Національна академія наук України
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України

Одержання та застосування протеїнів для діагностики і лікування інфекційних та неінфекційних захворювань

робота, що представляється на здобуття Премії Президента України
для молодих вчених в 2024 році

Автори:

н.с. відділу структури та функції білка, доктор філософії **Євгеній СТОГНІЙ**;

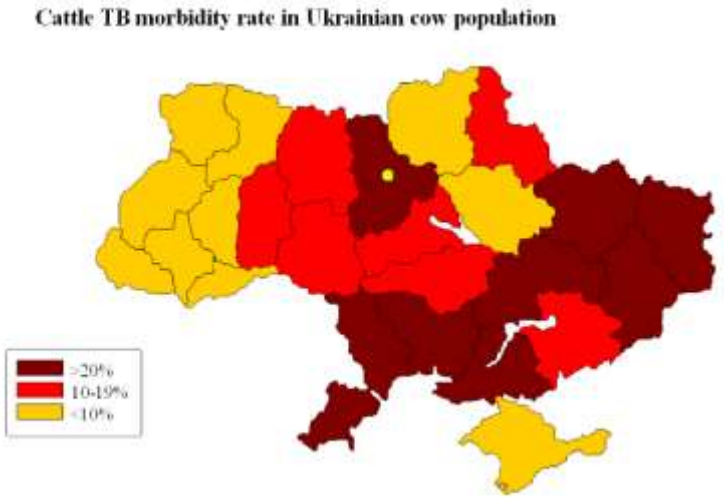
н.с. відділу молекулярної імунології, к.біол.н. **Андрій СІРОМОЛОТ**

Київ 2024

Актуальність

1

2

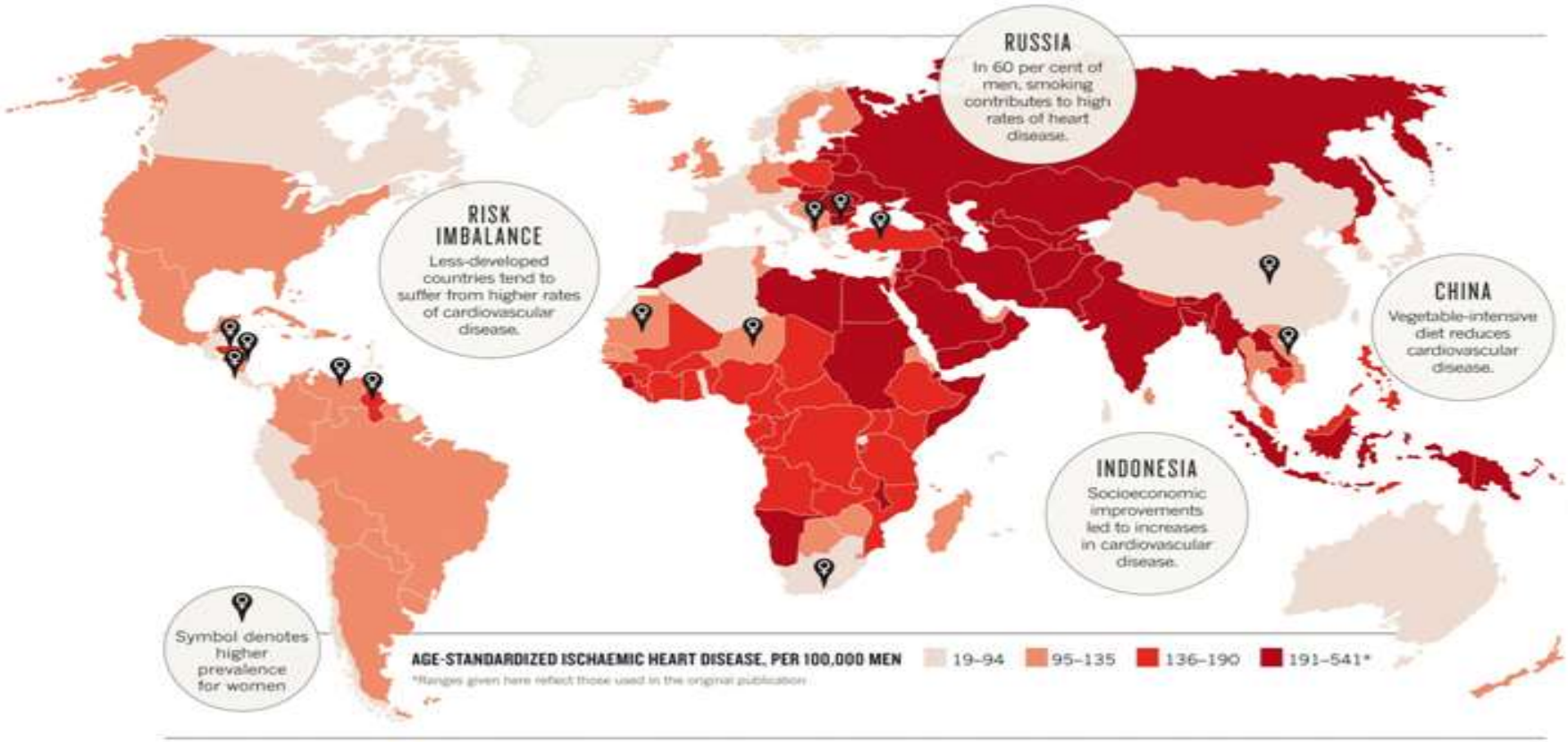


Джерела: 1 - ЦГЗ при МОЗ України, 2023;
2 - Song S, et al., 2022; Redchuk et al., 2010

Кількість ССЗ в світі склала 523 мільйонів у 2019 році

Кількість смертей від ССЗ склала 18,6 мільйона у 2019 р
(64,3 % від загальної)

Перші місця серед ССЗ займають порушення гемостазу тромботичної природи



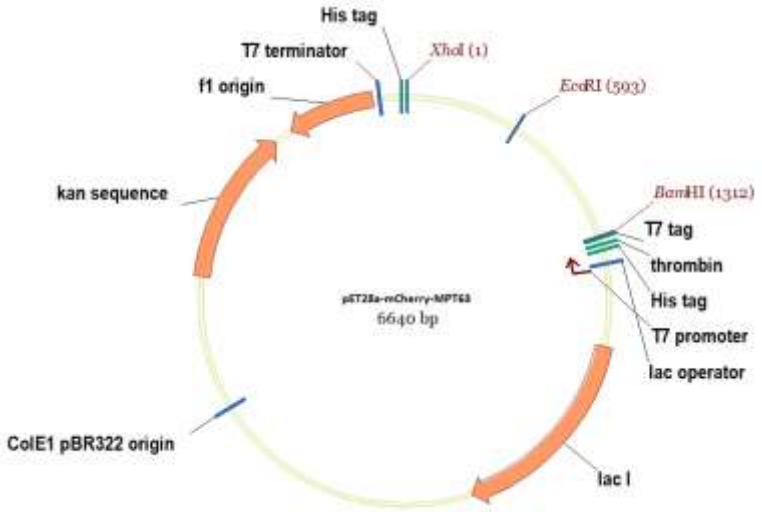
Nature, 2017

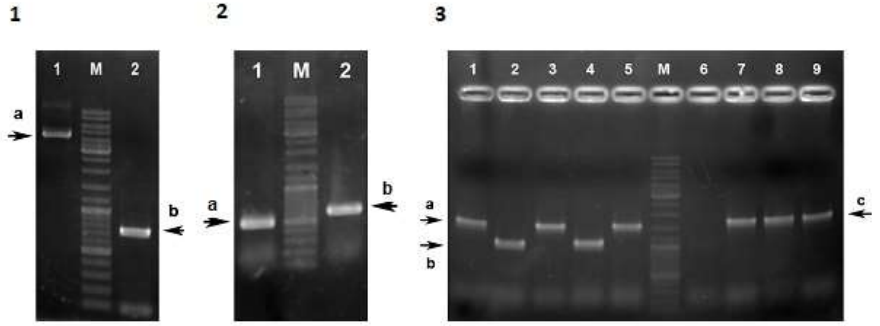
Мета роботи:

