

КАРАТОВСКАЯ АННА ПЕТРОВНА

**ИММУНОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ
AlpA И AlpB, СЕКРЕТИРУЕМЫХ *LYSOBACTER SP. XL1***

03.01.04 Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Пушино 2019

Работа выполнена в лаборатории иммунохимии Филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской Академии Наук (ФИБХ РАН), г. Пущино.

Научный руководитель:

кандидат химических наук
Руденко Наталья Васильевна

Официальные оппоненты:

Солонин Александр Сергеевич, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», заведующий лабораторией молекулярной микробиологии.

Филатов Владимир Львович, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Проблемная научно-исследовательская лаборатория «Химии ферментов» кафедра Биоорганической химии, Биологический факультет, научный сотрудник.

Ведущая организация:

Федеральное бюджетное учреждение науки государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, г. Оболенск.

Защита состоится «___» _____ 2019 года в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 002.247.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы РАН по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 1 и на сайте: <http://fbras.ru/>.

Автореферат разослан «___» _____ 2019 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 002.247.01,
кандидат биологических наук

А.Ф. Орловский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

Моноклональные антитела (МА) являются важнейшим инструментом исследований в биохимии, молекулярной биологии и медицине. МА широко применяются в научной практике, так как позволяют идентифицировать распределение молекул как в организме в целом, так и в отдельной клетке и её компартментах, выявлять чужеродные антигены, получать гомогенные препараты исследуемых веществ и т. п. Успех применения МА обусловлен направленностью против конкретного уникального участка исследуемого вещества – антигенной детерминанты. В настоящее время МА используются для решения как фундаментальных, так и биотехнологических проблем.

В данной работе МА были применены для разработки методов количественного определения молекулярных форм литических ферментов AlpA и AlpB *Lysobacter* sp. XL1 и изучения их распределения внутри и за пределами клетки. Ферменты входят в состав антимикробного препарата лизоамидаза, получаемого из культуральной жидкости бактерии. AlpA и AlpB – наиболее охарактеризованные внеклеточные литические ферменты *Lysobacter* sp. XL1, представляющие собой гомологичные (61,5%) (Муранова *и др.*, 2004; Lapteva *et al.*, 2012) низкомолекулярные (22 и 24 кДа) термостабильные белки. Демонстрируя различный спектр антимикробной активности, AlpA и AlpB гидролизуют пептидогликан клеточной стенки микроба – мишени, разрушая пептидные глицин-глициновые мостики и амидную связь между L-аланином и сахарным остовом (Бегунова *и др.*, 2003; Кудрякова 2017).

Ферменты AlpA и AlpB относятся к сериновым протеазам и синтезируются в виде предшественников. Аминокислотные последовательности PreAlpA и PreAlpB состоят из последовательностей сигнальных пептидов, N-концевых пропептидов и зрелых частей, которые превращаются в активные формы в процессе созревания и секреции (Lapteva *et al.*, 2012). Сигнальный пептид обеспечивает транслокацию синтезированной полипептидной цепи через цитоплазматическую мембрану в периплазму. Пропептид в составе предшественника удерживает зрелую часть в неактивном состоянии. В результате отщепления пропептида формируется протеолитически активная пространственная структура зрелой части. Несмотря на гомологию первичной структуры, общий принцип синтеза и тип секреции, ферменты AlpA и AlpB по-разному попадают в окружающую среду. Фермент AlpA предположительно секретруется также, как и гомологичная ему α -литическая протеаза *Lysobacter enzymogenes* (Silen *et al.*, 1989; Fujishige *et al.*, 1992; Vasilyeva *et al.*, 2014). Секреция фермента AlpB осуществляется посредством внешнемембранных везикул (Vasilyeva *et al.*, 2008; Kudryakova *et al.*, 2015, 2016).

В последнее время достигнуты большие успехи в изучении секреции белков в окружающую среду, однако, остаются открытыми некоторые вопросы: где и когда происходит полное отщепление пропептидов исследуемых ферментов, где происходит окончательное созревание функционально активных форм – в периплазме или в процессе транслокации через внешнюю мембрану. МА, являясь специфичным инструментом исследования, направленным на различающиеся участки близких по структуре исследуемых гомологичных белков, могут помочь приблизиться к решению этих вопросов.

Ферменты, секретируемые *Lysobacter* sp. XL1, являются основой ферментного антимикробного комплекса лизоамидазы и могут быть использованы для создания современных антимикробных препаратов, не вызывающих привыкания патогенов, в отличие от антибиотиков. Разработанные в данной работе методы количественного определения эндопептидаз AlpA и AlpB на основе МА, позволят стандартизовать лизоамидазу.

Работа представляется актуальной, так как иммунохимическое изучение топографии молекулярных форм литических ферментов AlpA и AlpB, секретируемых *Lysobacter* sp. XL1, позволит приблизиться к пониманию особенностей их секреции. Результаты работы могут иметь и прикладное значение при разработке новых антимикробных препаратов, не приводящих к появлению резистентности, на основе секретируемых литических ферментов *Lysobacter* sp. XL1.

Цель работы – разработка методов иммунохимической идентификации и количественного определения молекулярных форм литических эндопептидаз AlpA и AlpB *Lysobacter* sp. XL1 на основе моноклональных антител. Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Получить неперекрестные МА против пропептидов и зрелых форм эндопептидаз AlpA и AlpB.
2. Разработать на основе полученных МА тест–системы в формате «сэндвич»–ИФА для количественного определения пропептидов и зрелых форм эндопептидаз AlpA и AlpB.
3. Детектировать молекулярные формы AlpA и AlpB иммуноблоттингом и определить их количественное содержание разработанными «сэндвич»–ИФА в клеточных фракциях *Lysobacter* sp. XL1.
4. Апробировать разработанные методы определения количественного содержания ферментов AlpA и AlpB в лизоамидазе.

Научная новизна

Получены представительные коллекции гибридомных клеток – продуцентов МА к пропептидам и зрелым формам эндопептидаз AlpA и AlpB, секретируемых *Lysobacter* sp. XL1.

Высокая аффинность и специфичность (отсутствие иммуноперекрестной реактивности) позволило эффективно использовать МА в качестве инструмента для иммунохимического исследования эндопептидаз AlpA и AlpB.

Разработаны высокочувствительные тест–системы в формате «сэндвич»–ИФА на основе МА для количественного определения молекулярных форм литических эндопептидаз AlpA и AlpB, секретируемых *Lysobacter* sp. XL1.

Количественное определение содержания молекулярных форм AlpA и AlpB «сэндвич»–ИФА и их детекция иммуноблоттингом в клеточных фракциях *Lysobacter* sp. XL1 показали, что AlpA секретируется, не задерживаясь в периплазматическом пространстве, фермент AlpB накапливается в периплазматическом пространстве.

Научно–практическая значимость работы

С помощью разработанных тест–систем на основе МА возможны стандартизация и проведение контроля качества антимикробных препаратов на основе ферментов, секретируемых грамотрицательной бактерией *Lysobacter* sp. XL1 –

лизоамидазы и препаратов, разрабатываемых в настоящее время с использованием рекомбинантных штаммов–продуцентов.

Впервые метод «сэндвич»–ИФА использован для количественной оценки содержания ферментов AlpA и AlpB и их молекулярных форм в различных компартментах клетки.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Представительные коллекции гибридных клеток – продуцентов высокоаффинных неперекрестных МА к пропептидам и зрелым формам эндопептидаз AlpA и AlpB.
2. Высококочувствительные тест–системы на основе МА для количественного определения молекулярных форм литических эндопептидаз AlpA и AlpB.
3. Детекция и количественная оценка содержания молекулярных форм ферментов AlpA и AlpB в различных компартментах клетки.
4. Стандартизация и контроль качества лизоамидазы и препаратов, разрабатываемых с использованием рекомбинантных штаммов-продуцентов.
5. В периплазме происходит окончательное созревание ферментов AlpA и AlpB.
6. В окружающую среду зрелые формы ферментов AlpA и AlpB секретируются без пропептидов, уровень секреции AlpA превышает AlpB.

Методы исследования.

В работе применялись современные биохимические методы: гибридная технология; ИФА в непрямом и «Сэндвич» форматах; иммуноблоттинг; электрофорез в денатурирующих условиях; аффинная хроматография; культивирование бактерий.

Степень достоверности полученных результатов.

Достоверность представленных в диссертации данных и сделанных выводов обусловлена объемом экспериментального материала, а также использованием соответствующих компьютерных программ.

Личный вклад автора

Получение неперекрестных МА к пропептидам и зрелым формам литических эндопептидаз AlpA и AlpB, секретируемых *Lysobacter* sp. XL1; проведение иммунохимической характеристики МА к пропептидам и зрелым формам AlpA и AlpB; наработка МА *in vivo* и *in vitro*; очистка МА; создание тест–систем в варианте «сэндвич»–ИФА на основе полученных МА; количественная оценка содержания пропептидов и зрелых форм AlpA и AlpB в исследуемых препаратах; установление локализации молекулярных форм литических эндопептидаз AlpA и AlpB в клетках *Lysobacter* sp. XL1 иммуноблоттингом; – выполнялись лично автором.

Микробиологические и биохимические этапы работы, связанные с культивированием и получением клеточных фракций бактерии *Lysobacter* sp. XL1, получение рекомбинантных белков проводились в лаборатории биохимии клеточной поверхности микроорганизмов ИБФМ РАН, г. Пущино (заведующая лабораторией к.б.н. Васильева Н.В).

Соискатель принимал непосредственное участие в интерпретации и обсуждении всех полученных результатов, в оформлении публикаций и их подаче.

