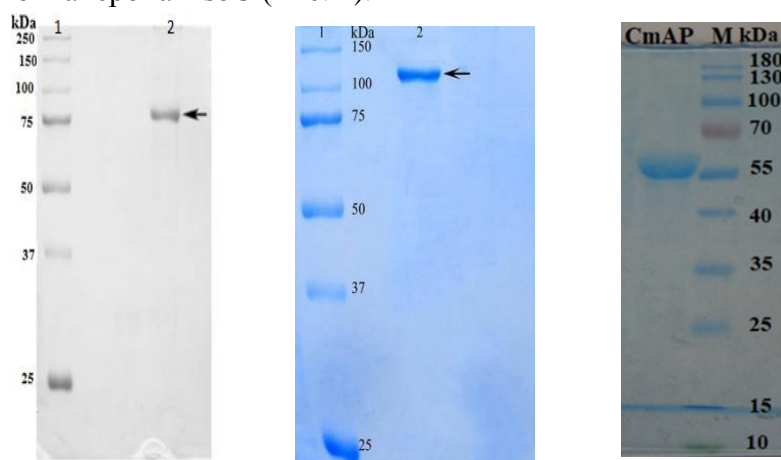


Рис. 2. Электрофореграммы препаратов рекомбинантных белков: *StmAP/CGL* после удаления шаперона DsbC (слева); *StmAP/OmpF* до удаления шаперона DsbC (посередине); *StmAP* после удаления шаперона DsbC (справа) - 55 кДа. Дорожка 1 или М – маркер молекулярной массы белков.

2.3. Определение дефосфорилирующей активности рекомбинантной *StmAP* в отношении ЛПС *E. coli*. При приготовлении образцов S-хемотипа ЛПС в качестве субстрата для ЩФ *StmAP* было показано, что при уменьшении его концентрации с 1 до 0,2 мг/мл и повышении температуры инкубации до 37 °С в 0,1 М Tris-HCl буфере (pH 7,7) в течение 12 ч (образец № 2) количество определяемого фосфора увеличивалось в 6 раз, однако дополнительное добавление в буфер ТЭА до pH 10,0 (образец № 3) было оптимальным при тех же условиях растворения (Рис. 3).

После инкубирования образца S-ЛПС №3 с ферментом *StmAP* (0,0003 - 0,024 мг/мл) при 37 °С в течение 30 мин количество гидролизованного фосфора составило 89% (Рис. 4). Для Ra-хемотипа ЛПС при оптимальных условиях растворения (0,2 мг/мл в 1 М ДЭА-буфере, (pH 10,3), 37 °С, 12 ч) максимальная активность фермента составляла 70% даже после увеличения времени инкубации до 12 ч.

Таким образом, ЩФ *StmAP* способна практически полностью дефосфорилировать ЛПС, если он имеет полную структуру (S-форма) и предварительно растворен в буфере со значением pH не менее 10,0. Вероятно, меньшая эффективность ЩФ *StmAP* в отношении гидролиза остатков фосфора Ra-хемотипа ЛПС (без O-специфических цепей) объясняется его большей гидрофобностью и склонностью к агрегации в аналогичных условиях инкубации. Полученные данные о дефосфорилирующей активности *StmAP* в отношении ЛПС являются перспективной основой для разработки нового терапевтического подхода для нейтрализации эффектов бактериальных эндотоксинов (болезнь Крона, сепсис, эндотоксический шок) с помощью высокоактивной ЩФ морской бактерии.

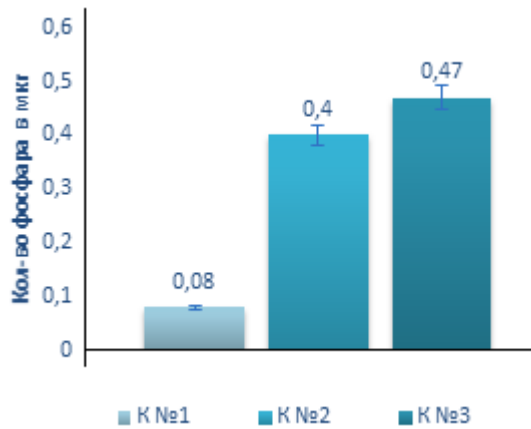


Рис. 3. Зависимость количества фосфора в контрольных образцах S-ЛПС (№1-3) от условий их растворения: К №1 – в 0,1 М Трис-НСl буфере, pH 7,7, при 24 °С в течение 12 ч; К №2 – в 0,1 М Трис-НСl буфере, pH 7,7, при 37 °С в течение 12 ч; К №3 – в 0,1 М Трис-НСl буфере, pH 7,7, с добавлением ТЭА до pH 10,0 при 24 °С в течение 12 ч.

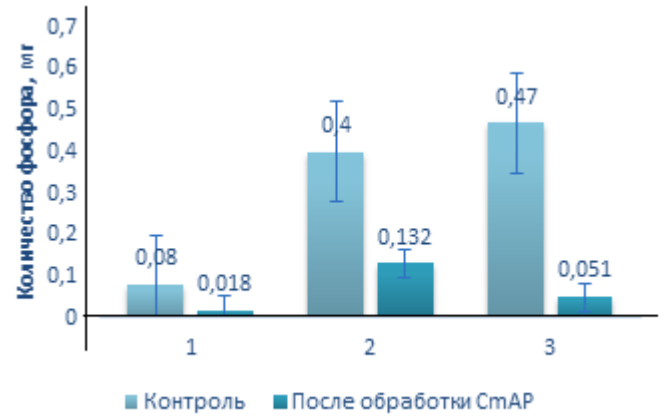


Рис. 4. Количество фосфора (в мкг) в образцах S-ЛПС (№ 1-3) до (столбцы слева) и после (столбцы справа) обработки рекомбинантной ЩФ *StAR* (0,3 мг/мл, 2300 ед/мг) при проведении ферментативной реакции в течение 30 минут при 37 °С и различной пробоподготовке ЛПС: 1 - образец № 1; 2 - образец № 2; 3 - образец № 3.

2.4. Ингибирующая активность рекомбинантной *StAR* в отношении раковых клеток. Гомогенный препарат высокоактивной ЩФ *StAR* (у.а. 2300 ед/мг) апробирован в предварительном исследовании влияния экзогенной активности ЩФ на деление клеток карциномы (Т-47D), аденокарциномы молочной железы (MDA-MB-231) и колоректальной аденокарциномы (HT-29). ЩФ *StAR* подавляла рост клеточной линии MDA-MB-231 после 48 ч инкубации со значением эффективной концентрации полумаксимального ингибирования IC_{50} 2,3 ед/ 6×10^3 КОЕ (в 100 мкл) (Рис. 5 Б), что соответствует 0,3 мкг фермента с максимальной активностью 7000 ед/мг (IC_{50} *StAR* = 3 мкг/мл).