Одержання панелі рекомбінантних аналогів антигенів мікобактерій та виділення біологічно активних ензимів з культуральних рідини мікроорганізмів, грибів та отрут тварин для створення тест-систем для діагностики туберкульозу людської популяції і поголів'я ВРХ та розробки підходів корекції патологічних станів асоційованих із неклітинними компонентами системи гемостазу.

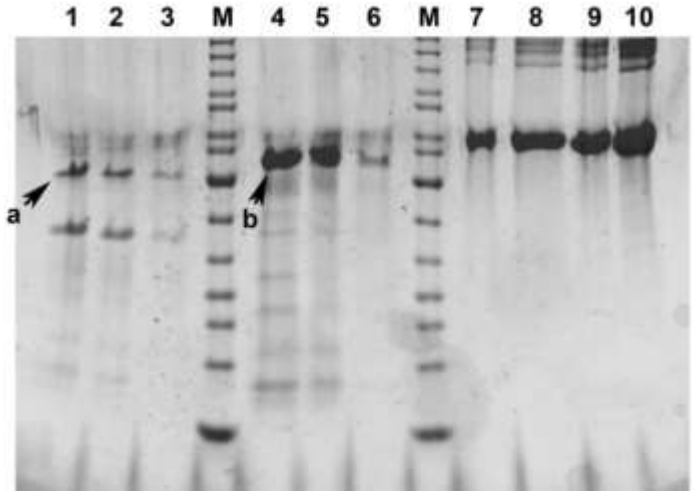
1. Одержати генетичні конструкції на основі прокаріотичних експресійних векторів для отримання рекомбінантних аналогів мікобактеріальних антигенів та химерного протеїну МРТ83-МРТ63; оптимізувати умови експресії, виділення та очищення рекомбінантних протеїнів *M.tuberculosis complex*.
2. Розробити та випробувати прототипи імуноензимних тест-систем «ІВ-Chem Anti-*Mycobacterium tuberculosis*» та «ІВ-Chem Anti-*Mycobacterium bovis*» для визначення рівня антитіл до *M.tuberculosis/M.bovis* з метою скринінгу людської популяції та поголів'я худоби.
3. Провести скринінг протеїназ різного походження, які мають фібриногеназну активність. Охарактеризувати специфічність та визначити місця гідролітичної дії досліджуваних протеїназ на молекулу фібриногену.
4. Дослідити ефективність дії отриманих протеїназ на молекулу фібриногнеу та охарактеризувати можливість використання досліджуваних ензимів як антитромботичних засобів.

Одержання генетичних конструктів та виділення рекомбінантних протеїнів

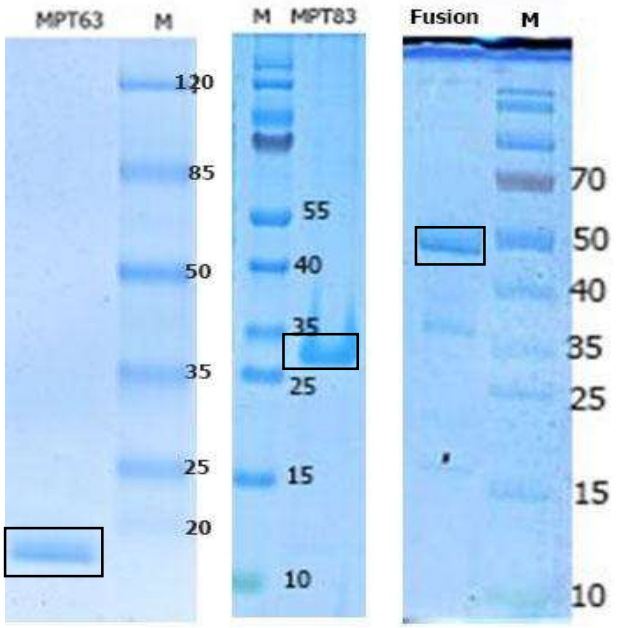




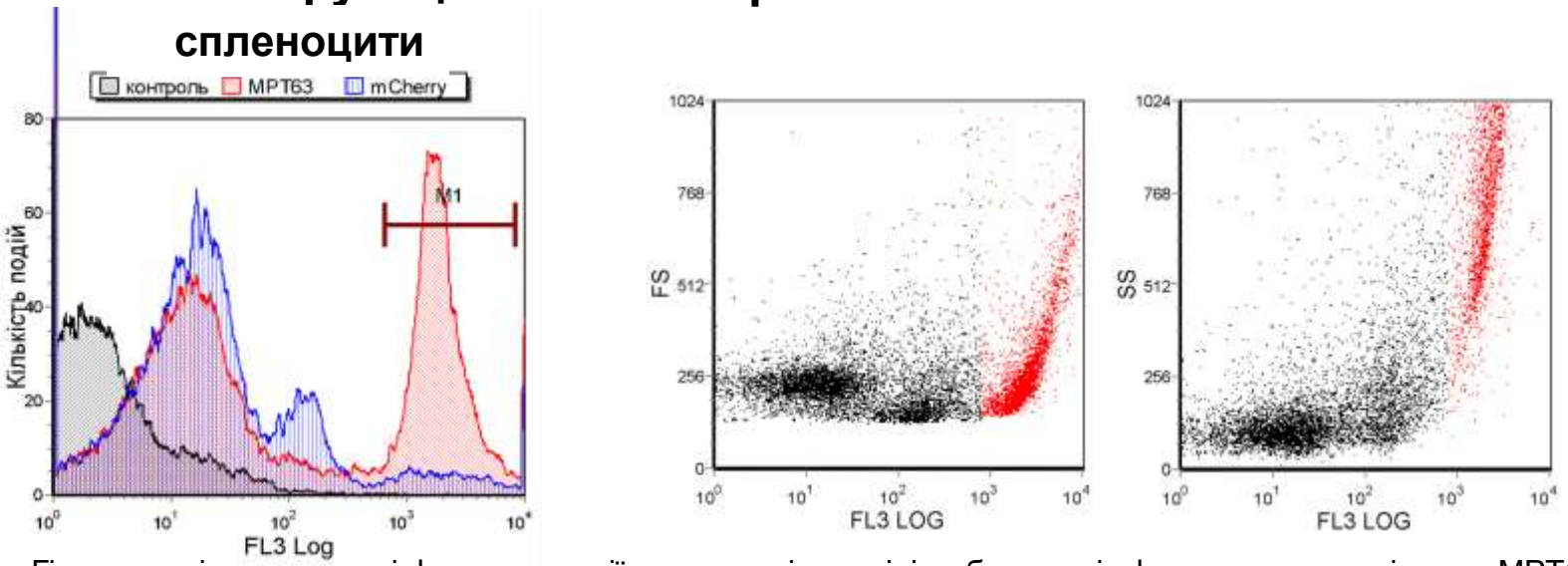
Електрофореграма виділеної плазмідної ДНК *pET28a* (А,1а) та продуктів ампліфікації генів *mcherry* (А,2b), *mpt63* (Б, 2а) і *mpt83* (Б, 2b) та ПЛР-продуктів клонів-продуцентів (В). М – маркери молекулярної маси, п.н.