Связь с государственными программами

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№ 13–04–00644) и программы УМНИК (государственный контракт № 9840ГУ2/2015).

Апробация работы и публикации

Материалы диссертации были представлены на российских и международных конференциях: Международная конференция «БИОЛОГИЯ – НАУКА 21 ВЕКА» (Пушино 2015, устный доклад); Всероссийская конференция с элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология» (Тула 2013, 2014, 2015, устные доклады); Седьмая региональная научно–практическая конференция «Молодежные научно–инновационные проекты Московской области» (п. Дубровицы 2014, устный доклад); XXV зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико–химической биологии и биотехнологии» (Москва 2013, постер); XXVII зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико–химической биологии и биотехнологии» (Москва 2015, постер); XXVIII зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико–химической биологии и биотехнологии» (Москва 2016, постер).

По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа содержит введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Работа изложена на 121 странице, содержит 26 рисунков и 9 таблиц. Список литературы включает 301 источник отечественной и зарубежной литературы.

Сокращения, принятые в тексте

МА – моноклональные антитела; ProA – пропептид эндопептидазы AlpA; ProB – пропептид эндопептидазы AlpB; PreAlpA – предшественник AlpA; PreAlpB – предшественник AlpB; ИФА – иммуноферментный анализ; тИФА – твердофазный иммуноферментный анализ; PBS – фосфатно–солевой буферный раствор, содержащий 150 мМ NaCl, 5,2 мМ Na₂HPO₄, 1,7 мМ KH₂PO₄; PBST – PBS, содержащий 0,1% Tween–20; KLN – гемоцианин улитки (*keyhole limpet hemocyanin*); K_{афф} – константа аффинности антител; ТХУ – трихлоруксусная кислота; SDS – додецилсульфат натрия.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования являлся штамм *Lysobacter* sp. XL1, предоставленный лабораторией биохимии клеточной поверхности микроорганизмов ИБФМ РАН, г. Пушино. Культивирование проводили на модифицированной среде LB (pH 7,5) при 29°C с аэрацией, в колбах объемом 750 мл при перемешивании на качалке в течение 20 ч. (Руденко *и др.*, 2014; Vasilyeva *et al.*, 2014).

Непрямой тИФА использовали для определения относительного содержания специфических антител в иммунных сыворотках, асцитных жидкостях, надклеточных супернатантах и препаратах очищенных МА. Антигены (ProA, ProB, AlpA) сорбировали из концентрации 1 мкг/мл в 0,05 М карбонатном буфере (pH 9,6) на поверхности лунок планшетов для ИФА («Costar», США). AlpB иммобилизовали в 0,05 М карбонатном буфере (pH 9,6), содержащем 0,0004% SDS после предварительного кипячения в течение 20 минут, в 0,1% SDS. Свободные центры связывания пластика блокировали 1% (w/v) раствором желатина в PBST в течение 30 мин. Далее вносили исследуемые образцы. Комплексы антиген–антитело выявляли

добавлением конъюгата кроличьих антител против иммуноглобулинов мыши («Sigma», США) с пероксидазой хрена в разведении согласно инструкции производителя, в PBST. Для детекции использовали 4 мМ раствор *орто*-фенилендиамина («Sigma», США) в цитрат–фосфатном буфере, содержащем 0,003% (v/v) H₂O₂. Реакцию останавливали добавлением равного объема 10% (v/v) H₂SO₄ и определяли оптическое поглощение при 490 нм на мультипланшетном ридере Anthos 2020. Значение оптического поглощения в лунках без добавления специфических антител, соответствующее неспецифическому связыванию конъюгата с иммобилизованным антигеном (отрицательный контроль) вычитали из оптического поглощения в экспериментальной лунке.

Иммунизация животных. В работе использовали мышей линии Balb/C, которых содержали в стандартных условиях вивария на обычном рационе кормления, при свободном доступе к воде и пище. Исследования на животных проводили в соответствии с международными и российскими рекомендациями по уходу и использованию лабораторных животных. Иммунизацию мышей линии Balb/C проводили рекомбинантными пропептидами (ProA, ProB) и зрелыми формами (AlpA, AlpB) интраперитонеально по 10 мкг в расчете на одну мышь с использованием адьювантов Фрейнда («Sigma», США) (первую инъекцию – в полном, последующие – в неполном). В случае зрелой формы эндопептидазы AlpA использовали две схемы иммунизации. Первая схема совпадала с таковой для ProA и ProB. Согласно второй схеме AlpA вводили подкожно в задние лапки по 15 мкг в расчете на одно животное и по 10 мкг через две недели. Содержание специфических антител в сыворотках крови анализировали тИФА.

Для получения МА против AlpB использовали пептиды, конъюгированные глутаровым альдегидом с белком–носителем KLH (Avrameas *et al.*, 1969). Конъюгаты пептидов с KLH (5, 10 и 20 мкг пептида или 50, 100 и 200 мкг KLH в расчете на одно животное) вводили в адьюванте Фрейнда интраперитонеально мышам линии Balb/C с интервалом в две недели. Иммунный ответ оценивали тИФА по взаимодействию сывороток крови с интактным AlpB.

Получение гибридом, продуцирующих МА к пропептидам и зрелым формам эндопептидаз AlpA и AlpB проводили по методу Келлера и Мильштейна (Köhler *et al.*, 1975).

МА нарабатывали *in vivo* в асцитных жидкостях мышей линии Balb/C.

Определение типов тяжелой и легкой цепи иммуноглобулинов проводили методом тИФА с помощью набора для изотипирования иммуноглобулинов мыши «Rapid ELISA mouse mAb Isotyping Kit» («Thermo scientific», США) согласно инструкции производителя.

Очистку МА из асцитных жидкостей проводили методом аффинной хроматографии на белок А–агарозе («ThermoFisher Scientific Pierce», США).

Концентрацию рекомбинантных антигенов (ProA, ProB, AlpA, AlpB) измеряли по методу Бредфорд (Bradford 1976), по поглощению при длине волны 592 нм на спектрофотометре Genesys 10 UN («Thermo scientific», США).

Концентрацию очищенных иммуноглобулинов определяли на спектрофотометре Genesys 10 UN («Thermo scientific», США) по поглощению при длине волны 280 нм, для расчета концентрации использовали весовой коэффициент экстинкции 0,74 (Hay & Westwood 2002).

Константы аффинности МА определяли по методу Beatty с соавт. (Beatty *et al.*, 1987).

Поликлональные антитела против денатурированной формы эндопептидазы AlpA получали после иммунизации мышей линии Balb/C денатурированным 10% ТХУ рекомбинантным препаратом AlpA в адьюванте Фрейнда.

«Сэндвич»–ИФА. В лунки планшетов для ИФА вносили МА «захвата» с концентрацией 10 мкг/мл в 0,05 М карбонатном буфере (рН 9,6) по 100 мкл на лунку и иммобилизовали в течение ночи при +4°C. Свободные центры связывания пластика блокировали 1% раствором желатина в PBST в течение 30 мин, далее в экспериментальные лунки добавляли препараты, содержащие исследуемые молекулярные формы ферментов AlpA и AlpB, а также соответствующие биотинилированные антитела детекции (MAbio) в конечной концентрации 10 мкг/мл. В случае определения зрелой формы AlpB препараты предварительно денатурировали добавлением 8 М NaOH до 0,16 М с последующей инкубацией (7 минут при комнатной температуре) и нейтрализацией добавлением 4 М Трис–HCl рН 7,0 до концентрации 0,5 М. В контрольные лунки ИФА–планшета добавляли только MAbio. Образовавшиеся иммунные комплексы детектировали конъюгатом пероксидазы со стрептавидином согласно инструкции производителя. После каждой стадии планшеты отмывали избытком PBST не менее 6 раз. Реакцию визуализировали обработкой *орто*–фенилендиамином, измеряя оптическое поглощение при 490 нм. Эффективность реакции оценивали по соотношению «сигнал/фон» (отношение оптического поглощения в экспериментальных лунках к поглощению в лунках без антигена).

При подборе детектирующих пар антител в экспериментальные лунки планшета вносили искомый фермент в концентрации 100 нг/мл. При построении калибровочного графика и определении минимальной детектируемой концентрации аналита фермент вносили в последовательных разведениях от 100 до 1×10^{-3} нг/мл. При анализе образцов в случае необходимости для попадания в линейный диапазон измерения проводили разбавление PBST.

Для количественного определения зрелой формы фермента AlpB образцы денатурировали щелочью, в случае культуральной жидкости – последовательно кислотой и щелочью.

Каждый эксперимент количественного анализа клеточной фракции сопровождали положительным и отрицательным контролями. В качестве положительного контроля для подтверждения калибровочного графика использовали 2 – 3 заведомо известные концентрации аналита. Отрицательным контролем служило неспецифическое связывание конъюгата стрептавидин пероксидазы с детектирующими MAbio. Значение оптической плотности в лунках отрицательного контроля вычитали из оптического поглощения экспериментальных лунок.

Электрофоретический анализ очищенных МА, клеточных фракций и культуральной жидкости проводили в 12% полиакриламидном геле в присутствии β-меркаптоэтанола и SDS по методу Лэммли (Laemmly 1970).