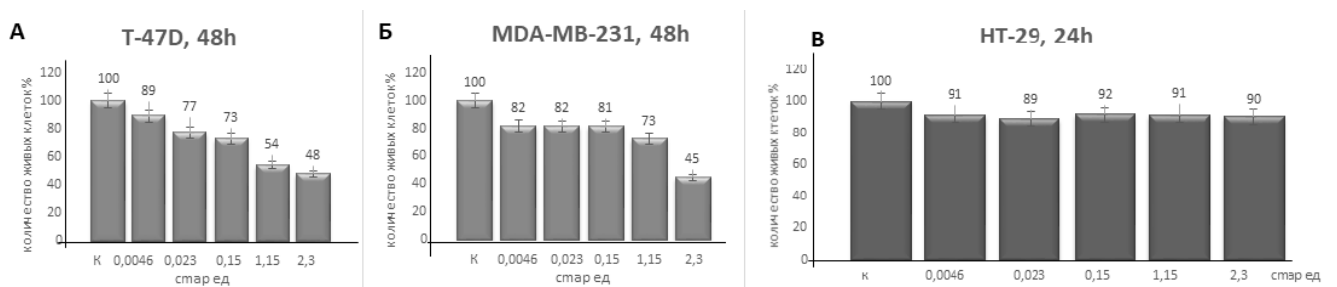


Рис. 5. Влияние различных концентраций препарата ЩФ *StAR* на пролиферацию раковых клеток в течение различного времени: А) карцинома молочной железы Т-47D (48 ч); Б) аденокарцинома молочной железы MDA-MB-231 (48 ч); В) колоректальная аденокарцинома HT-29 (24 ч). По оси ОХ – количество живых клеток в лунке (%), по оси У – количество ед. активности *StAR* (в 5 мкл Трис-НСl, pH 9,0) в лунке. К – в контрольную лунку добавляли 5 мкл буфера Трис-НСl, pH 9,0.

В целом, подобный максимальный ингибирующий эффект наблюдался при инкубировании обеих линий раковых клеток молочной железы Т-47D и MDA-MB-231 со ЩФ *StAR* в течение 48 ч (Рис. 5 А, Б). Очевидно, фермент запускает какие-то молекулярно-

генетические механизмы регуляции клеточного деления с участием ЩФ - ключевого фермента метаболизма нуклеиновых кислот, как у эукариот, так и у бактерий (Balabanova et al., 2017).

2.5. Определение антигенной активности порина в составе гибрида *СтАР/ОmpF*.

Специфичность взаимодействия порина в составе белка *СтАР/ОmpF* сравнима с таковой для очищенного рекомбинантного порина *ОmpF*, что подтверждено результатами ИФА с использованием вторичных антител к иммуноглобулинам мыши, меченных пероксидазой (Рис. 6). Гибридный белок *СтАР/ОmpF* проявлял одновременно фосфатазную и антигенную активности при связывании с иммобилизованными на планшете мышинными антителами к *ОmpF* и антителами в пуловой сыворотке крови больных псевдотуберкулезом (первый вариант ИФА). Рост активности ЩФ находился в линейной зависимости от увеличения концентрации в инкубационной среде бифункционального белка *СтАР/ОmpF*, специфически взаимодействующего с антителами к рекомбинантному порину и антителами к порину, присутствующими в пуловой сыворотке крови больных псевдотуберкулезом (Рис. 6). Эти результаты свидетельствуют о том, что гибридный белок *СтАР/ОmpF* способен образовывать комплексы с антителами, наличие которых может выявляться путем взаимодействия с субстратом к ЩФ, и может быть использован в качестве диагностического антигена.

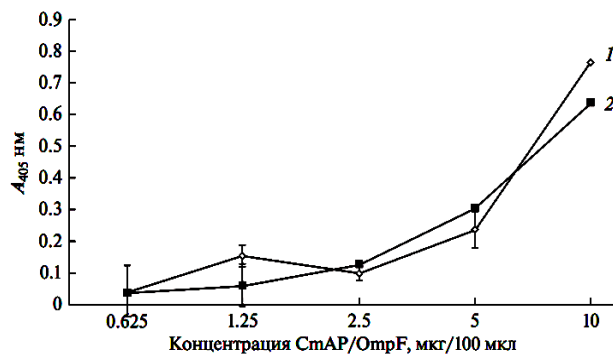


Рис. 6. Антигенная активность рекомбинантного гибридного белка *СтАР/ОmpF* по первому варианту ИФА – иммобилизация антител на планшете (разведение 1/800): (1) взаимодействие *СтАР/ОmpF* с мышинными антителами к рекомбинантному порину *ОmpF*; (2) взаимодействие *СтАР/ОmpF* с антителами к порину в пуловой сыворотке больных псевдотуберкулезом. Связывание антител с *СтАР/ОmpF* (двукратные разведения) оценивали по относительной активности ЩФ *СтАР* (A_{405}).

Однако проведение массовых анализов сывороток на планшете сопряжено с рядом методических и технических трудностей. В связи с этим был апробирован второй вариант проведения ИФА, когда на планшет сначала наносили диагностический антиген - гибридный белок *СтАР/ОmpF*, а затем добавляли исследуемые образцы сывороток (Рис. 7). В присутствии антител к рекомбинантному *ОmpF* и сывороток пациентов наблюдалось увеличение в 7,8 и 3,8 раза соответственно активности ЩФ (Рис.7 Б). Согласно литературным данным (Brennan et al., 1994; 1995), такое явление, как положительная (до 300%), так и отрицательная (до 40-50%) модуляция активности ЩФ *E. coli* в составе гибрида с фрагментом вируса иммунодефицита человека наблюдалась при его связывании с антителами к данному вирусу из-за неспецифических взаимодействий эпитопов гибрида ЩФ с антителами (Brennan et al., 1994; 1995). В нашем случае активация ЩФ *СтАР/ОmpF* наблюдалась только в присутствии специфических антител к порину *Y. pseudotuberculosis*, в то время как в присутствии

иммуноглобулинов неиммунной сыворотки такая активация была незначительной (Рис. 7 Б). Таким образом, использование гибридного бифункционального полипептида *StAR/OmpF* с активностью ЩФ позволяет сократить время анализа по сравнению с таковым при стандартной процедуре проведения непрямого метода ИФА с использованием изолированного порина. В последнем случае помимо диагностического антигена и исследуемых сывороток требуется использование вторых антител, меченных ферментом (Портнягина и др., 2000, 2009; Хоменко и др., 2008). Разработанный подход может служить основой для усовершенствования диагностики острых и вторично-очаговых форм псевдотуберкулеза.