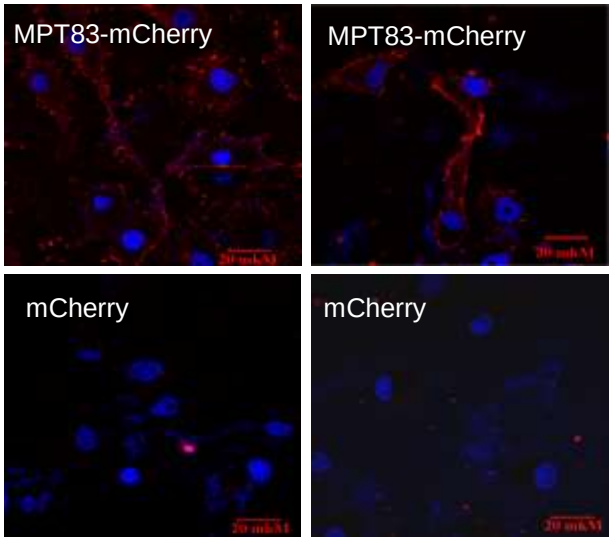
Електрофореграма фракцій елюату mCherry-MPT63 (1, 2, 3) та mCherry-MPT83(4, 5, 6)



Пошук клітин-мішеней MPT63 та MPT83 та дослідження ефекторних функцій мікобактеріальних антигенів



Гістограма інтенсивності флуоресценції спленоцитів миші, інкубованих із флуоресцентно міченим MPT63



Конфокальна мікроскопія препаратів клітин лінії U2149, інкубованих з mCherry-MPT83 та mCherry

	інтактні клітини (контроль)	mCherry	MPT63	MPT83
Макрофаги + *E.coli*-EGFP	10,5 ± 1,1	10,9 ± 0,79	19,1 ± 1,62*#	19,8 ± 2,1 *#
CD11b +	31,5 ± 0,95%	33,2 ± 1,2%	47,5 ± 3,7*# %	40,7 ± 1,9*# %
F4/80 +	51,7 ± 0,55%	52,1 ± 1,1 %	60,4 ± 1,5*# %	59,7 ± 1,15*# %

Вплив MPT63 та MPT83 на ендоцитоз, активацію і дозрівання макрофагів.

Примітка: *P<0,05 у порівнянні з інтактними клітинами; #P<0,05 у порівнянні із стимульованими mCherry

Наукова новизна

Створення унікального імуносорбенту для діагностики туберкульозу на основі високоімуногенних протеїнів *M.tuberculosis*

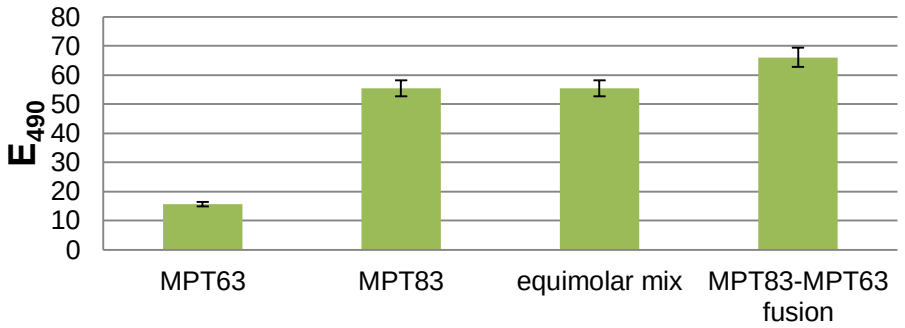
MPT83, ліпопротеїн, асоційований з клітинною стінкою мікобактерій

Методи клонування рекомбінантної ДНК

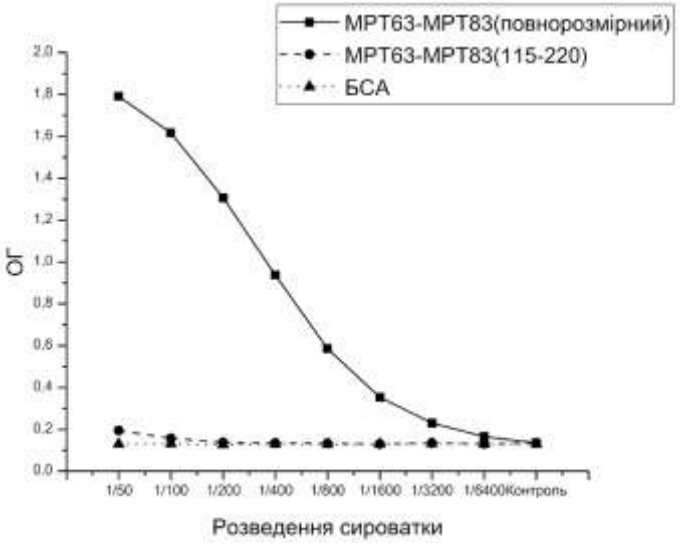
MPT63, секреторний протеїн мікобактерій

Дослідження гуморальної відповіді до антигенів *Mycobacterium spp.* та їх комбінацій

Індекс оптичної щільності (ODI) для кожної антигенної субстанції



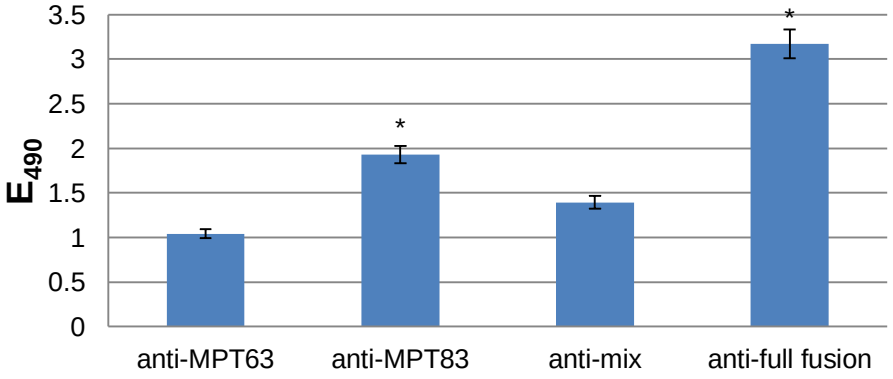
Тип імуносорбенту; розведення відповідної сироватки 1:16 000