Иммуноблоттинг проводили после электрофоретического разделения и переноса белков с полиакриламидного геля на нитроцеллюлозную мембрану Hybond ECL («GMBH», ФРГ) в течение 15 ч при силе тока 20 мА в буфере, содержащем 25 мМ Трис–HCl, 0,25 М глицин, 0,1% SDS, 20% метанол, рН 8,3. Для выявления AlpA

мембраны обрабатывали иммунной сывороткой мыши к денатурированному AlpA в разведении 1:10000, для выявления ProA – ProA–1 в концентрации 10 мкг/мл; для AlpB – P2AlpB–8 в концентрации 1 мкг/мл; для ProB – ProB–10 в концентрации 10 мкг/мл в PBST. Далее мембраны обрабатывали конъюгатом пероксидазы хрена с кроличьими антителами к иммуноглобулинам мыши в разведении согласно рекомендации производителя. Сигналы визуализировали на рентгеновской пленке с помощью люминесцентного ECL–субстрата («ГМВН», ФРГ) (Burnett 1981; Остерман 1986).

Получение клеточных фракций *Lysobacter sp. XL1* осуществляли по методу Носсала и Хэпела с модификациями (Nossal *et al.*, 1966; Ситкин *и др.*, 2003).

Бактериолитическую активность определяли турбидиметрически по уменьшению поглощения при 540 нм суспензии автоклавированных клеток *S. aureus* 209–P (Vasilyeva *et al.*, 2008).

Результаты работы обрабатывали статистически с использованием программы OriginPro 8.1. Опыты проводили в 3-5 биологических повторах. Аналитические измерения исследуемых образцов проводили трижды, сравнивая полученные значения со значениями отрицательного контроля, учитывающего возможные неспецифические взаимодействия. В таблицах и на рисунках представлены данные в виде среднего значения \pm ошибка измерения. Определение положения пептидов, выбранных для получения МА, в пространственной структуре AlpB проводили с помощью программы Chimera 1.11.2.

РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

ПОЛУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНЫХ ГИБРИДОМНЫХ КЛОНОВ-ПРОДУЦЕНТОВ МА К ПРОПЕПТИДАМ И ЗРЕЛЫМ ФОРМАМ ЭНДОПЕПТИДАЗ AlpA И AlpB *LYSOBACTER SP. XL1*

Получение и иммунохимическая характеристика МА к ProA и ProB

Аминокислотные последовательности ProA (169 а.о.) и ProB (166 а.о.) также, как и зрелые формы, гомологичны друг другу на 60,4%. Значительное подобие первичной структуры пропептидов ProA и ProB предполагает использование МА, узнающих уникальные эпитопы, характерные для индивидуальных пропептидов. Сравнение первичных структур ProA и ProB выявило около тридцати различающихся участков, содержащих не более трех аминокислот (Lapteva *et al.*, 2012). Часть из них входит в состав теоретически предсказанных эпитопов (<http://www.dnastar.com/t-solutions-structural-biology-epitope-prediction.aspx>), что позволило надеяться на получение специфичных МА (рис. 1).

ProA (1)	AFAADEVSP ¹ ELK ² FAM ³ QRDLGIF ⁴ PGQ ⁵ IAQYL ⁶ QTEK ⁷ LARTQ ⁸ AAAI ⁹ ERDL ¹⁰ GSQ ¹¹ FA
ProB (1)	---TDGLNPTL ¹ KLAM ² QRDL ³ LGLSSA ⁴ QVAQM ⁵ VQAD ⁶ RIATT ⁷ QEA ⁸ AIR ⁹ RTL ¹⁰ GS ¹¹ GYA
ProA (53)	GSW ¹ IERNAD ² GSFK ³ VVAAT ⁴ AGARK ⁵ ASA ⁶ IGG ⁷ VELRS ⁸ VRH ⁹ SLK ¹⁰ QL ¹¹ ONS ¹² MA ¹³ QLDAA
ProB (50)	GSW ¹ VERNDD ² GSYR ³ VVAAT ⁴ SGA ⁵ QKS ⁶ VAVAG ⁷ VELRH ⁸ VRH ⁹ SLK ¹⁰ QL ¹¹ NDS ¹² MA ¹³ ALDRD
ProA (105)	SNAR ¹ VKG ² ISK ³ PLD ⁴ GVQ ⁵ SWY ⁶ VDP ⁷ VSN ⁸ AVV ⁹ VR ¹⁰ VDQ ¹¹ GAS ¹² ERA ¹³ VDF ¹⁴ VAV ¹⁵ SGAD ¹⁶ AGA
ProB (102)	ARRR ¹ VPG ² ISK ³ LRS ⁴ GVQ ⁵ SWY ⁶ VD ⁷ PTT ⁸ NS ⁹ VVV ¹⁰ SV ¹¹ APGA ¹² DEEA ¹³ IDF ¹⁴ VAV ¹⁵ SGAD ¹⁶ ISS
ProA (157)	VR ¹ IEE ² VP ³ GTL ⁴ QTS
ProB (154)	IR ¹ VEE ² AV ³ GTP ⁴ QTT

Рис. 1. Сравнение первичных структур пропептидов бактериолитических эндопептидаз AlpA и AlpB, секретируемых *Lysobacter* sp. XL1, с помощью программы AlignX (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Подчеркнуты теоретически рассчитанные эпитопы (<http://www.dnastar.com/t-sub-solutions-structural-biology-epitope-prediction.aspx>).

Титры сывороток мышей, иммунизированных рекомбинантными ProA и ProB, определяли методом непрямого тИФА. Максимальный титр составлял 1:100 000. Вследствие значительной гомологии первичных структур антигенов, иммунные сыворотки демонстрировали высокую степень перекрестной реактивности по отношению к ProA и ProB. Для получения гибридом-продуцентов специфических МА использовали спленоциты тех мышей, сыворотки которых максимально взаимодействовали с антигеном, используемым для иммунизации, по сравнению с другими особями экспериментальной группы. Титры свидетельствовали о формировании достаточного пула плазматических клеток для получения гибридных клеточных линий, стабильно продуцирующих МА, как *in vitro*, так и *in vivo*.

Получение гибридом, продуцирующих МА к пропептидам эндопептидаз AlpA и AlpB, осуществляли с помощью гибридомной технологии по методу Келлера и Мильштейна (Köhler *et al.*, 1975). Было получено 12 стабильных гибридомных клонов, секретирующих МА против ProA и 12 – против ProB.

Иммуноперекрёстную реактивность полученных МА проверяли методом непрямого тИФА по взаимодействию с иммобилизованными нативными антигенами. МА ProA–1 и ProA–2 и все полученные антитела против ProB не обладали перекрестной реактивностью и были использованы для дальнейшего исследования.

Методом иммуноблоттинга показано, что МА ProA–1 и ProA–2, а также все двенадцать МА против ProB взаимодействуют с денатурированными формами соответствующих пропептидов, что свидетельствует об их направленности против конформационно–независимых или линейных эпитопов. МА также не обладают перекрестной реактивностью по отношению к денатурированным антигенам. Иммуноблоттингом было также показано, что МА узнавали соответствующую

денатурированную форму предшественника эндопептидаз (PreAlpA с молекулярной массой около 40 кДа, PreAlpB с молекулярной массой около 41 кДа) (рис. 2).

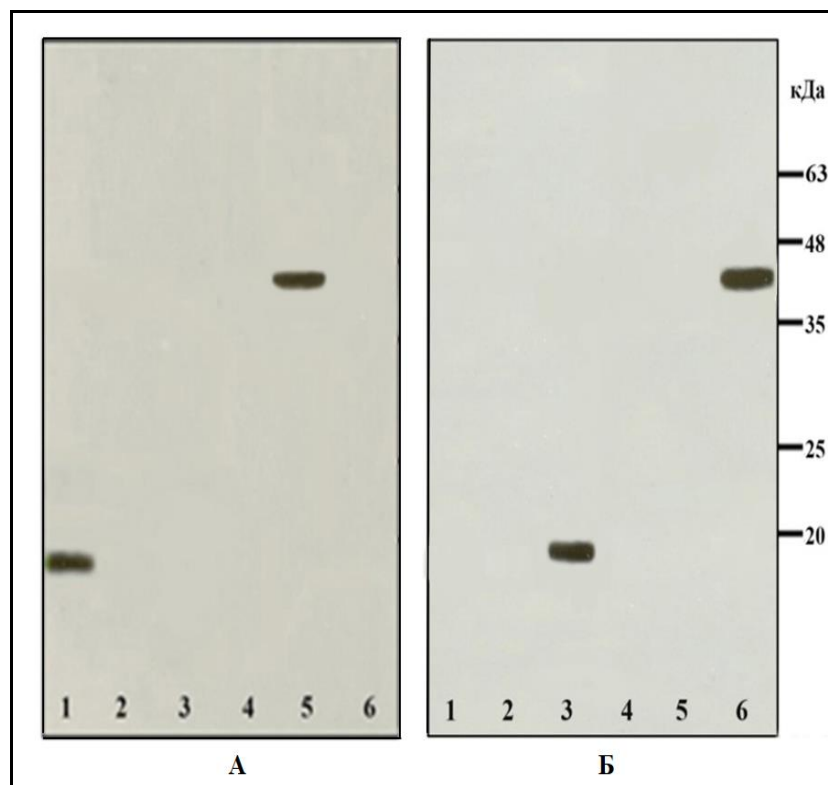


Рис. 2. Иммуноблоттинг с МА (А) – к ProA (ProA–1), (Б) – к ProB (ProB–6). 1 – ProA, 2 – зрелая форма AlpA, 3 – ProB, 4 – зрелая форма AlpB, 5 – PreAlpA, 6 – PreAlpB.