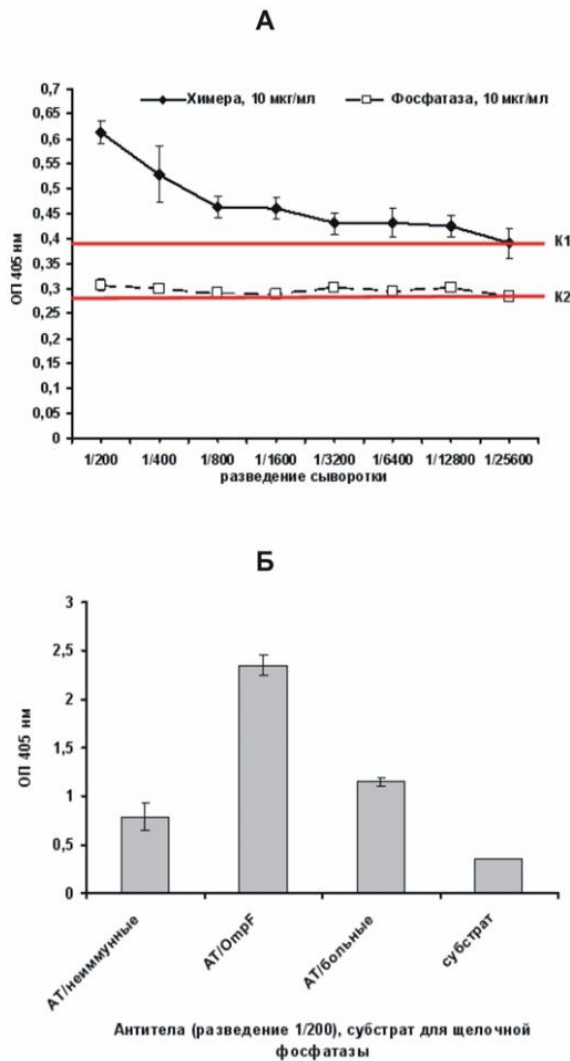


Рис. 7. Антигенная активность гибридного белка *StAR/OmpF* (Химера) по второму варианту ИФА – иммобилизация на планшет диагностического антигена *StAR/OmpF*: А - взаимодействие гибридного белка *StAR/OmpF* с мышинной антисывороткой к рекомбинантному *OmpF*. По оси ОУ – активность ЩФ *StAR/OmpF*; по оси ОХ – двукратные разведения антисыворотки. Горизонтальные линии – контроли взаимодействия гибрида *StAR/OmpF* (K1) и рекомбинантной фосфатазы *StAR* (K2, Фосфатаза) с субстратом в отсутствии антител; Б - взаимодействие гибридного белка *StAR/OmpF* с: сывороткой крови неиммунных мышей (АТ/неиммунные); мышинной антисывороткой к рекомбинантному порину *OmpF* (АТ/*OmpF*); пуловой сывороткой больных псевдотуберкулезом (АТ/больные), все сыворотки использованы в разведении 1:200. Контроль (субстрат) – взаимодействие *StAR/OmpF* с субстратом ЩФ (*n*-НФФ) в отсутствии антител.

2.6. Определение функциональной активности лектина в составе гибрида *StAR/CGL*. На первом этапе для определения наличия лектинной активности гибридного белка *StAR/CGL* проводили реакцию прямой гемагглютинации образцов клеточных лизатов клеток *E. coli* Rosetta (DE3)/pET40*StAR/CGL* в 96-ти луночном планшете (Рис. 8). Выбранные клоны с гемагглютинирующей и фосфатазной активностью использовали на втором этапе определения функциональной активности лектина в составе гибридного белка *StAR/CGL* методом ТЛФА как в лизатах рекомбинантных клеток *E. coli*, так и очищенного препарата *StAR/CGL*. В качестве лиганда использовали муцин PSM. Очевидно, существует линейная зависимость между активностью ЩФ и концентрацией *StAR/CGL* и лиганда (Рис. 9). *StAR/CGL* (менее 2 мг/мл) проявляет ферментативную и лиганд-связывающую активность в отношении PSM в

концентрации от 1,5 до 100 мкг/мл, что перспективно для разработки методов диагностики патологий, в которых используются муциноподобные маркеры (Чикаловец и др., 2010; 2015).

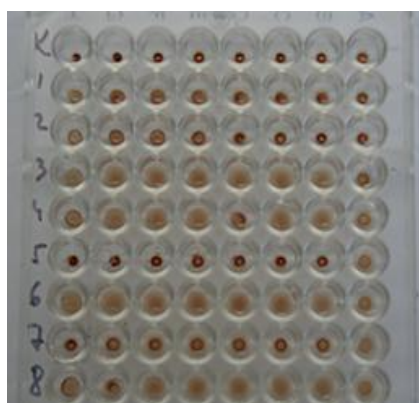


Рис. 8. Результаты прямой геммагглютинации: К – 2-% суспензия эритроцитов крови А (II); лунки 1-8 – 2-% суспензия эритроцитов крови А (II) после добавления лизата клеток *E. coli* Rosetta (DE3)/pET40CmAP/CGL.

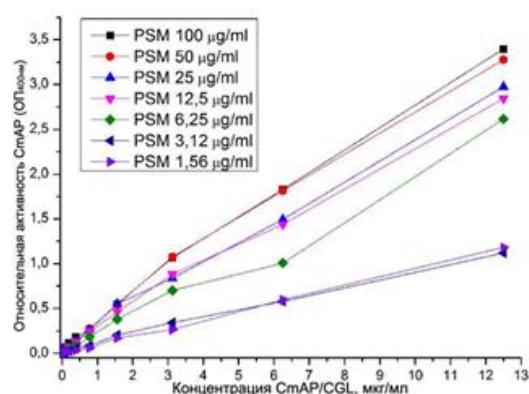


Рис. 9. Зависимость активности ЦФ очищенного рекомбинантного белка CmAP/CGL от концентрации лиганда PSM. По оси ОХ – концентрация CmAP/CGL (мкг/мл); по оси ОУ – активность ЦФ гибрида CmAP/CGL (A₄₀₀).

2.7. Определение лиганд-связывающей специфичности гибридного белка CmAP/CGL в отношении муциноподобных онкомаркеров. При использовании концентраций рекомбинантного белка CmAP/CGL от 0,0044 до 0,044 мг/мл и при больших разведениях онкомаркеров (от 1:125 до 1: 625000) с помощью ТФЛА можно достоверно идентифицировать РЭА и СА 19-9 (Табл. 2). На сегодняшний день известно, что олигосахарид СА 19-9 является маркером рака поджелудочной железы при значениях, превышающих 40 ед/мл в клиническом анализе, поэтому он имеет большую диагностическую ценность при комбинации его мониторинга с РЭА для обнаружения рака поджелудочной железы и колоректальной карциномы (Fong et al., 2012; Vukobrat-Bijedic et al., 2013).

Табл. 2. Показатели фосфатазной активности у связавшихся комплексов гибридного лектина CmAP/CGL с муциноподобными онкомаркерами

Концентрация гибрида CmAP/CGL	Время инкубации и титр маркера	ПСА	РЭА	АФП	СА 19-9	СА 125	СА 72-4	БСА	Пустой
0,44 мг/мл	Сток (30 мин)	0,039	0,594	0,264	0,789	0,595	0,567	0	0
0,44 мг/мл	1:125 (30 мин)	0,043	0,687	0,034	0,323	0	0,038	0	0
0,0044 мг/мл	1: 1000 1: 5000 1: 25000 1: 125000 1: 625000 (ночь)	-*	0,472 0,481 0,450 0,573 0,458	-	0,344 0,313 0,343 0,336 0,235	-	-	0,240	0
0,0044 мг/мл	1: 1000 1: 5000 1: 25000 1: 125000	-	0,121 0,150 0,175 0,122	-	0,159 0,117 0,122 0,133			0,072	0

	1: 625000 (1 ч)		0,146		0,125			
--	--------------------	--	-------	--	-------	--	--	--

* - онкомаркер в данном титре не использовали в ТФЛА из-за низких предыдущих значений активности ЩФ

Однако обработка параметров проведения ТФЛА, таких как концентрация используемых белков, титр исследуемых образцов и время инкубации их с гибридным бифункциональным белком *SmAP/CGL*, а также выбор белка (вместо БСА) для «выключения» неспецифических центров связывания лектина при пробоподготовке имеет большое значение для получения достоверных результатов при определении онкомаркеров РЭА и СА-19-9 (Табл. 2). Поэтому разработка новых методов ранней дифференциальной диагностики рака с применением гибридного бифункционального лектина *SmAP/CGL* является непростой, но весьма актуальной задачей.