$$ODI=OD_{(postimmunization)}/OD_{(preimmunization)}$$

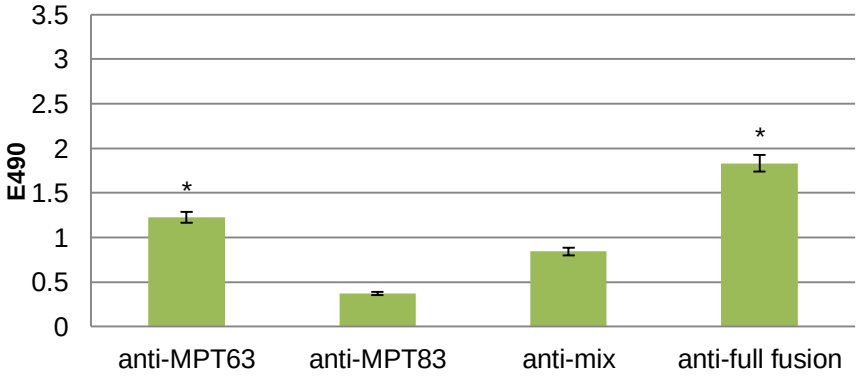
Результати розпізнавання злитих протеїнів моноклональними антитілами до N-кінцевої ділянки MPT83 та MPT70

антиген - MPT83(full)-MPT63



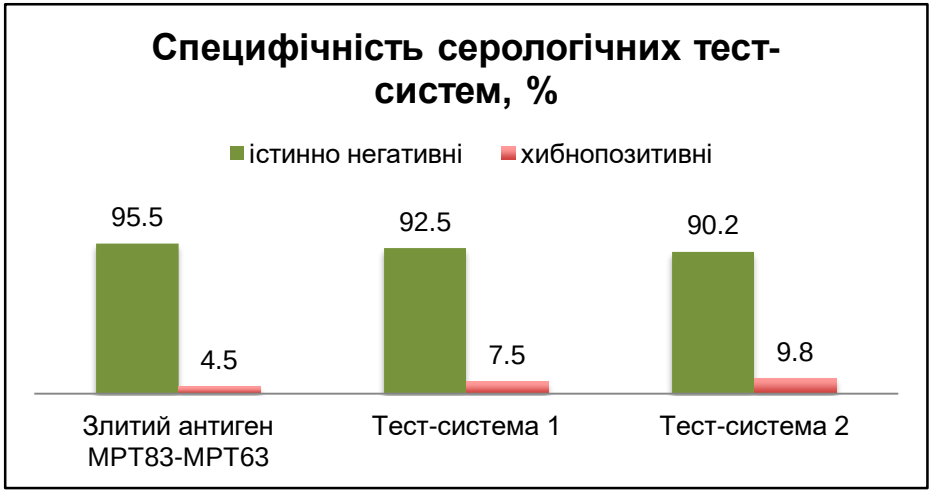
Тип антисироватки, розведення 1:16 000

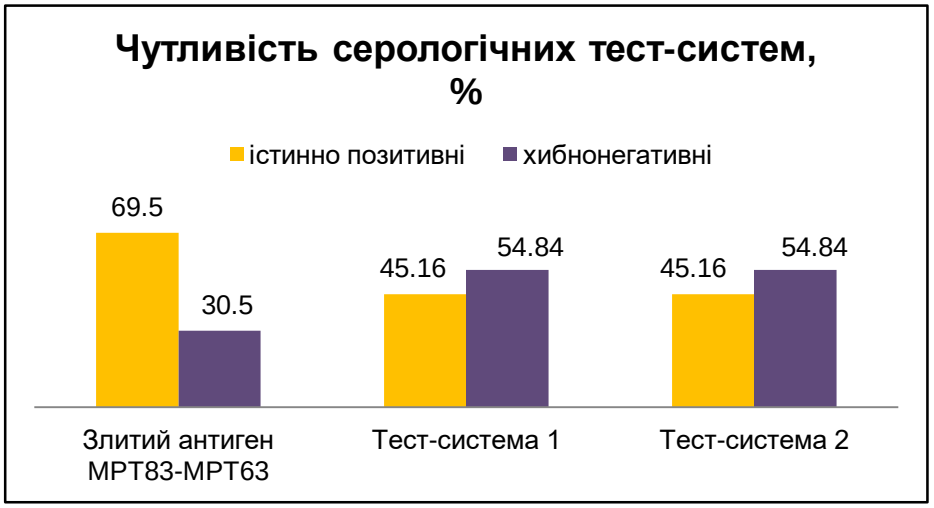
антиген - MPT83($FLD_{115-220}$)-MPT63



Тип антисироватки, розведення 1:16 000

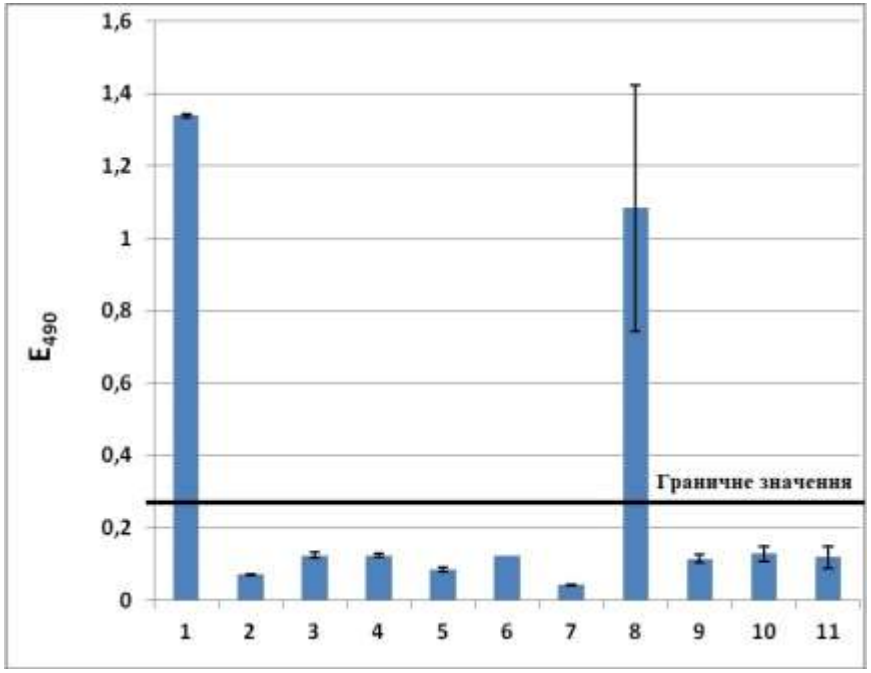
Випробування промислового зразка тест-систем для діагностики ТБ у населення “IB-Chem *Anti-Mycobacterium tuberculosis*”





УКРАЇНА (19) UA (11) 118447 (13) U
(19) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ
UA 118447 U

Випробування промислового зразка тест-систем для діагностики ТБ у ВРХ “ІВ-Chem Anti-*Mycobacterium bovis*”