Все МА, продуцируемые полученными гибридными клонами, были изотипированы и относились к иммуноглобулинам класса G подклассу 1, имели в своем составе легкую цепь κ. Очистку полученных антител проводили аффинной хроматографией на белок А-агарозе. В результате очистки выделены электрофоретически гомогенные препараты антител, пригодные для получения их биотинилированных форм. $K_{\text{афф}}$ определяли по методу Beatty с соавт. (Beatty *et al.*, 1987) в ходе неконкурентного тИФА по взаимодействию с иммобилизованным антигеном. Полученные МА обладали высоким сродством к антигену. Значения $K_{\text{афф}}$ МА против ProA составили: $3,5 \times 10^9$ и $2,9 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$; против ProB варьировали от $1,5 \times 10^8$ до $2,2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$.

Получение и характеристика МА к зрелым формам эндопептидаз AlpA и AlpB

Получение МА к зрелой форме AlpA

Получение МА к зрелым формам эндопептидаз AlpA (199 а.о.) и AlpB (205 а.о.) было осложнено высокой гомологией ферментов. Сравнение первичных структур зрелых форм AlpA и AlpB выявило в первичных последовательностях этих ферментов только пять различающихся участков размером три и более аминокислотных остатка (Lapteva *et al.*, 2012) (рис. 3).



Рис. 3. Сравнение первичных структур эндопептидаз AlpA и AlpB с помощью программы AlignX (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Подчеркнуты теоретически рассчитанные (<http://www.dnastar.com/t-sub-solutions-structural-biology-epitope-prediction.aspx>) эпитопы, указаны последовательности синтезированных пептидов, квадратами отмечены различающиеся участки аминокислотных последовательностей.

С использованием алгоритма расчета антигенных детерминант (<http://www.dnastar.com/t-sub-solutions-structural-biology-epitope-prediction.aspx>), были теоретически предсказаны эпитопы ферментов AlpA и AlpB. Аминокислотная последовательность большинства из них совпадала в первичных структурах зрелых форм ферментов (рис. 3). Только один различающийся участок с 39 по 45 аминокислотный остаток (по нумерации в молекуле AlpA) входил в состав теоретической антигенной детерминанты на обеих молекулах. Анализ аминокислотных последовательностей показал низкую вероятность получения неперекрестных МА к линейным эпитопам. Однако отличия в первичной структуре могут способствовать формированию различающихся конформационных эпитопов, на которые теоретически возможно получить специфические МА.

Для получения гибридом, секретирующих не перекрестные МА к эндопептидазе AlpA, использовали два способа введения антигена и две схемы иммунизации рекомбинантным препаратом зрелой формы фермента. Титры иммунных сывороток, так же, как и в случае пропептидов, определяли с помощью непрямого тИФА. Максимальный титр составлял 1:256 000 при подкожной иммунизации и более 1:1 000 000 при внутрибрюшинной инъекции антигена. Однако при подкожной иммунизации иммунная сыворотка, полученная после иммунизации AlpA, несмотря на меньшие значения титра, практически не взаимодействовала с эндопептидазой AlpB.

Иммунные спленоциты, полученные от животного, иммунизированного интраперитонеально, (титр антител против AlpA – 1:2 000 000, против AlpB 1:1 000 000), использовали для получения гибридом по методу Келлера и Мильштейна (Köhler *et al.*, 1975). Было получено 15 гибридомных клонов, демонстрирующих положительный сигнал в ИФА, но в конечном результате только

два из них секретировали МА (AlpA–1 и AlpA–2), не обладающие перекрестной реактивностью с AlpB. При подкожной иммунизации для получения гибридом использовали лимфоциты из подколенных лимфоузлов. В результате было получено еще тринадцать стабильных клонов–продуцентов неперекрестных МА против AlpA.

Получение МА к зрелой форме AlpB

При анализе антиген связывающей активности иммунных сывороток было выяснено, что эндопептидаза AlpB не иммобилизуется на пластик для ИФА в стандартных условиях (0,05 М бикарбонатный буфер pH 9,6). Поэтому были подобраны специальные условия сорбции этого фермента на иммунопланшеты: 1) с pH 13,4; 2) с добавлением фенола; 3) с предварительным кипячением в SDS.

МА, полученные после иммунизации AlpB различными способами, одинаково узнавали оба фермента. Поэтому, для получения МА, специфически узнающих только AlpB, для иммунизации использовались пептиды, аминокислотная последовательность которых соответствовала максимально отличающимся от AlpA фрагментам первичной структуры AlpB (рис. 3).

Были синтезированы два пептида: №1 EYRMPLPDGRVGLK, содержащий аминокислотные остатки с 8 до 20 и №2 KLPAGQNDNCVSP, содержащий аминокислотные остатки с 169–ого по 180–ый в первичной последовательности фермента AlpB. Заряженные аминокислоты в составе выбранных пептидов предполагали их гидрофильные свойства, а также их вероятное расположение на поверхности белковой глобулы. В пространственной структуре гомологичной ферментам AlpA и AlpB α -литической протеазы из *L. enzymogenes* участки аминокислотной последовательности, соответствующие выбранным пептидам, располагались на поверхности [PDB 2ALP] (Fujinaga *et al.*, 1985). Участки, соответствующие последовательностям выбранных пептидов, полностью совпадали в первичных структурах α -литической протеазы из *L. enzymogenes* и AlpA, что предполагает сходство их пространственных структур, что и было показано в работе Тищенко с соавт. (Tishchenko *et al.*, 2016).

При синтезе к С–концу первого и к N–концу второго пептида были добавлены остатки лизина с NH₂–группами, необходимыми для последующей конъюгации с белком–носителем. Для придания иммуногенных свойств пептиды конъюгировали с KLH глутаровым альдегидом (Avrameas *et al.*, 1969) и использовали для иммунизации мышей линии Balb/C.

Сыворотки крови животных, полученные после иммунизации конъюгатом KLH с пептидом №1, взаимодействовали с ферментом при всех используемых условиях сорбции. Иммунные сыворотки, полученные после иммунизации конъюгатом KLH с пептидом №2, взаимодействовали с ферментом, сорбированным после кипячения образца (денатурации) в присутствии SDS. Т.е., антитела узнавали только денатурированный образец AlpB, что свидетельствовало о недоступности линейной антигенной детерминанты в пространственной структуре нативного белка. На рисунке 4 представлена пространственная структура AlpB, на которую с помощью программы Chimera 1.11.2 были наложены аминокислотные последовательности пептидов №1 и №2. Участок аминокислотной последовательности, соответствующий пептиду №1 оказался экспонирован на поверхности белка. Участок первичной

структуры, соответствующий пептиду №2 не локализован в пространственной структуре AlpV (Кудрякова 2017).

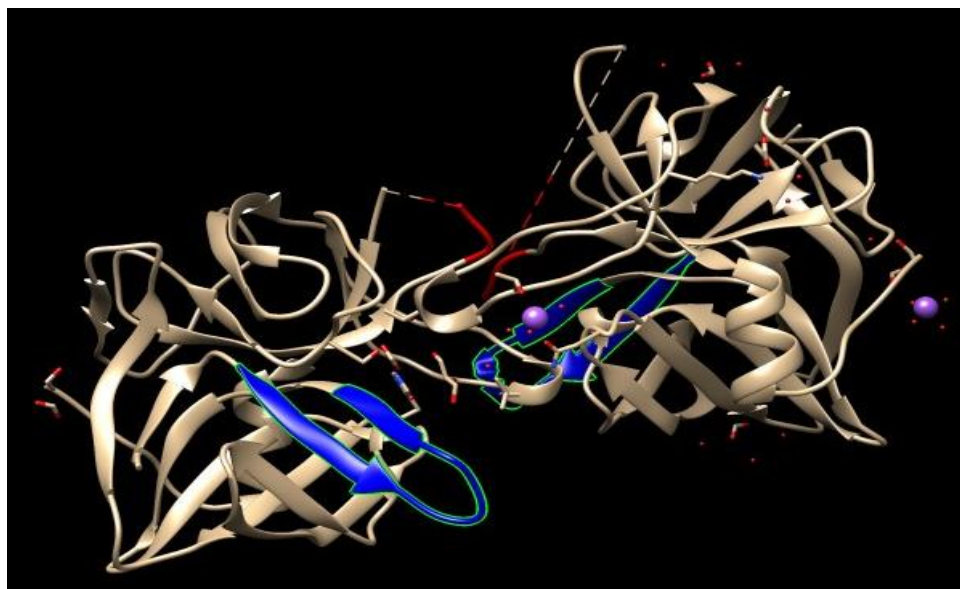


Рис. 4. Структура молекулы белка AlpV в ассиметричной части ячейки (Кудрякова 2017). Наложение аминокислотных последовательностей пептидов на структуру AlpV. Синим цветом изображен пептид №1, красным – пептид №2.

Отбор гибридных клонов, секретирующих МА к AlpV, проводили по взаимодействию надклеточных супернатантов с иммобилизованным на пластик рекомбинантным препаратом AlpV в 0,05M Na-карбонатном буфере, pH 9,6, содержащем 0,0004% SDS с предварительным кипячением в 0,1% SDS.

В результате было получено 1 МА после иммунизации конъюгированным с KLH пептидом №1 (P1AlpV-6) и 4 МА (P2AlpV-4, P2AlpV-5, P2AlpV-8, P2AlpV-9) – после иммунизации конъюгированным с KLH пептидом №2.

Иммунохимическая характеристика МА к зрелым формам

Иммуноперекрестная реактивность МА к AlpA по отношению к эндопептидазе AlpV была проверена в условиях максимальной сорбции AlpV подобранных при взаимодействии с иммунной сывороткой, ни одно из которых нельзя считать нативным. Показано, что при этих условиях сорбции AlpV, полученные МА против фермента AlpA не взаимодействовали с эндопептидазой AlpV.