2.8. Сайт-направленный мутагенез галактозосвязывающих сайтов лектина в гибридном белке *SmAP/CGL*. Результаты молекулярного докинга тримерного CGL с GalNAc (5F8Y) позволили определить варианты аланиновых замен, разрушающих углевод-связывающие сайты Site 1, Site 2 и Site 3 каждого мономера, образующие общий активный центр лектина (Рис. 10 А).

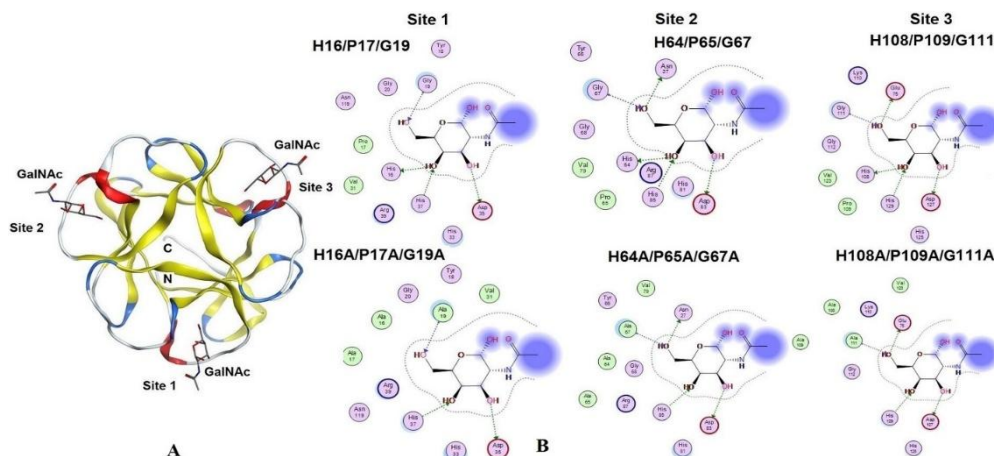


Рис. 10. А – 3D-модель комплекса Gal/GalNAc-специфичного лектина CGL и лиганда GalNAc. Структура белка показана в виде ленточной диаграммы, структура лиганда GalNAc показана палочками. В – 2D-диаграмма углевод-связывающих сайтов (Site 1, 2, 3) лектина CGL с GalNAc (вверху) и его тройных мутантных аналогов по каждому сайту связывания (внизу) - H16A/P17A/G19A (Site 1), H64A/P65A/G67A (Site 2) и H108A/P109A/G111A (Site 3).

Для экспериментального подтверждения локализации и функции сайтов в 3D структуре в кодирующую последовательность CGL одновременно вводили замены нескольких кодонов с использованием двух геноспецифичных праймеров, приводящих к замене трех а.о.: H12A/P17A/G19A (Site1), H64A/P65A/G67A (Site 2) и H108A/P109A/G111A (Site 3) (Рис. 10). Белки с тройными мутациями не проявляли гемагглютинирующей активности. По данным ТЛФА с использованием муцина в качестве лиганда мутации, разрушающие сайты связывания Site 1 и Site 2 (Рис. 10 В), уменьшают углевод-связывающую активность *SmAP/CGL* в 18 и 32 раза соответственно, а мутация, разрушающая третий сайт Site 3, - в 6 раз, что свидетельствует о существенном вкладе всех трех сайтов в связывание с лигандом PSM (Рис. 11).

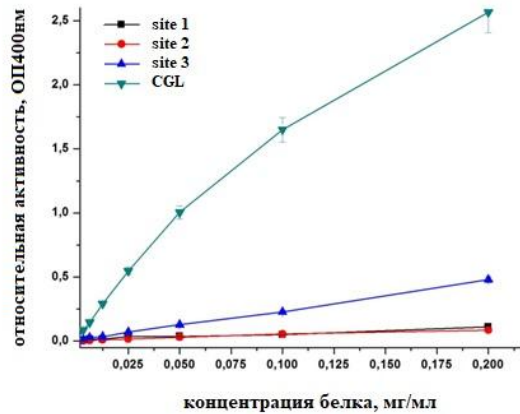


Рис. 11. Зависимость образования лектин-лигандных комплексов с муцином PSM от концентрации гибридного лектина *CmAP/CGL* и его мутантных аналогов Н12А/Р17А/Г19А (Site 1), Н64А/Р65А/Г67А (Site 2) и Н108А/Р109А/Г111А (Site 3) (OX, мкг/мл). OY – относительная активность гибрида *CmAP/CGL*, измеренная по активности щелочной фосфатазы *CmAP* (ОП₄₀₀, нм).

Таким образом, методом сайт-направленного мутагенеза подтверждена структура активного центра тримерного галактозосвязывающего лектина CGL, включающего три идентичных сайта связывания НPY/KGG, локализованных в трех гомологичных мономерах (гомотример), но имеющих разный уровень углевод-связывающей активности.

2.9. Точечный мутагенез галактозосвязывающих сайтов лектина в гибридном белке *CmAP/CGL*. Для дальнейшего изучения зависимости углевод-связывающей функции активного центра CGL от его структуры, определяющей специфичность к Gal и GalNAc, провели аланиновый *in silico* мутагенез а.о., предсказанных для связывания лигандов: His37 и Asn119 (Site 1), His85 и Asn27 (Site 2); Asp127, His129 и Glu75 (Site 3) (Рис. 12).