Рівень IgG до цільового антигену МРТ63-МРТ83(115-220): 1 – позитивний контроль; 2 – негативний контроль; 3 – *M.intracellulare*-інфіковані; 4 – *M.fortuitum*-інфіковані; 5 – *M.avium*-інфіковані; 6 – *M.kansasii*-іфніковані; 7 – *M.paratuberculosis*-інфіковані; 8 – *M.bovis*-інфіковані; 9 – негативно реагуючі на туберкулін і реакцію імунодифузії (РІД); 10 – позитивно реагуючі на туберкулін для птиці (діагноз туберкульоз не підтверджений); 11 – РІД-позитивні тварини

Результати впровадження (прикладне значення) наукової роботи щодо діагностики туберкульозу

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ
ДУ "ІНСТИТУТ МЕДИЦИНИ ПРАЦІ НАМН УКРАЇНИ"
01033, м. Київ-33, вул. Саксаганського, 75

ЗВІТ № 2447

при проведенні науково-дослідної роботи для потреб державної санітарно-епідеміологічної експертизи документації: ТУ У 21.2-05417288-004:2016 «Тест-система імуноферментна для виявлення антитіл до Mycobacterium tuberculosis»

Санітарно-епідеміологічна експертиза проведена на замовлення Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Україна, 01601, м. Київ, вул. Леонтовича, 9, тел. (044) 234-16-53, www.biochemistry.org.ua, код за ЄДРПОУ 05417288

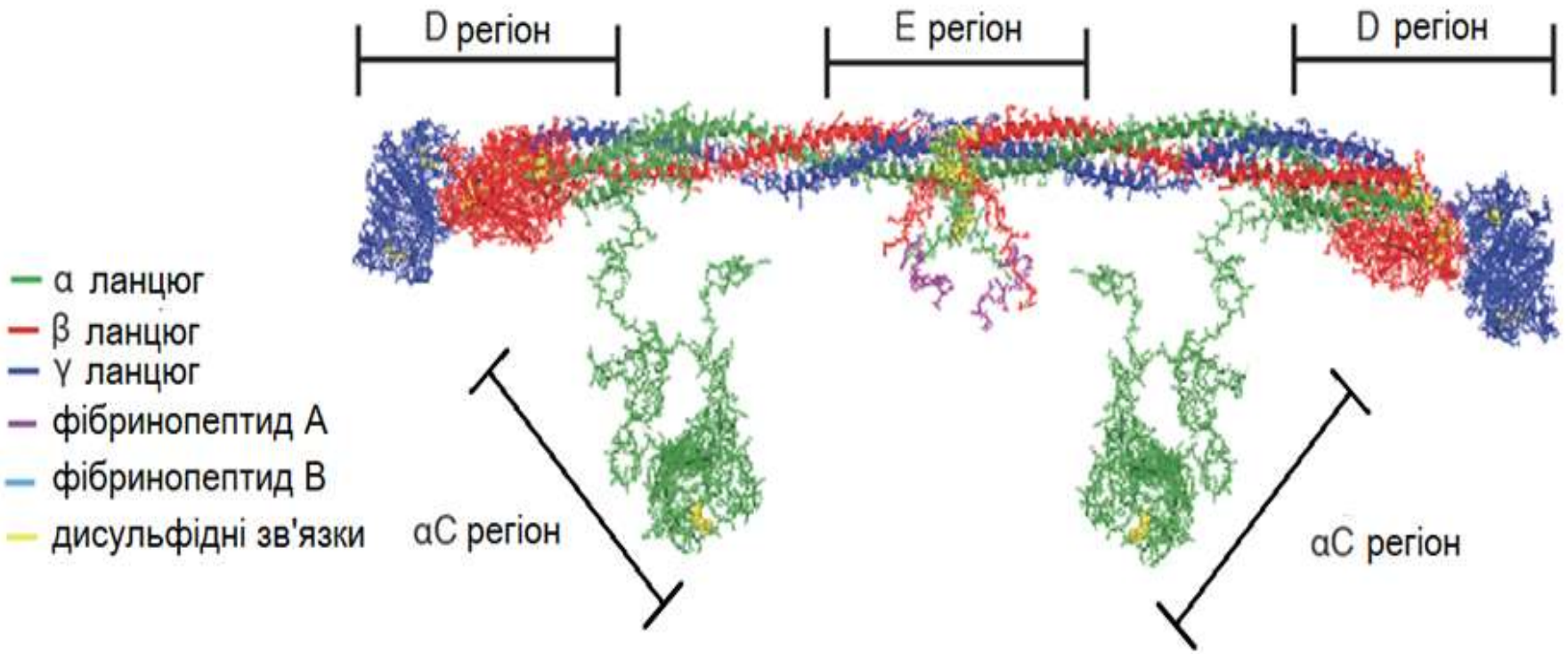
На розгляд подані (в копіях):

4. Заява.
5. Лист-направлення Держпродспоживслужби № 602-123-14/18771 від 04.11.2016 року.
6. Технічні умови ТУ У 21.2-05417288-004:2016 «Тест-система імуноферментна для виявлення антитіл до Mycobacterium tuberculosis»
4. Пояснювальна записка до Технічних умов.
5. Сертифікат якості на сировину та матеріали.
6. Опис технології виготовлення

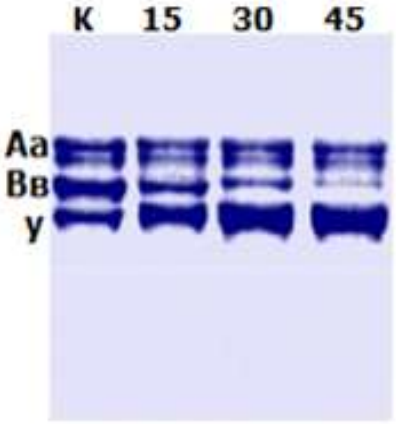
При проведені санітарно-епідеміологічної оцінки констатовано наступне:

1. Технічні умови 21.2-05417288-004:2016 «Тест-система імуноферментна для виявлення антитіл до Mycobacterium tuberculosis» розроблені Інститутом біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України.

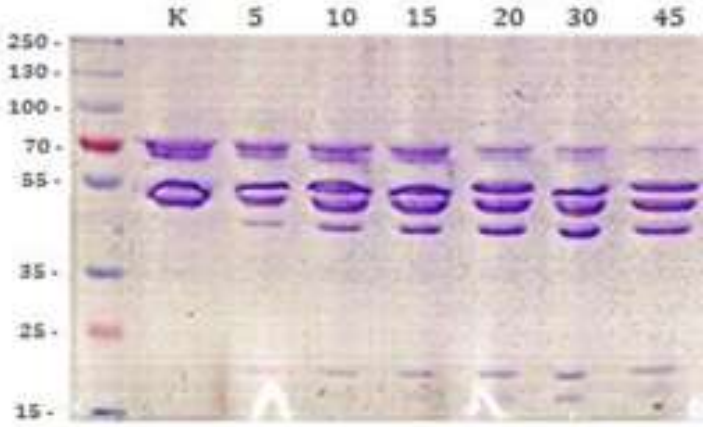
Молекула фібриногену



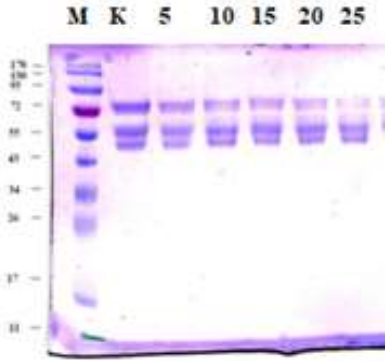
Досліджено чотири протеїнази, які здатні гідролізувати молекулу фібриногену



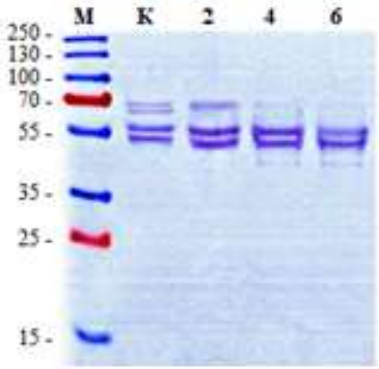
Електрофореграма продуктів гідролізу фібриногену протеїназою з отрути *Echis multisquamatis*.