Все полученные МА против зрелой формы AlpA не взаимодействовали с денатурированной формой эндопептидазы AlpA, что было проверено методом иммуноблоттинга, а также непрямого тИФА с использованием иммобилизованного денатурированного AlpA. Следовательно, антитела направлены против конформационных эпитопов фермента и способны специфически взаимодействовать только с нативной формой AlpA. Ни одно из 15 полученных МА к AlpA не обладало иммуноперекрестной реактивностью с нативными пропептидами эндопептидаз AlpA и AlpV.

Все полученные антитела к эндопептидазе AlpV узнавали только фермент AlpV и не обладали иммуноперекрестной реактивностью по отношению к гомологичной эндопептидазе AlpA и пропептидам.

Все антитела к зрелым формам AlpA и AlpB относились к иммуноглобулинам класса G. Очистку МА к зрелым формам из асцитной жидкости проводили аффинной хроматографией на белок А–агарозе. Содержание иммуноглобулинов в препаратах, оцененное с помощью электрофореза, составляло не менее 95%. $K_{афф}$. МА против AlpA варьировали в пределах от $1,1 \times 10^7$ – $5,5 \times 10^9$ M^{-1} , при этом значения $K_{афф}$ у пяти антител были выше 10^9 M^{-1} . Значения $K_{афф}$ МА против AlpB варьировали от $1,5 \times 10^7$ – $3,2 \times 10^8$ M^{-1} . Значения $K_{афф}$ свидетельствуют о высокой степени связывания полученных МА со зрелыми формами ферментов.

Таким образом, были получены неперекрестные высоко специфические МА, направленные против уникальных эпитопов зрелых форм ферментов AlpA и AlpB, секретируемых *Lysobacter* sp. XL1.

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОПЕПТИДОВ И ЗРЕЛЫХ ФОРМ ЭНДОПЕПТИДАЗ AlpA И AlpB *LYSOBACTER* SP. XL1 НА ОСНОВЕ ПОЛУЧЕННЫХ МА

Для количественного определения содержания молекулярных форм AlpA и AlpB в сложных биологических смесях были разработаны тест–системы в формате «сэндвич»–ИФА на основе МА, полученных в данной работе. При этом аналитические методы для количественного определения ProA, ProB и зрелой формы AlpA разрабатывались для нативной формы, а анализ зрелой формы AlpB – денатурированной.

В основе «сэндвич»–ИФА лежит использование МА к отдаленно расположенным на поверхности белковой глобулы эпитопам, что позволяет антителам одновременно взаимодействовать с молекулой антигена, не препятствуя друг другу. Такой подход дает возможность детектировать искомый белок в многокомпонентных препаратах, таких как клеточные лизаты, препараты клеточных фракций, культуральные жидкости и т.п. (рис. 5).

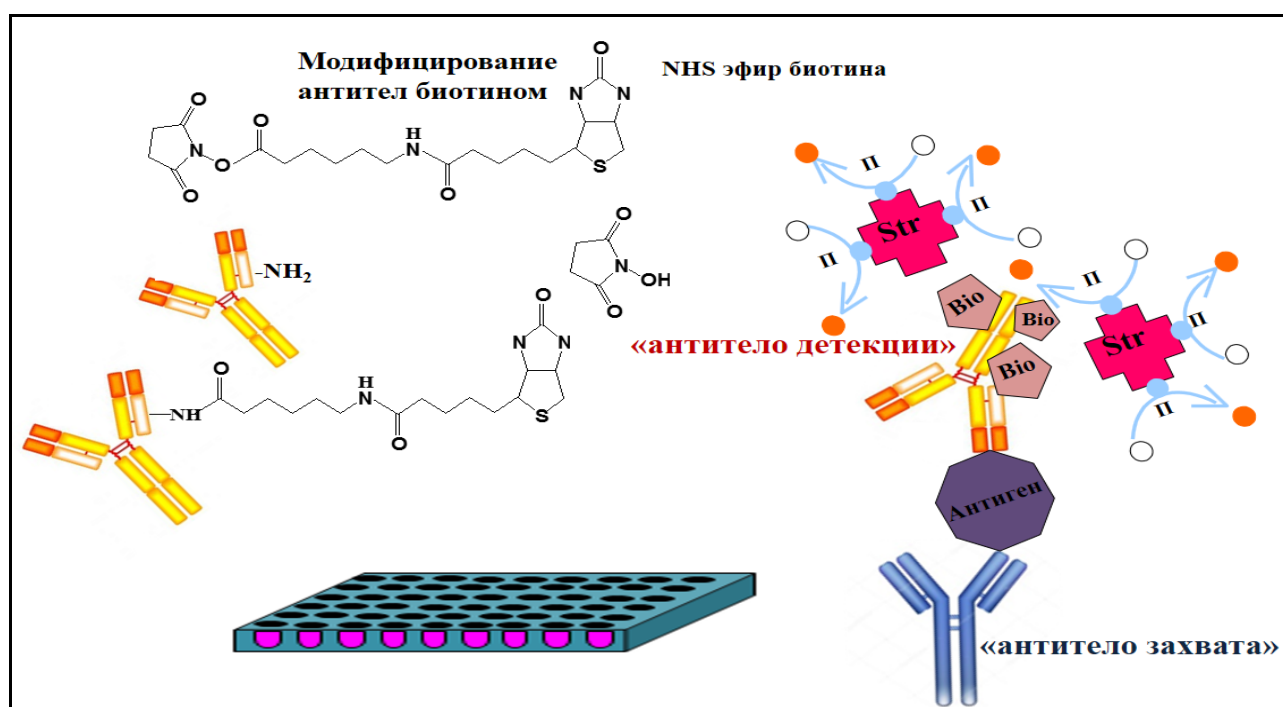


Рис. 5. Схема детекции пропептидов и зрелых форм AlpA и AlpB в биологической смеси методом «сэндвич»–ИФА.

Для создания тест–систем, количественно выявляющих пропептиды и зрелые формы AlpA и AlpB, были проверены все возможные сочетания МА друг с другом, где каждое антитело было использовано как в качестве антитела «захвата» (нижнего), так и в качестве антитела «детекции» (верхнего). В случае разработки тест–системы для определения AlpB в каждом сочетании использовали одно из антител к пептиду №1, а другое – к пептиду №2.

В качестве антител детекции использовали их биотинилированные формы (MAbio). Образовавшиеся в ходе реакции иммунные комплексы выявляли конъюгатом пероксидазы со стрептавидином, взаимодействующим с верхними детектирующими MAbio. Детекцию проводили после обработки растворимым хромогенным субстратом для пероксидазы – *орто*–фенилендиамином с максимумом поглощения при 490 нм. Эффективность детектирующей пары антител по выявлению искомого аналита оценивали по соотношению «сигнал/фон» (отношение оптической плотности в экспериментальных лунках с добавленным антигеном к оптической плотности в лунках без добавления антигена). Пределом детекции считали такую концентрацию аналита, при которой значение оптической плотности A_{490} нм достоверно превышало показатель фоновой оптической плотности тест-системы на два стандартных отклонения.

Разработка тест–систем для количественного определения ProA, ProB и зрелой формы эндопептидазы AlpA

При разработке тест–систем для количественного определения пропептидов и зрелой формы AlpA были проверены: 2 сочетания антител против ProA, 132 – против ProB и 210 – против зрелой формы AlpA. В результате для пропептидов было выявлено 72 пары МА, для которых значение соотношения «сигнал/фон» было больше трех. Для 30 пар МА против AlpA наблюдалось соотношение «сигнал/фон» больше двух. Число возможных перспективных вариантов детектирующих пар сокращалось вследствие высокой неспецифической сорбции некоторых антител при их использовании в качестве «детектирующих».

МА ProA–1 и ProA–2 детектировали антиген в обоих сочетаниях, в которых каждое из антител использовалось как в качестве верхнего («захвата»), так и нижнего («детектирующего»). В качестве «рабочего» сочетания для определения содержания ProA была выбрана «детектирующая пара» ProA–2 + Pro–1bio, которая более эффективно выявляла антиген – до 1,5 нг/мл.

Соотношение «сигнал/фон» у пар антител к ProB варьировало от 3 до 16. Была выбрана пара ProB–1 + ProB–11bio, для которой наблюдались наименьшие фоновые значения, соотношение «сигнал/фон» было наибольшим (16), а предел детекции – 0,2 нг/мл.

Пять детектирующих пар МА выявляли AlpA при соотношении «сигнал/фон» более 17,5, пары AlpA–17 + AlpA–9bio, AlpA–17 + AlpA–11.1bio, AlpA–17 + AlpA–13bio, AlpA–17 + AlpA–14bio выявляли зрелую форму эндопептидазы AlpA вплоть до концентрации 0,4 нг/мл. В качестве инструмента количественного определения фермента AlpA была выбрана пара МА AlpA–18 + AlpA–21bio, для которой наименьшее определяемое значение концентрации AlpA равнялось 0,2 нг/мл.

Для выбранных пар были построены калибровочные графики для определения концентрации пропептидов и зрелой формы эндопептидазы AlpA. Линейные диапазоны составили: для ProA – 1,5 – 100 нг/мл; для ProB – 0,2 – 6,25 нг/мл; для зрелой формы AlpA – 0,2 нг/мл – 3,1 нг/мл. Ошибка измерений при определении ProA и ProB составляла 6,0%, при определении зрелой формы AlpA – 5,0%. Если при использовании тест–системы поглощение A_{490} исследуемого образца превышало область линейного диапазона, то эксперимент повторяли с разбавлением препарата с целью попадания в линейный диапазон для более точного определения.