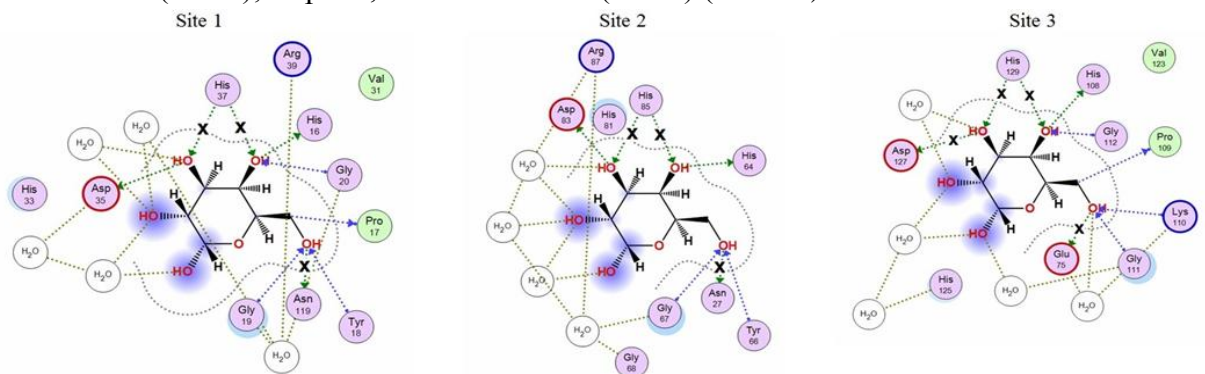


Рис. 12. 2D-диаграммы углевод-связывающих сайтов (Site 1, 2, 3) лектина CGL с моносахаридом Gal. В комплексах галактозы с мутантными белками CGL показан разрыв Н-Н-связи в местах замены а.о. на остаток Ala (обозначено крестиком (x)).

Муцин-связывающая активность полученных мутантных белков CGL составляла 9% -73% от активности природного лектина CGL (Рис. 13). В мутантных CGL с одиночными заменами His37Ala, His129Ala, Glu75Ala, Asp127Ala и His85Ala, Asn27Ala, Asn119Ala лектинная активность в отношении муцина была ниже, чем у природного CGL в 1,4; 2,3; 3,2; 4,5; 5,0; 5,9 и 11,1 раза соответственно (Рис. 13).

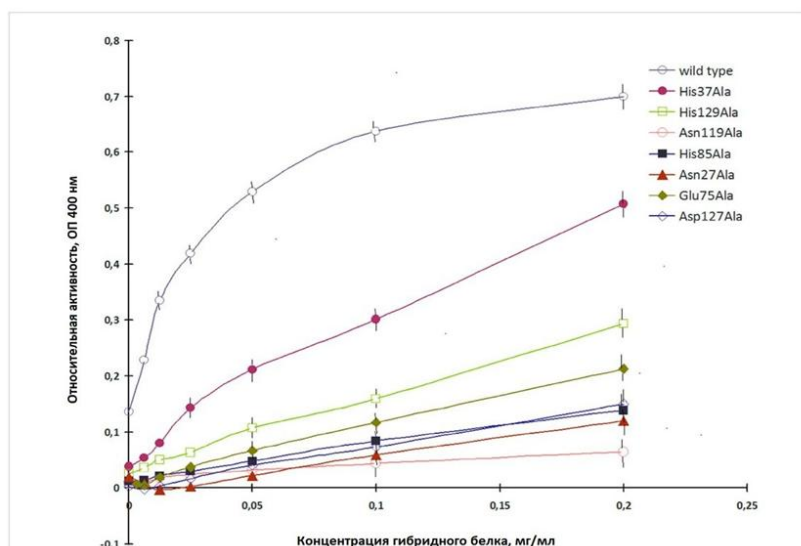


Рис. 13. Муцин-связывающая активность природного и мутантного типов лектина у гибридного белка CGL/CmAP. Комплексы “лектин-муцин” (X) определяли путем измерения относительной фосфатазной активности гибрида CGL/CmAP (Y).

Однако муцин-связывающая активность полученных мутантных белков не коррелировала с изменениями расчётной энергии их связывания с моносахаридом Gal (Табл. 3).

Табл. 3. Муцин-связывающая активность мутантных лектинов CGL и расчетная энергия их связывания с галактозой и глоботриозой

Мутация	Связывание Gal ΔE^a	Связывание G3 ΔE^b	Относительная муцин-связывающая активность ^c , %
Asn119Ala*	1,9 kcal/mol	4,9 kcal/mol	9
Asn27Ala**	2,0 kcal/mol	5,2 kcal/mol	17
Asp127Ala***	4,0 kcal/mol	4,3 kcal/mol	22
His85Ala**	3,6 kcal/mol	3,4 kcal/mol	20
Glu75Ala***	3,4 kcal/mol	4,7 kcal/mol	31
His129Ala***	3,5 kcal/mol	3,6 kcal/mol	43
His37Ala*	3,5 kcal/mol	3,1 kcal/mol	73

a/b – разница между расчётной энергией связывания мутантных CGL с галактозой (ΔE^a) и глоботриозой (ΔE^b) и энергией связывания природного типа CGL с этими лигандами; c – муцин-связывающая активность мутантных белков измерялась относительно активности природного типа CGL (100%); * – первый углеводсвязывающий сайт лектина CGL (Site 1), ** – второй углеводсвязывающий сайт лектина CGL (Site 2), *** – третий углеводсвязывающий сайт лектина CGL (Site 3).

Было предположено, что степень сродства CGL к лигандам может зависеть от степени их олигомеризации (Табл. 3). В связи с этим провели *in silico* анализ контактов мутантных CGL с олигомерным лигандом - трисахаридом Gal α -4Gal β -4Glc (Gb3, PDB:5F90), к которому по природный лектин CGL имеет наибольшую аффинность (Чикаловец и др., 2015; Chernikov et al., 2017). Для понимания механизма связывания CGL с лигандами муцинового типа крайне важно оценить индивидуальный вклад а.о. активного центра CGL в лектинную активность. Результаты молекулярного докинга показали, что замещение His37, His129, Glu75, Asp127, His85, Asn27 и Asn119 на остаток Ala изменяет количество контактов CGL с трисахаридом Gb3 (Рис. 14) и расчётную энергию связывания с ним (Табл. 3).

Остатки Asn27 из второго сайта (Рис. 14. Gb3 in Site 2) и Asn119 из первого сайта (Рис. 14. Gb3 in Site 1) образуют по одной Н-Н-связи с концевым остатком Gal, как и в случае докинга с моносахаридом, и две дополнительные Н-Н-связи появляются со вторым остатком Gal при докинге с трисахаридом Gb3 (Рис. 14: Gb3 in Site 1; Gb3 in Site 2). Поэтому мутантные лектины $CGL_{Asn27Ala}$ и $CGL_{Asn119Ala}$ теряют не по одной, а по три Н-Н-связи в первом и втором сайтах при связывании с трисахаридом Gb3 (Рис. 14: Gb3 in Site 1; Gb3 in Site 2). Это может объяснить резкое снижение их сродства к муцину в эксперименте *in vitro*, который также имеет два остатка Gal на концах своих олигосахаридных цепей (Рис. 13, Табл. 3).

Остаток Glu75 расположен в третьем сайте связывания CGL (Site 3) и имеет такую же топологию, что и остатки Asn27 и Asn119 в других сайтах связывания, Site 2 и 1 соответственно. Однако в отличие от них он образует только одну Н-Н-связь с ОН-группой атома С6 концевом остатка Gal (Рис. 14: Gb3 in Site 3), поэтому значения расчетной энергии связывания в комплексах $CGL_{Glu75Ala}$ -Gb3 и $CGL_{Glu75Ala}$ -Gal отличаются незначительно (Табл. 3). Вероятно, по этой же причине мутантный белок $CGL_{Glu75Ala}$ сохранил более высокий уровень активности (31%) природного лектина CGL в отношении муцина по сравнению с его мутантными аналогами $CGL_{Asn27Ala}$ и $CGL_{Asn119Ala}$ (Рис. 13).