Електрофореграма продуктів гідролізу фібриногену протеїназою з отрути *G. halys halys.*



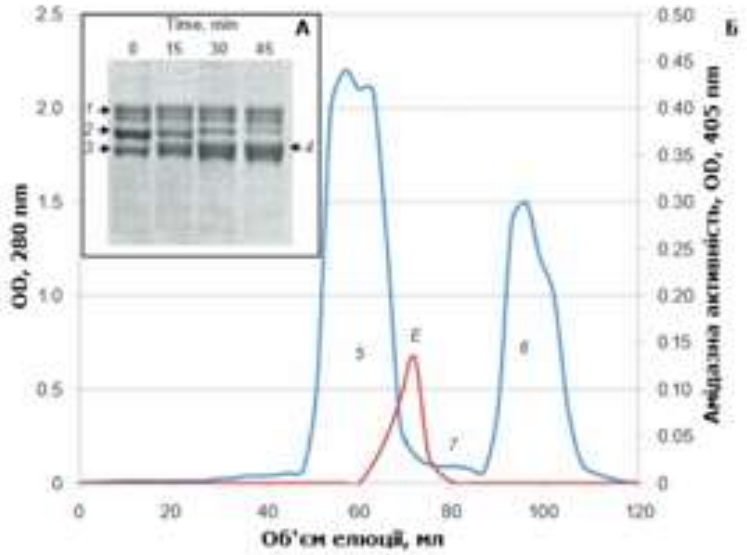
Електрофореграма фібриногену гідролізованого протеїназою з культурального середовища *Bacillus thuringiensis*

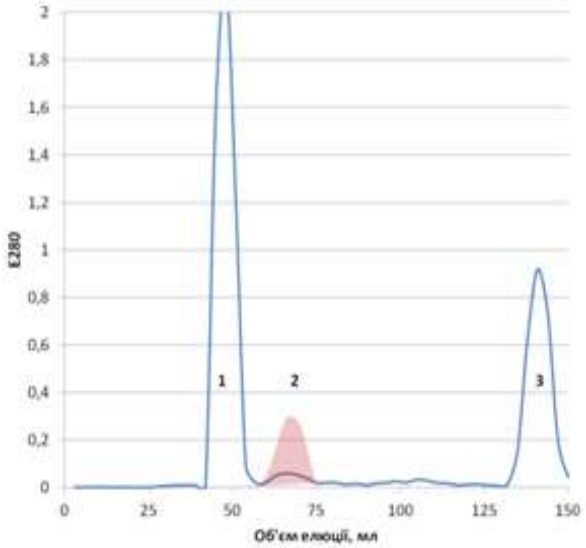


Електрофорема розділення продуктів гідролізу фібриногену за умов інкубації нативної молекули з протеїназою з культуральної рідини *P. ostreatus*

Отрмання частково гідролізованих форм фібриногену

Форми фібриногену desBβ1-42 та фібриногену desAα414-610 отримували за допомогою хроматографії що розділяє за розмірами



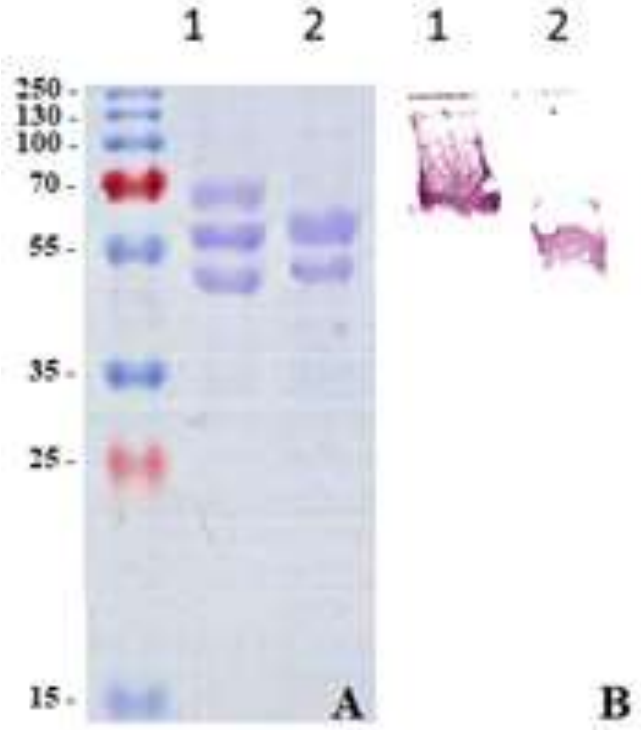


Фібриноген, розщеплений мг/мл протеїназою з отрути E. multisquamatis. А – SDS-PAGE фібриногену, розщепленого протеїназою перед і після 15, 30 і 45 хв інкубації. Б – Елюція фібриногену з колонки Superdex G-75 після інкубації з ферментом. Фракції: 5 – усічений фібриноген; 6 – бензамідин; 7 – пептидна зона; E – фермент; OD – оптична густина.

Хроматографічне розділення гідролізату фібриногену, отриманого за дії фібриногенолітичног ензиму з отрути *G. halys halys*, за допомогою Superdex G-75. 1 – зона елюції фібриногену; 2 – пік виходу пептиду Aα414- 610 та зона активності ензиму з фібриногенолітичною активністю; 3 – зона елюції бензамідину.

Отрмання частково гідролізованих форм фібриногену

Форму фібриногену desAα505-610 отримували висолюванням сульфатом натрію



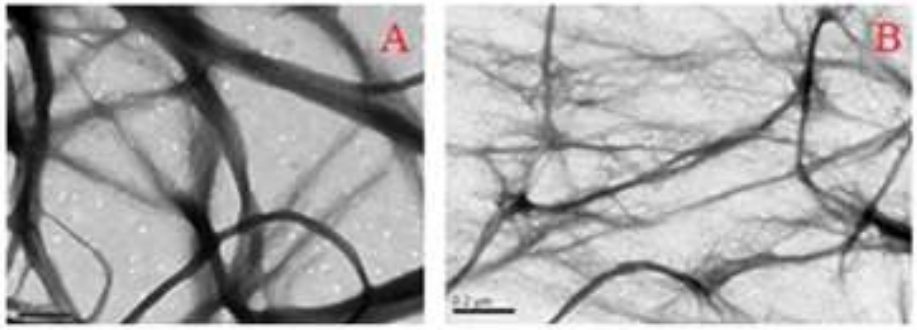
Електрофореграма (А) та блотограма (В) нативного фібриногену (1) та desAα505-610 фібриногену (2). Зразки аналізували за присутності 0,2% β-меркаптоетанолу, вестерн-блот аналіз проводили з використанням моноклональних антитіл до ділянки фібриногену Aα 20-78 (В).