Разработка тест–системы для количественного определения зрелой формы эндопептидазы AlpB

Было выявлено, что МА, полученные к пептиду №1, взаимодействовали с AlpB при всех подобранных условиях сорбции, а антитела, полученные к пептиду №2, взаимодействовали только с белком, обработанным SDS. Поэтому тест–систему для количественного определения фермента AlpB, возможно было разработать только для определения денатурированной формы белка. Сложные биологические смеси, такие как культуральные жидкости и клеточные лизаты, представляют собой концентрированные белковые растворы, склонные к агрегации, поэтому требуют особых условий денатурации. Применение детергентов, в том числе и SDS, в «сэндвич»–ИФА невозможно, так как внесение их в тест–систему приводит к денатурации не только антигена, но и составляющих тест–систему антител. Денатурация щелочью с последующей нейтрализацией 4 М раствором Трис–HCl, pH 7,0 позволила денатурировать белки в концентрированных растворах без агрегации и внесения детергентов. Ионная сила в нейтральном растворе составила 0,5 М, что уменьшало возможные неспецифические взаимодействия антител и не препятствовало их работе.

Было проанализировано 4 сочетания МА, в каждом из которых одно из антител было к пептиду №1, а другое – к пептиду №2. Для этих пар МА соотношение «сигнал/фон» было одинаковым и равным 11.

Пары МА P1AlpB–6 + P2AlpB–4bio, P1AlpB–6 + P2AlpB–5bio, P1AlpB–6 + P2AlpB–8bio, P1AlpB–6 + P2AlpB–9bio выявляли денатурированный фермент AlpB одинаково вплоть до концентрации 3 нг/мл. Линейный диапазон определения составил 3–100 нг/мл, ошибка измерения – 5%.

Таким образом, разработанные тест–системы на основе МА, позволяют количественно с высокой чувствительностью выявлять пропептиды и зрелые формы внеклеточных эндопептидаз AlpA и AlpB бактерии *Lysobacter* sp. XL1 (Руденко *и др.*, 2014; Karatovskaya *et al.*, 2016).

Данные методы пригодны для количественной оценки содержания ProA, ProB, AlpA и AlpB в клеточных фракциях бактерии, а также в культуральной жидкости при их биотехнологической наработке.

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА МОЛЕКУЛЯРНЫХ ФОРМ AlpA И AlpB LYSOBACTER SP. XL1 В МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ ПРЕПАРАТАХ

Разработанные в формате «сэндвич»–ИФА аналитические методы были применены для количественной оценки содержания пропептидов и зрелых форм эндопептидаз AlpA и AlpB в культуральных жидкостях, клеточных фракциях и в

препарате лизоамидазы. Используемый обычно турбидиметрический метод определения бактериолитической активности в культуральной жидкости или в препаратах лизоамидазы оценивает только суммарный литический эффект, но не позволяет определить содержание конкретного фермента, в отличие от методов, разработанных в данной работе.

Определение молекулярных форм AlpA и AlpB в культуральных жидкостях

Количественное определение содержания пропептидов и зрелых форм ферментов AlpA и AlpB проводили разработанными методами, используя калибровочные графики. Было проведено определение исследуемых молекулярных форм ферментов в клеточных фракциях для 5 биологических экспериментов, каждый из которых характеризовался определенным уровнем литической активности (ЛЕ/мл) и оптической плотностью (A_{540}), что отражало концентрацию бактериальных клеток в культуре. В биологическом эксперименте №1 ($A_{540} - 2,2$, ЛЕ/мл – 4) содержание AlpA в культуральной жидкости после 12 часов культивирования составило 14 ± 1 нг/мл. После 20 часов культивирования, в начале стационарной фазы ($A_{540} - 4,5$, ЛЕ/мл – 140) содержание AlpA в культуральной жидкости составило 410 ± 10 нг/мл (табл. 1) (Руденко и др., 2017).

Так как МА, полученные к AlpB, узнавали только денатурированную форму белка, фермент AlpB в культуральной жидкости не выявлялся в стандартных условиях. Для его выявления оказалось недостаточно обработки только щелочью, потребовалась последовательная обработка кислотой и щелочью. Недоступность AlpB для антител, по-видимому, объясняется тем, что фермент секретируется в составе внешнемембранных везикул (Vasilyeva *et al.*, 2008). Используя данный подход, в культуральной жидкости *Lysobacter* sp. XL1 в биологическом эксперименте №1 было обнаружено 4 ± 1 нг/мл фермента AlpB после 12 часов культивирования и 98 ± 5 нг/мл после 20 часов культивирования.

Очевидно, что концентрация исследуемых ферментов определяется концентрацией бактерии–продуцента, которая пропорциональна оптической плотности культуры. Поэтому после определения концентрации исследуемых молекулярных форм, данные представляли в виде соотношения суммарного количества определяемого белка в данной фракции к суммарному количеству оптических единиц бактериальной суспензии конкретного биологического эксперимента (нг/ A_{540}). Такой способ представления количественных данных по содержанию определяемого белка был использован для всех исследуемых молекулярных форм в клеточных фракциях, результаты представлены в таблице 1. В культуральной жидкости пропептиды не были выявлены, были выявлены зрелые ферменты AlpA и AlpB (Руденко и др., 2017). Повышенный уровень продукции эндопептидазы AlpA по отношению к AlpB соответствует данным о более высоком уровне синтеза мРНК AlpA, чем AlpB в клетках *Lysobacter* sp. XL1 (Lapteva *et al.*, 2012).

Определение содержания ферментов в культуральных жидкостях показало возможность оценки уровня секреции эндопептидаз AlpA и AlpB.

Определение молекулярных форм AlpA и AlpB в клеточных фракциях

Концентрацию пропептидов и зрелых форм эндопептидаз AlpA и AlpB определяли в клеточных фракциях (цитоплазматической, периплазматической и мембранной), полученных из бактериальной культуры после 20 часов культивирования (Руденко *и др.*, 2017).

Как и в случае культуральных жидкостей после определения концентрации соответствующей молекулярной формы по калибровочному графику данные представляли в виде величины нг/А₅₄₀.

В цитоплазматической и мембранной фракциях не было выявлено пропептидов и зрелых форм. Молекулярные формы исследуемых ферментов были обнаружены в периплазматической фракции. Известно, что в периплазме происходит фолдинг и расщепление предшественника в месте соединения пропептида и зрелой формы (Boggs *et al.*, 1996). В таблице 1 обобщены данные по количественному содержанию молекулярных форм в клеточных фракциях (Руденко *и др.*, 2017).

Таблица 1. Содержание пропептидов и зрелых форм ферментов AlpA и AlpB, секретируемых *Lysobacter sp. XL1*, в культуральной жидкости и клеточных фракциях

Название клеточной фракции	ProA, нг/А ₅₄₀	AlpA, нг/А ₅₄₀	ProB, нг/А ₅₄₀	AlpB, нг/А ₅₄₀
Культуральная жидкость	0	96,33±3,89	0	22,84±0,03
Цитоплазма	0	0	0	н.о
Мембраны	0	0	0	0
Периплазма	0,92±0,10	0,07±0,02	0,14±0,05	0,36±0,10

Приведены данные, рассчитанные на единицу оптической плотности культуры при 540 нм (нг/А₅₄₀), трех независимых биологических экспериментов с уровнем литической активности культуры около 140 ЛЕ/мл, н.о – не определяли.

В периплазматической фракции показано повышенное содержание зрелой формы AlpB, по сравнению с AlpA в отличие от их соотношения в культуральной жидкости. Этот факт можно объяснить удержанием AlpB в этом компартменте, что может быть связано с особенностями его секреции. Известно, что AlpB секретируется в окружающую среду посредством везикул (Vasilyeva *et al.*, 2008). AlpA, используя II тип секреции, проходит периплазматическую стадию, довольно быстро, не накапливаясь в периплазме. Повышенное содержание пропептида AlpA, возможно, связано с особенностями его деградации в периплазме, как это показано для α-литической протеазы *L. enzymogenes* (Cunningham *et al.*, 2004). Экспорт зрелой формы AlpA осуществляется настолько быстро, что соответствующий пропептид не успевает деградировать, о чем свидетельствует на порядок более высокое содержание ProA в периплазме, чем содержание зрелой формы фермента.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ФОРМ AlpA И AlpB В КЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЯХ *LYSOBACTER SP. XL1* МЕТОДОМ ИММУНОБЛОТТИНГА

Для определения локализации молекулярных форм ферментов AlpA и AlpB в различных клеточных фракциях также использовали иммуноблоттинг, в котором, исследуемые белки детектировали полученными антителами.

Количество препаратов клеточных фракций, нанесенных на дорожку при электрофоретическом разделении, а также антител, используемых для выявления антигенов, подбирали экспериментально. Для корреляции результатов иммуноблоттинга и «сэндвич»–ИФА количество препаратов, нанесенных на одну дорожку, выражали в единицах оптической плотности бактериальной суспензии (A_{540}).

Полученные в данной работе МА против ProA, ProB и зрелой формы AlpB взаимодействовали с денатурированными антигенами, в отличие от конформационных МА к зрелой форме AlpA. Поэтому для иммуноблоттинга были получены поликлональные антитела к денатурированному ферменту AlpA (Руденко и др., 2017).

На рисунке 6 представлены результаты иммуноблоттинга, в виде фотографий рентгеновских пленок с белковыми полосами, окрашенными антителами против пропептидов и зрелых форм AlpA и AlpB.