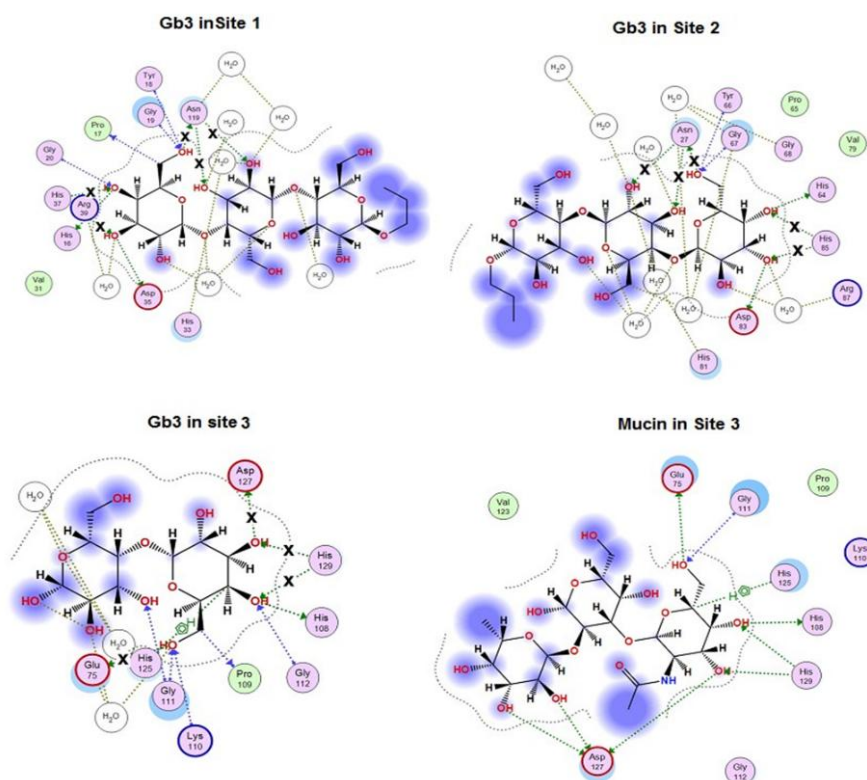


Рис. 14. 2D-диаграмма контактов между лектином CGL и лигандами: глоботриозой (Gb3 in Site 1, 2, 3) и муцином (Mucin in Site 3). Показано появление новых Н-Н-связей в комплексах CGL (зеленые прерывистые стрелочки): с двумя остатками галактозы трисахарида Gb3 и муцина в сайтах связывания Site 1, 2, 3 (сверху и внизу слева, контакты для Gb3 и муцина идентичны) и третьим остатком фукозы олигосахарида муцина в сайте связывания Site 3 (внизу справа). Контакты между лектином CGL и третьим остатком Gb3 (Glc, глюкозой) не образуются. Разрыв Н-Н-связей в местах введения замены а.о. на остаток Ala в комплексах мутантных CGL с лигандами Gb3 и муцином обозначены крестиком (x).

Однако оказалось невозможным объяснить несоответствие данных *in vitro* и анализа *in silico* расчетной энергии связывания остальных мутантных лектинов CGL в области контактов Gal и Gb3, похожим двумя концевыми остатками Gal на эпитоп муцина (Табл. 3). Так, идентичные по топологии остатки His37 (Site 1), His85 (Site 2) и His129 (Site 3) образуют две Н-Н-связи только с одним концевым галактозным остатком Gb3, и величины расчетной энергии связывания природного CGL и лектина с мутациями His37Ala, His85Ala и His129Ala как с моносахаридом Gal, так и с трисахаридом Gb3 близки (Табл. 3, Рис. 13). Несмотря на это, значения муцин-связывающей активности у CGL_{His37Ala}, CGL_{His85Ala} и CGL_{His129Ala} отличаются между собой и от значений активности природного лектина CGL (Табл. 3, Рис. 13). Если в результате разрыва этих двух Н-Н-связей у лектина CGL_{His37Ala} активность сохранялась до 70%, то у CGL_{His85Ala} и CGL_{His129Ala} она снижалась до 20 и 43% соответственно (Табл. 3). Вероятно, неравнозначное изменение активности этих мутантных белков происходит в результате какой-то тонкой структурной перестройки микроокружения каждого сайта связывания после замены этих ключевых остатков His на аланин, которую невозможно обнаружить методом *in silico* анализа.

Кроме того, муцин-связывающая активность лектина CGL с мутацией Asp127Ala в третьем сайте связывания Site 3 составила всего 22%, несмотря на то, что модели его комплексов с Gal и Gb3 предсказывают разрыв только одной Н-Н-связи (Табл. 3, Рис. 13, 14), что хорошо согласуется с имеющимися кристаллографическими данными этих комплексов (PDB: 5F8W, 5F8Y и 5F90). Для объяснения резкого изменения муцин-связывающей активности CGL_{Asp127Ala} была построена еще одна теоретическая модель комплекса CGL с концевым трисахаридом крови группы А (II) со структурой GalNAc α 1-3Gal[Fuc α 1-2] (PDB: 2WMI), которая, как оказалось, идентична концевому трисахариду муцина (Tian et al., 2008), поскольку данные по кристаллической структуре самого муцина отсутствуют (Рис. 14, 15).

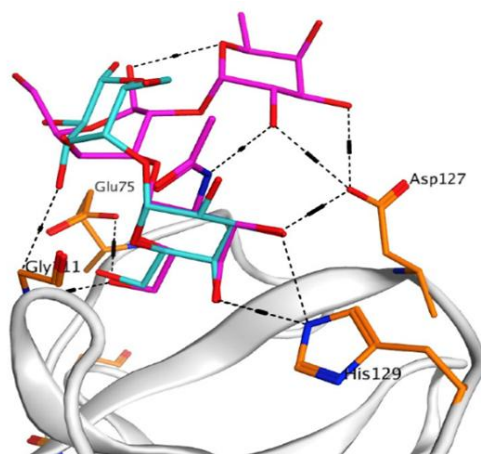


Рис. 15. 3D-суперпозиция трисахарида Gb3 (голубой) и углеводного эпитопа гликопротеина PSM (розовый) в углевод-связывающем сайте Site 3 лектина CGL. Показано, что аминокислотный остаток Asp127 образует одну Н-Н-связь (черная прерывистая линия) с концевым остатком галактозы трисахарида Gb3 и гликопротеина PSM и две Н-Н-связи с третьим остатком фукозы гликопротеина PSM, который отсутствует в Gb3 (заменен на Glc).