Полімеризація фібрину за дії різних протеїназ

Фібриноген desBβ1-42

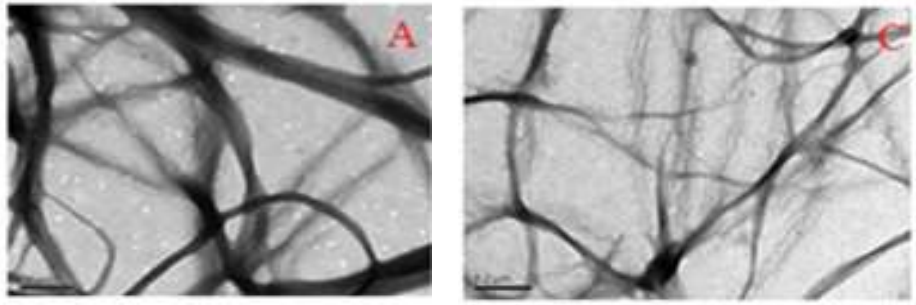
Раніше, за дпомогою турбідиметрії, було визначено, що форма фібриногену desBβ1-42 не здатна до полімеризації

Фібриноген desAα414-610



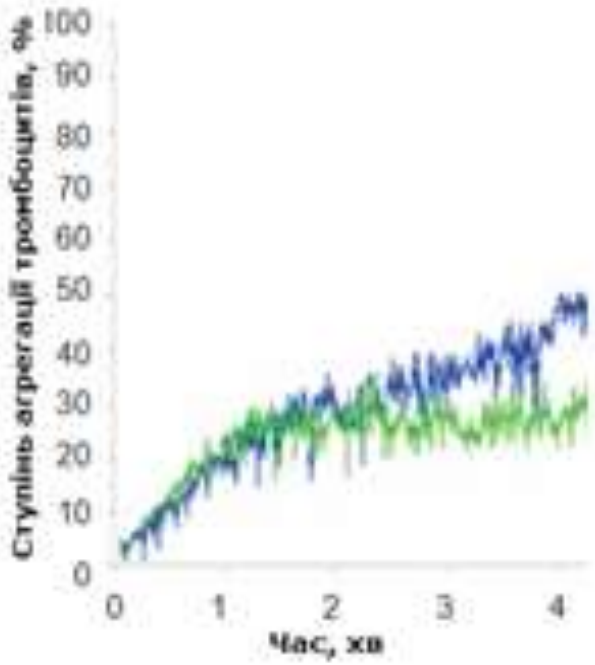
Зображення, отримані за допомогою електронної мікроскопії: фібриновий згусток, сформований фібрином desAB (A); фібриновий згусток, сформований фібрином desABAα505-610 (B).

Фібриноген desAα505-610

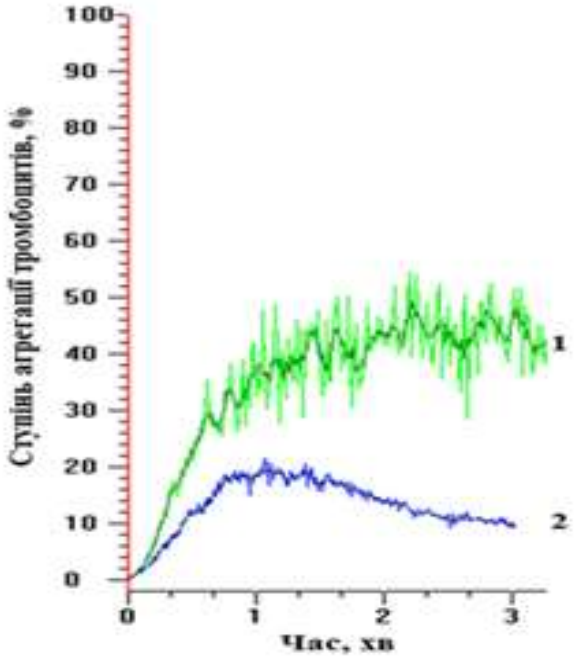


Зображення, отримані за допомогою електронної мікроскопії: фібриновий згусток, сформований фібрином desAB (A); фібриновий згусток, сформований фібрином desABAα414-610 (C).

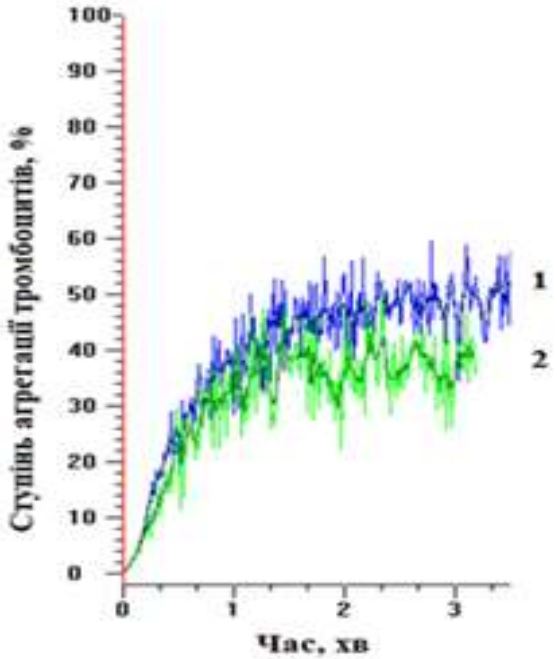
Агрегація тромбоцитів за дії різних протеїназ на молекулу фібриногену



АДФ-індукована агрегація тромбоцитів за присутності нативного фібриногену (1) та фібриногену desBβ1-42 (2).

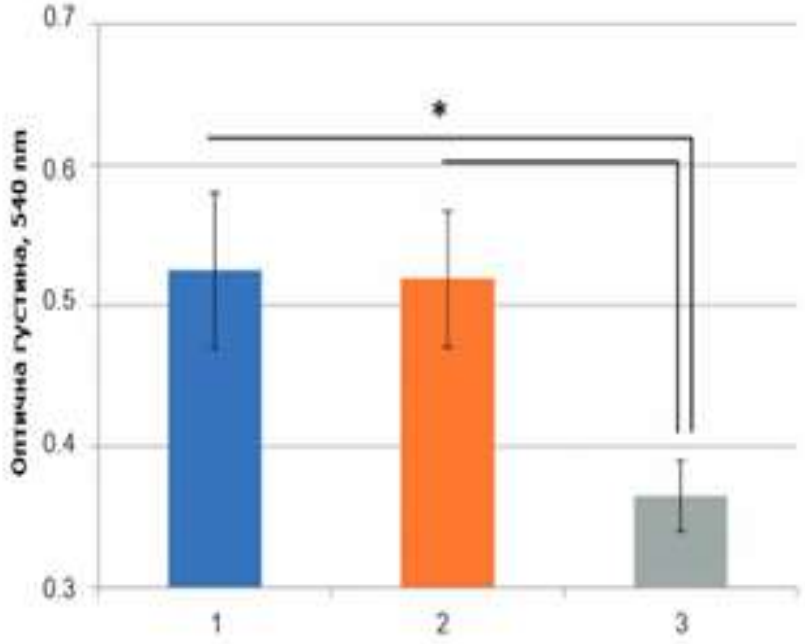


АДФ-індукована агрегація тромбоцитів за присутності нативного фібриногену (1) та фібриногену desAα414-610 (2).