В цитоплазматической фракции обнаружены предшественники AlpA и AlpB, что соответствует локализации белкового синтеза в этом компартменте бактериальной клетки. Предшественники окрашивались антителами как против зрелых форм ферментов, так и против пропептидов. Для AlpA использовали поликлональные антитела мыши к денатурированному ферменту и ProA–1. Для AlpB – P2AlpB–8 и ProB–10 (Рис. 6).

В мембранной фракции молекулярные формы AlpA и AlpB не выявлялись, также, как и в «сэндвич»–ИФА (рис. 6, табл.1).

При анализе периплазматической фракции с помощью антител против денатурированной формы AlpA выявлена только зрелая форма фермента. МА против ProA выявили в периплазматической фракции пропептид и белковые фрагменты более низкого молекулярного веса. Что касается AlpB, в периплазматической фракции *Lysobacter* sp. XL1 обнаружены предшественник и зрелая форма (детекция МА P2AlpB–8). Иммуноблоттинг с использованием МА ProB–10 подтвердил наличие предшественника и продемонстрировал наличие ProB (рис. 6).

В культуральной жидкости иммуноблоттингом идентифицированы только зрелые формы ферментов.

Таким образом, иммуноблоттинг позволил определить локализацию предшественников, которые были выявлены в цитоплазматической фракции, а PreAlpB и в периплазме. Иммуноблоттингом и количественным «сэндвич»–ИФА показаны следующие согласующиеся результаты: а) наличие зрелых форм ферментов AlpA и AlpB в периплазме и культуральной жидкости, б) отсутствие зрелых форм ферментов AlpA и AlpB в мембранной и цитоплазматической фракциях, в) наличие ProA и ProB в периплазме, г) отсутствие ProA и ProB в культуральной жидкости, цитоплазматической и мембранной фракциях (рис. 6).

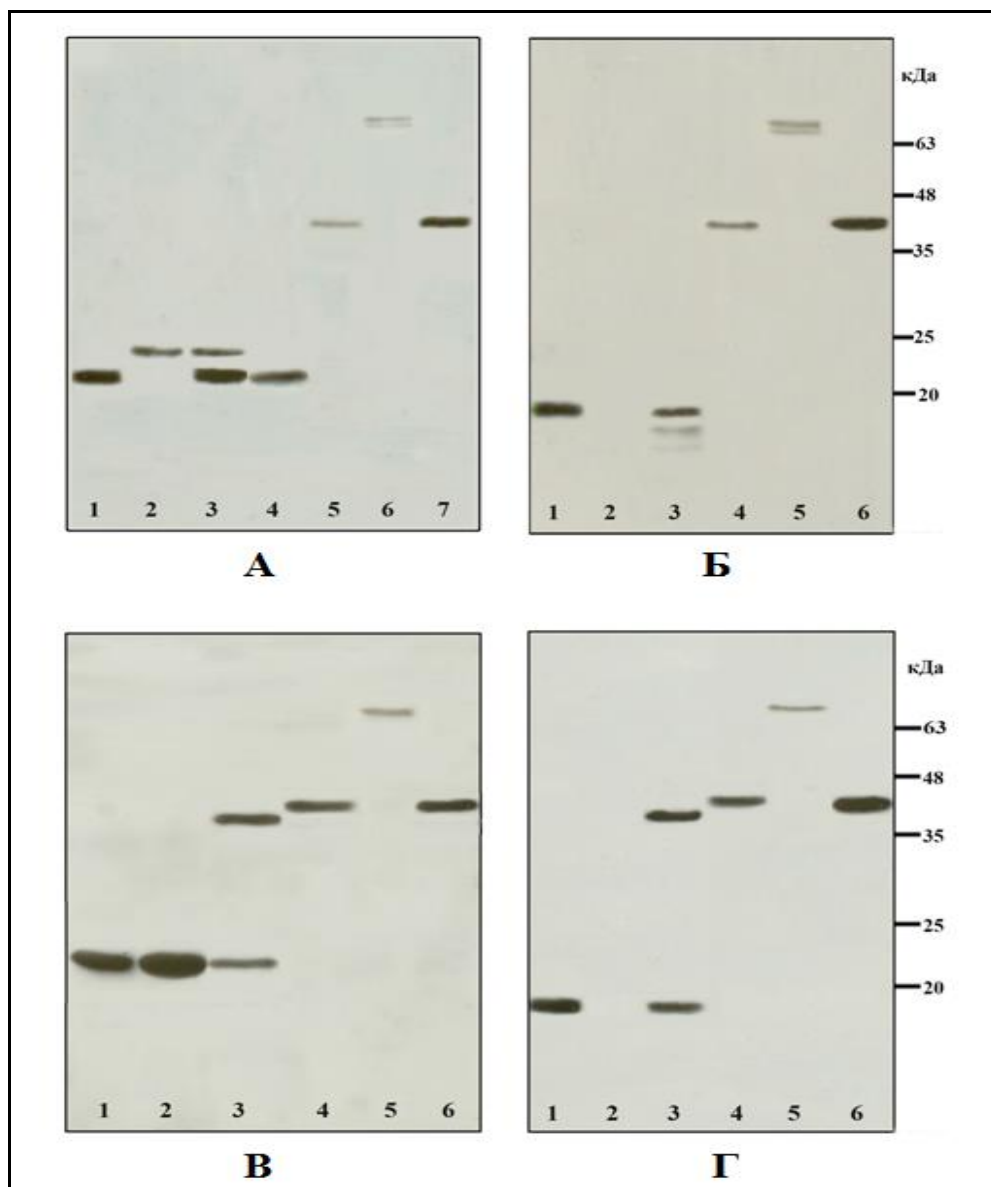


Рис. 6. Иммуноблоттинг клеточных фракций *Lysobacter* sp. XL1: **А)** с использованием поликлональных антител мыши против денатурированного AlpA. **1** – AlpA (10 нг), **2** – AlpB (10 нг), **3** – культуральная жидкость (аликвота, соответствующая 0,08 A_{540}), **4** – периплазматическая фракция (20 A_{540}); **5** – цитоплазматическая фракция (2 A_{540}), **6** – мембранная фракция (10 A_{540}), **7** – PreAlpA (10 нг); **Б)** с использованием МА ProA-1 против ProA. **1** – ProA (10 нг), **2** – культуральная жидкость (0,08 A_{540}), **3** – периплазматическая фракция (3 A_{540}), **4** – цитоплазматическая фракция (2 A_{540}), **5** – мембранная фракция (10 A_{540}), **6** – PreAlpA (10 нг); **В)** с использованием МА P2AlpB-8 против AlpB. **1** – AlpB (1 нг), **2** – культуральная жидкость (0,08 A_{540}), **3** – периплазматическая фракция (4 A_{540}), **4** – цитоплазматическая фракция (1 A_{540}), **5** – мембранная фракция (10 A_{540}), **6** – PreAlpB (1 нг); **Г)** с использованием МА ProB-10 против ProB. **1** – ProB (10 нг), **2** – культуральная жидкость (0,08 A_{540}), **3** – периплазматическая фракция (30 A_{540}), **4** – цитоплазматическая фракция (3 A_{540}), **5** – мембранная фракция (10 A_{540}), **6** – PreAlpB (10 нг).

Количество препаратов клеточных фракций, нанесенных на дорожку при электрофоретическом разделении, выражали в единицах оптической плотности бактериальной суспензии (A_{540}).

На основании полученных результатов составлена схема, представленная на рисунке 7, на которой отображено распределение молекулярных форм ферментов AlpA и AlpB внутри и за пределами клетки. Показано, что клетки *Lysobacter* sp. XL1 в ранней стационарной фазе роста продуцируют гораздо больше зрелой формы AlpA, чем AlpB. Фермент AlpB накапливается в периплазматическом пространстве перед дальнейшим экспортом в окружающее пространство в составе внешнеплазматических везикул. Эндопептидаза AlpA секретируется, не задерживаясь в периплазме. Показано, что окончательное созревание исследуемых ферментов происходит в периплазме, за пределы клетки попадают только зрелые формы ферментов без пропептидов. Полученные результаты согласуются с описанными способами секреции: фермент AlpA непосредственно транслоцируется через внешнюю мембрану, AlpB – с помощью внешнеплазматических везикул.