Данные молекулярного докинга с этим эпитопом показали, что в третьем сайте CGL (Site 3) появляются дополнительные отличия у Gb3 и муцина (Рис. 14, 15). Как видно из данных рисунков 14 и 15, в комплексе CGL с муцином кроме Н-Н-связи между а.о. третьего сайта Asp127 и концевым галактозным остатком образуются еще две Н-Н-связи с третьим остатком фукозы (Fuc) (Рис. 14: Mucin in Site 3), тогда как в третьем положении трисахарида Gb3 находится

глюкоза, к которому CGL не имеет сродства. Поэтому мутантный CGL_{Asp127Ala} потерял не одну, а три дополнительные Н-Н-связи с трисахаридом муцина, что может объяснить резкое снижение муцин-связывающей активности *in vitro* (Табл. 3, Рис. 13, 14). Таким образом, а.о. Asp127 третьего сайта связывания лектина CGL по-разному участвует в связывании различных по составу и степени олигомеризации лигандов, что, возможно, и модулирует силу и специфичность данного взаимодействия.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что а.о. His37 и Asn119 (Site 1), His85 и Asn27 (Site 2), Asp127, His129 и Glu75 (Site 3) являются эссенциальными для углевод-связывающей функции активного центра лектина CGL. Вклад этих а.о в муцин-связывающую активность CGL не одинаков. Аланиновая замена одного из них не приводит к полной потере активности CGL, что указывает на сохранение остаточной лектинной функции за счет двух других немутированных сайтов связывания. Кроме того, остаток Asp127 в сайте Site 3 и аналогичные остатки Asp35 и Asp83 в сайтах Site 1 и Site 2 соответственно играют решающую роль в проявлении более высокой степени аффинности лектина CGL к муцину, чем к глоботриозе, за счет возможности образовывать Н-Н-связей с третьим остатком фукозы, отсутствующим у Gb3 (Рис. 14, 15). Таким образом, повышенная эффективность связывания лектина CGL с эпитопом муцина по сравнению с другими лигандами обусловлена составом и последовательностью его концевых моносахаридных звеньев. Понимание молекулярных механизмов функционирования лектина CGL позволит разработать синтетический аналог CGL с повышенной углевод-связывающей активностью в отношении некоторых онкомаркеров.

Выводы:

1. Получены генетические конструкции на основе плазмиды pET40-b(+), содержащие гибридные гены лектина морской мидии *C. grayanus* (pET40CmAP/CGL) и порина патогенной бактерии *Y. pseudotuberculosis* (pET40CmAP/OmpF), соединенные со щелочной фосфатазой CmAP морской бактерии *C. amphilecti* КММ 296 через гибкий линкер (Gly₄Ser)₃, для клонирования и гетерологической экспрессии в клетках *E. coli*.

2. Получены штаммы-продуценты *E. coli* Rosetta(DE3)/pET40CmAP/CGL и *E. coli* Rosetta(DE3)/pET40CmAP/OmpF для синтеза растворимых гибридных бифункциональных белков CmAP/CGL и CmAP/OmpF соответственно.

3. По оптимизированной схеме, разработанной для получения рекомбинантной щелочной фосфатазы CmAP, проведены выделение и очистка рекомбинантных гибридных белков CmAP/CGL и CmAP/OmpF, что позволило существенно увеличить выход целевых продуктов.

4. Методами ТЛФА и ИФА соответственно выявлены лиганд-связывающие свойства гибридных белков CmAP/CGL и CmAP/OmpF. Продемонстрирован высокий уровень активности щелочной фосфатазы CmAP в составе этих белков при взаимодействии со специфическими лигандами – муцином PMS и антителами к порину OmpF. Показано, что при определении антител к порину в пуловой сыворотке крови больных псевдотуберкулезом активность щелочной фосфатазы CmAP в составе гибридного белка CmAP/OmpF можно использовать вместо вторых антител, меченных пероксидазой.

5. Продемонстрирована возможность разработки новых методов комплексного определения онкомаркеров СА 19-9 и РЭА на основе рекомбинантного гибридного бифункционального белка CmAP/CGL для диагностики рака поджелудочной железы и колоректальной карциномы.

6. Показано, что гомогенный препарат высокоактивной рекомбинантной щелочной фосфатазы *SmAP* подавляет пролиферацию клеток карциномы (Т-47D) и аденокарциномы молочной железы (MDA-MB-231) при концентрации максимального полуингибирования IC_{50} 2,3 ед/6 x 10³ КОЕ или 3 мкг/мл. Установленная дефосфорилирующая активность *SmAP* в отношении ЛПС грамотрицательных бактерий определяет перспективу ее использования для нейтрализации воспалительных процессов, вызванных бактериальными эндотоксинами.

7. Методами *in silico* и ПЦР-опосредованного сайт-направленного мутагенеза гибридного бифункционального белка *SmAP/CGL* установлено, что лектинную активность гомотримера *CGL* обеспечивают одновременно три углевод-связывающих сайта НPY/KGG, имеющих разный уровень активности. Степень аффинности лектина *CGL* к лигандам муцинового типа зависит от состава трисахарида, образующего специфический эпитоп. Лектин *CGL* проявляет специфичность к двум остаткам галактозы и третьему остатку фукозы эпитопа.

Список публикаций по теме диссертации

Патент № 2016132052. Российская федерация. Рекомбинантная плазмидная ДНК рЕТ40*SmAP/OmpF*, кодирующая гибридный бифункциональный полипептид *SmAP/OmpF* со свойствами высокоактивной щелочной фосфатазы *SmAP* и порообразующего мембранного белка *OmpF*, рекомбинантный штамм *E. coli* Rosetta(DE3)/рЕТ40*SmAP/OmpF* – продуцент гибридного бифункционального полипептида *SmAP/OmpF* и способ его получения./ Балабанова Л.А., Голотин В.А., **Буйновская Н.С.**, Портнягина О.Ю., Новикова О.Д., Рассказов В.А.; заявитель и патентообладатель Учреждение РАН Тихоокеан. ин-т биоорган. химии ДВО РАН от 25.08.2017г.

Статьи:

1. **Буйновская Н. С.** Структурно-функциональные особенности углеводсвязывающих сайтов галактозоспецифичного лектина мидии *Crenomytilus grayanus* // Вестник ДВО РАН. – 2015. – № 6. – С. 150–154.

2. Голотин В. А., Балабанова Л. А., **Буйновская Н. С.**, Лихацкая Г. Н., Булгаков А. А., Черников О. В., Чикаловец И. В., Рассказов В. А. Щелочная фосфатаза морской бактерии *Cobetia marina* как инструмент в исследовании свойств рекомбинантных белков // Вестник ДВО РАН. – 2015. – № 6. – С. 125–131.

3. Kovalchuk S. N., Golotin V. A., Balabanova L. A., **Buinovskaya N. S.**, Likhatskaya G. N., Rasskazov V. A. Carbohydrate-binding motifs in a novel type lectin from the sea mussel *Crenomytilus grayanus*: homology modeling study and site-specific mutagenesis // Fish & Shellfish Immunology. – 2015. – Vol. 47, N 1. – P. 565–571.

4. **Buinovskaya N. S.**, Golotin V. A., Balabanova L. A., Kovalchuk S. N., Likhatskaya G. N., Rasskazov V. A. Effect of point mutations in carbohydrate-binding sites on the functionality of a lectin from *Crenomytilus grayanus* // Achievements in the Life Science. – 2016. – Vol. 10, suppl. – P. S6.