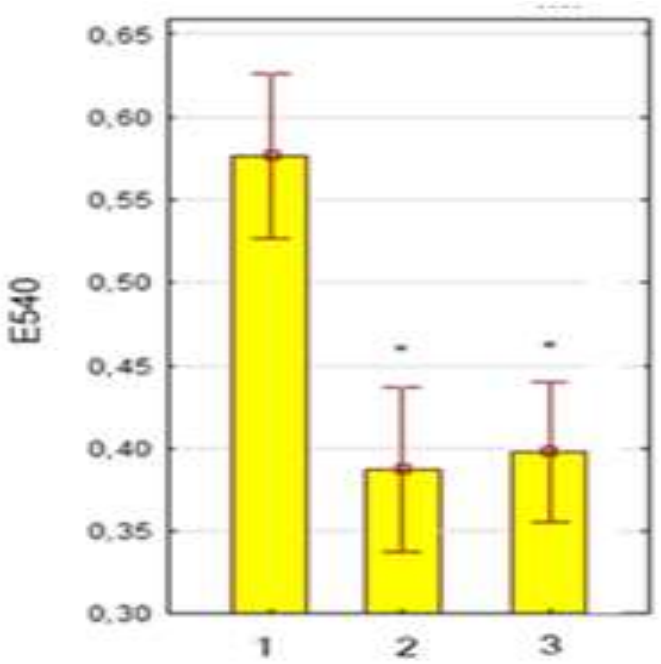


АДФ-індукована агрегація тромбоцитів за присутності нативного фібриногену (1) та фібриногену desAα505-610 (2).

Вплив протеїназ на підтримання життєздатності ендотеліоцитів



Життєздатність ендотелійних клітин аорти миші на підложках, утворених фібрином desA (1), desAB (2), і desABβ15-42 (3).



Життєздатність клітин MAEC за умов культивування на підложці з фібрину desAB (1), фібрину desABAα414-610 (2) та фібрину desABAα505-610 (3).

ВИСНОВКИ

Висока імуногенність та обмежена представленість антигенів MPT63 та MPT83 у протеомах інших мікобактерій дозволяє використовувати ці протеїни для діагностики туберкульозу людини та тварин.

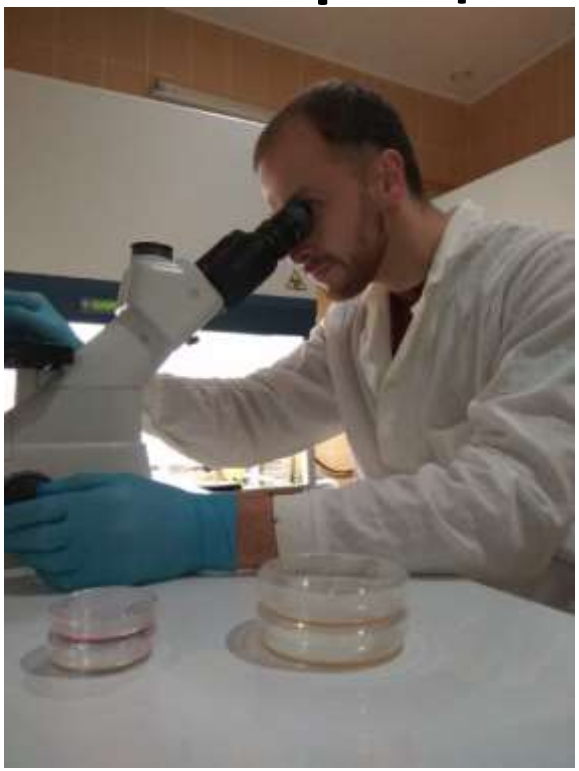
Використання досліджуваних протеїназ має перспективи у досягненні тонкої регуляції процесу згортання крові, що має велике значення для антитромботичної терапії.

1. Отримано генні конструкти, що кодують функціонально активні рекомбінантні аналоги антигенів *M.tuberculosis* MPT63 і MPT83 та їх злиті похідні; оптимізовано умови експресії, виділення та очищення у препаративних кількостях химерних протеїнів та індивідуальних компонентів антигенної субстанції MPT83-MPT63 для діагностичних цілей у якості імуносорбенту для серологічних тест-систем.
2. Розроблено прототипи тест-систем для визначення антитіл проти антигенів збудників туберкульозу людини («IB-Chem Anti-M*ycobacterium tuberculosis*») і тварин («IB-Chem Anti-M*ycobacterium bovis*»). Доведено, що тест-система «IB-Chem Anti-*Mycobacterium tuberculosis*» перевершує референтні за критеріями діагностичної чутливості та специфічності, а тест-система «IB-Chem Anti-M*ycobacterium bovis*» здатна диверсифікувати інфікованих атиповими (нетуберкульозними) штамами мікобактерій тварин.
3. Скринінг ензимів, отриманих із низки біологічних рідин, дозволив обрати протеїнази з отрути *Echis multisquamatis*, отрути *Gloydius halys halys* та культурального середовища *Bacillus thuringiensis* вар. israelensis IMV B-7465 як придатні інструменти для зниження концентрації фібриногену у кровотоці.
4. При дії протеїнази з *E. multisquamatis* втрачається здатність до полімеризації фібрину. Агрегація тромбоцитів знижується на 10 % і значно знижується здатність підтримувати життєздатність ендотеліоцитів. За дії на фібрино(оген) протеїнази з отрути змії *G. halys* подовжується в 4-5 разів час полімеризації фібрину. Швидкість агрегації тромбоцитів знижується на 35 % а ступінь агрегації на 50 %. Здатність фібрину підтримувати життєздатність ендотеліоцитів знижується на 35 %.За дії на фібриноген протеїнази з культурального середовища *B. thuringiensis вар. israelensis IMV B-7465* подовжується час утворення згустку в 4-5 разів. Знижується ступінь агрегації тромбоцитів на 15 % та на 35 % знижується здатність фібрину підтримувати життєздатність ендотеліоцитів.

Національна академія наук України
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України

Колектив авторів циклу робіт:

Стогній Євгеній Миколайович
PhD., н.с. відділу структури та функції білків



Сіромолот Андрій Андрійович
к.б.н., н.с. відділу молекулярної імунології

Кількість публікацій за роботою: 8 статей в журналах, включених до категорії "А" (у т.ч. 3 зарубіжних виданнях) та 4 статей у журналах, включених до категорії "Б", 11 тез доповідей. Загальна кількість посилань на публікації авторів/h-індекс за роботою згідно з базами даних складає відповідно: Scopus 7 / 3 , Google Scholar 29 / 4.
Отримано 3 патентів на корисну модель