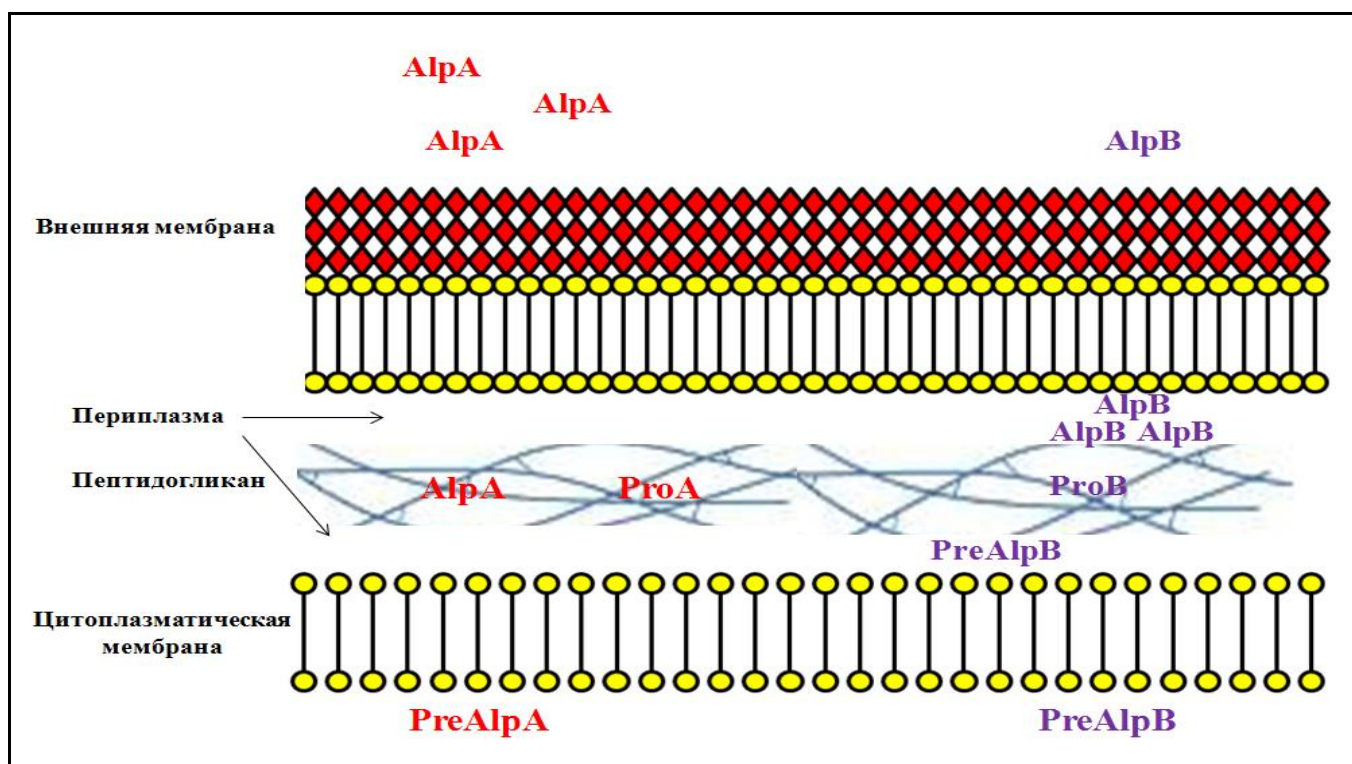


Рис. 7. Локализация молекулярных форм литических эндопептидаз AlpA и AlpB *Lysobacter* sp. XL1.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ AlpA И AlpB В ЛИЗОАМИДАЗЕ

Литическая активность антимикробного препарата лизоамидаза обусловлена бактериолитическими ферментами различной специфичности (эндопептидазы – AlpA, AlpB, Л4; амидаза – Л2; и мурамидаза – Л3), секретируемыми *Lysobacter* sp. XL1 (Степная и др., 1992, 1996а, 1996б, 2005; Vasilyeva *et al.*, 2014). Состав препарата лизоамидаза непостоянен и зависит от многих факторов, например, качественного и количественного состава компонентов питательной среды. При его производстве в промышленных масштабах необходима стандартизация. Определить содержание каждого из ферментов по измерению литической активности культуральной жидкости невозможно, так как при этом измеряется общая бактериолитическая активность, в которую вносит вклад каждый из ферментов. Оценка содержания

фермента по результатам его очистки очень сложна. Данная задача легко решается с помощью разработанных в данной работе методов на основе МА.

Метод «сэндвич»–ИФА на основе полученных МА был использован для количественного анализа ферментов AlpA и AlpB в препарате лизоамидаза. Подготовка проб для этих анализов проходила без каких–либо дополнительных манипуляций. Непосредственно перед использованием сухой порошок препарата лизоамидазы в случае измерения концентрации AlpA растворяли в PBST, в случае AlpB – в 0,16 М NaOH, PBST. В одном миллиграмме сухого образца препарата лизоамидазы, содержание AlpA составляло $4,66 \pm 0,23$ мкг, а содержание AlpB – $1,43 \pm 0,07$ мкг. Таким образом, была продемонстрирована пригодность разработанных тест–систем для количественного определения исследуемых ферментов в препарате лизоамидаза.

ВЫВОДЫ

1. Получены неперекрестные моноклональные антитела к пропептидам и зрелым формам эндопептидаз AlpA и AlpB, секретируемых *Lysobacter* sp. XL1: 2 против ProA, 12 против ProB, 15 против зрелой формы AlpA, 5 против зрелой формы AlpB. Для получения моноклональных антител к AlpB использовали пептиды, первичная структура которых максимально отличалась от AlpA.
2. На основе полученных моноклональных антител разработаны тест-системы в формате «сэндвич»–ИФА для количественного определения молекулярных форм эндопептидаз AlpA и AlpB.
3. Детекция иммуноблоттингом и количественный «сэндвич»–ИФА показали распределение молекулярных форм AlpA и AlpB в компартментах бактериальной клетки. AlpA секретируется, не задерживаясь в периплазматическом пространстве, AlpB накапливается в периплазме для секреции в составе внешнемембранных везикул. Полученные результаты свидетельствуют о том, что окончательное созревание исследуемых ферментов происходит в периплазме, за пределы клетки попадают только зрелые формы ферментов без пропептидов. В культуральной жидкости показан повышенный уровень продукции AlpA по сравнению с AlpB.
4. Проведена оценка количественного содержания индивидуальных ферментов AlpA и AlpB в антимикробном препарате лизоамидаза с целью его стандартизации.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых журналах:

1. Руденко Н.В., Цфасман И.М., Латыпов О.Р., Ледова Л.А., Красовская Л.А., Каратовская А.П., Бровко Ф.А., Васильева Н.В., Степная О.А. Определение пропептидов литических эндопептидаз AlpA и AlpB *Lysobacter* sp. XL1 методом сэндвич–иммуноферментного анализа на основе моноклональных антител // *Биоорганическая химия*. – 2014. – Т.40. – № 3. – с.297 – 304.
2. Karatovskaya A.P., Rudenko N.V., Tsfasman I.M., Guseva K.A., Laman A.G., Boziev K.M., Brovko F.A., Vasilyeva N.V. Development of a method for the quantitation of homologous endopeptidases AlpA and AlpB from *Lysobacter* sp. XL1 // *Process Biochem.* – 2016. – V.51. – p.1521 – 1526.

3. Руденко Н.В., Каратовская А.П., Цфасман И.М., Бровко Ф.А., Васильева Н.В. Иммунохимическое определение внутри и внеклеточной локализации молекулярных форм литических эндопептидаз AlpA и AlpB *Lysobacter* sp. XL1 // *Биоорганическая химия*. – 2017. – Т.43. – № 5. – с.501 – 506.

Материалы научных конференций и тезисы докладов:

1. Каратовская А.П., Руденко Н.В., Цфасман И.М., Красовская Л.А., Васильева Н.В. Иммунохимическое определение эндопептидазы AlpA, секретируемой *Lysobacter* sp. XL1 // *Материалы Всероссийской конференции с элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология – 2013»*. – 2013. – Тула (Россия). – с.10.
2. Каратовская А.П., Чемерисова В.Н., Васильева Н.В., Красовская Л.А., Цфасман И.М., Степная О.А., Руденко Н.В. Получение и характеристика моноклональных антител к зрелой форме эндопептидазы AlpA, секретируемой *Lysobacter* sp. XL1 // *XXV зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии»*. – 2013. – Москва (Россия). – Т.1. – с.56.
3. Каратовская А.П., Руденко Н.В., Цфасман И.М., Гусева К.А., Бровко Ф.А., Васильева Н.В. Разработка тест–системы в формате сэндвич–иммуоферментного анализа на основе моноклональных антител для количественного определения эндопептидазы Л1, секретируемой *Lysobacter* sp. XL1 // *Всероссийская конференция с элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология – 2014»*. – 2014. – Тула (Россия). – с.18.
4. Каратовская А.П. Иммунохимическая стандартизация лизоамидазы – антимикробного препарата нового поколения // *Седьмая региональная научно-практическая конференция «Молодежные научно–инновационные проекты Московской области»*. – 2014. – п. Дубровицы (Россия). – с.55.
5. Каратовская А.П., Н.В. Руденко, И.М. Цфасман, К.А. Гусева, Ф.А. Бровко, Н.В. Васильева. Иммунохимическое определение внеклеточной эндопептидазы Л1 *Lysobacter* sp. XL1 // *XXVII зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии»*. – 2015. – Москва (Россия). – с.60.
6. Каратовская А.П., Руденко Н.В., Цфасман И.М., Ламан А.Г., Бровко Ф.А., Васильева Н.В. Разработка метода иммунохимического определения эндопептидазы Л5 *Lysobacter* sp. XL1 на основе моноклональных антител // *19 Международная Пушинская школа – конференция молодых ученых – Биология наука XXI века*. – 2015. – Пущино (Россия). – с.133.
7. Каратовская А.П., Руденко Н.В., Цфасман И.М., Ламан А.Г., Гусева К.А., Бровко Ф.А., Васильева Н.В. Количественное определение высоко гомологичных эндопептидаз AlpA и AlpB *Lysobacter* sp. XL1 на основе моноклональных антител // *Всероссийская конференция с элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология – 2015»*. – 2015. – Тула (Россия). – с.15.
8. Каратовская А.П., Руденко Н.В., Цфасман И.М., Ламан А.Г., Гусева К.А., Бровко Ф.А., Васильева Н.В. Метод сэндвич–иммуоферментного анализа на основе моноклональных антител для оценки продукции фермента AlpB бактерией *Lysobacter* sp. XL1 // *XXVIII зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико–химической биологии и биотехнологии»*. – 2016. – Москва (Россия). – с.47.