5. **Буйновская Н. С.**, Балабанова Л. А., Портнягина О. Ю., Новикова О. Д., Рассказов В. А. Гибридный бифункциональный белок на основе порина *OmpF* и высокоактивной щелочной фосфатазы // Биоорганическая химия. – 2018. – Т. 44, № 4. – С. 417–424.

6. Kovalchuk S. N., **Buinovskaya N. S.**, Likhatskaya G. N., Rasskazov V. A., Son O. M., Tekutyeva L. A., Balabanova L. A. Mutagenesis studies and structure-function relationships for GalNAc/Gal-specific lectin from the sea mussel *Crenomytilus grayanus* // Marine Drugs. – 2018. – Vol. 16, N 12. – P. 471[1–10].

7. Терентьева Н. А., **Буйновская Н. С.**, Носкова Ю. А., Слепченко Л. В., Недашковская О. И., Текутьева Л. А., Балабанова Л. А. Гидролитические ферменты из морских организмов как ингибиторы образования биопленок. // Биология моря. – 2020. – Т.46, № 4. – С. 285–288.

Тезисы:

1. Голотин В. А., **Ярмоленко (Буйновская) Н. С.**, Балабанова Л. А., Черников О. В., Чикаловец И. В., Молчанова В. И., Рассказов В. А. Получение рекомбинантного бифункционального полипептида на основе щелочной фосфатазы морской бактерии и галактозосвязывающего лектина морской мидии: материалы всероссийской научно-практической конференции «Биологически активные вещества из морских гидробионтов в биотехнологии и медицине» // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2014. – № 3 (57). – С. 22–23.

2. **Ярмоленко (Буйновская) Н. С.**, Голотин В. А., Балабанова Л. А., Рассказов В. А. Установление структуры галектина мидии *Crenomytilus grayanus* [Электронный ресурс] // Материалы региональной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых по естественным наукам, Владивосток, 15–30 апреля 2014 г.: научное электронное издание – Владивосток: Дальневосточный федеральный университет, 2014. – С. 47–48.

3. Голотин В. А., **Буйновская Н. С.**, Балабанова Л. А., Лихацкая Г. Н., Рассказов В. А. Щелочная фосфатаза морской бактерии в исследовании свойств лектина мидии // Проблемы развития высоких технологий «PhysioMedi»: сборник статей Восьмой международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине», 20–22 мая 2015 г., Санкт-Петербург, Россия. – 2015. – Т. 1. – С. 35–37. – СПб.: Изд-во Политехнического университета.

4. **Буйновская Н. С.**, Балабанова Л. А., Портнягина О. Ю., Голотин В. А., Новикова О. Д., Рассказов В. А. Гибридный бифункциональный порин с фосфатазной активностью: V съезд физиологов СНГ, V съезд биохимиков России, Конференция ADFLIM, Сочи – Дагомыс, Россия, 4–8 октября 2016 // Acta Naturae. – 2016. – № S-2. – С. 236.

5. Голотин В. А., Балабанова Л. А., Портнягина О. Ю., Рассказов В. А., Носкова Ю. А., **Буйновская Н. С.**, Слепченко Л. В., Новикова О. Д. Получение водорастворимого рекомбинантного OmpF порина *Y. pseudotuberculosis* для диагностики псевдотуберкулеза: V съезд физиологов СНГ, V съезд биохимиков России, Конференция ADFLIM, Сочи – Дагомыс, Россия, 4–8 октября 2016 // Acta Naturae. – 2016. – № S-2. – С. 130–131.

6. **Буйновская Н. С.**, Голотин В. А., Балабанова Л. А., Ковальчук С. Н., Лихацкая Г. Н., Рассказов В. А. Влияние точечных мутаций углеводсвязывающих сайтов на функциональность лектина мидии *Crenomytilus grayanus* // «Фундаментальная гликобиология» III Всероссийская конференция, Владивосток, 7–12 сентября 2016 г.: материалы конференции – Владивосток: Мор. гос. университет, 2016. – С. 122.

7. Balabanova L. A., Slepchenko L. V., **Buinovskaya N. S.**, Likhatskaya G. N., Kuzmich A. S., Portnyagina O. Yu., Novikova O. D., Bakunina I. Yu., Shkryl Yu. N., Kovalchuk S. N. Marine bacterial enzymes for molecular genetics and structure-function studies // Вестник ДВО РАН. – 2018. – № 6, suppl. – С. 76–77.

8. **Buinovskaya N. S.**, Bakholdina S. I., Balabanova L. A. Dephosphorylation of lipopolysaccharides by alkaline phosphatase from marine bacterium // Вестник ДВО РАН. – 2018. – № 6, suppl. – С. 80–81.

10. **Буйновская Н. С.**, Носкова Ю. А., Христенко В. С., Слепченко Л. В., Текутьева Л. А., Балабанова Л. А. Оптимизация производства рекомбинантной высокоактивной щелочной фосфатазы морской бактерии *Cobetia amphilecti*. – Текст: электронный // Конференция, посвященная 55-летию ТИБОХ ДВО РАН и 90-летию со дня рождения его основателя академика Г. Б. Елякова, Владивосток, 11–15 сентября 2019 г.: материалы конференции – Владивосток, 2019. – С. 61.
11. Терентьева Н. А., **Буйновская Н. С.**, Носкова Ю. А., Слепченко Л. В., Володько А. В., Недашковская О. И., Тимченко Н. Ф., Долматова Л. С., Елисейкина М. Г., Балабанова Л. А. Биологически активные вещества морского происхождения как ингибиторы образования биопленок. – Текст: электронный // Конференция, посвященная 55-летию ТИБОХ ДВО РАН и 90-летию со дня рождения его основателя академика Г. Б. Елякова, Владивосток, 11–15 сентября 2019 г.: материалы конф. – Владивосток, 2019. – С. 106.
12. **Буйновская Н. С.**, Лихацкая Г. Н., Ковальчук С. Н., Балабанова Л. А. In silico мутагенез лектина CGL для повышения специфичности к онкомаркерам у рекомбинантного гибрида со щелочной фосфатазой морской бактерии *Cobetia amphilecti* КММ 1561 // Сохранение и преумножение генетических ресурсов микроорганизмов: сборник тезисов Всероссийской школы-конференции, Санкт-Петербург, 22–23 июня 2022 г. – М.: Издательство Перо, 2022. – С. 21.
13. **Buinovskaya N. S.**, Likhatskaya G. N., Kovalchuk S. N., Balabanova L. A. Prediction of new ligand-binding properties of a galactose-specific lectin by in silico mutagenesis // The 9th annual student scientific conference in English, Vladivostok, 25–31 May 2022: conference proceedings. – Vladivostok: Far East. Feder. Univ., 2022. – P. 11–13.
14. **Буйновская, Н. С.**, Лихацкая Г. Н., Текутьева Л. А., Балабанова Л. А. Применение компьютерного моделирования и молекулярного докинга для поиска и разработки новых фармацевтических и диагностических средств на основе метаболитов морских организмов: // Международная Научная Конференция по Моделированию и Анализу Комплексных Систем и Процессов, Москва, 7-9 декабря, 2022 года. - 2022.