

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ "ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНО-КЛИНИЧЕСКИЙ ЦЕНТР
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-
БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА"

на правах рукописи

КУРДЮМОВ АЛЕКСЕЙ СЕРГЕЕВИЧ

ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОЙ ДЕСТАБИЛАЗЫ -
ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНОГО ФЕРМЕНТА МЕДИЦИНСКОЙ ПИЯВКИ

03.01.04 – биохимия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
д.б.н., доцент Лазарев В.Н.

Москва – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	8
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1 Тромбозы и система гемостаза.	14
1.2 Лечение тромбозов, тромболитические препараты.	16
1.3 Гирудотерапия. Действие секрета слюнных желёз медицинской пиявки (ССЖМП) на компоненты гемостаза.	19
1.4 Дестабилаза медицинской пиявки.	26
1.4.1 Получение рекомбинантной дестабилазы.....	29
1.4.2 Изопептидазная активность дестабилазы.	31
1.4.3 Лизоцимная активность дестабилазы. Особенности строения активного центра.....	37
1.4.4 Антимикробная активность дестабилазы.....	41
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	45
2.1 Реактивы и материалы.....	45
2.2 Штаммы и плазмиды.	45
2.3 Полимеразная цепная реакция (ПЦР).....	46
2.4 Олигодезоксирибонуклеотиды.	46
2.5 Конструирование плазмид, кодирующих Dest2, под контролем промотора арабинозного оперона <i>E.coli</i>	49
2.6 Конструирование плазмид, кодирующих Dest2, под контролем промотора гена уридинфосфорилазы <i>E.coli</i>	50

2.7 Получение реципиентных плазмид pETmin и pET15MCS.....	50
2.8 Получение плазмид pETmin/C-Dest и pET15/N-Dest.	51
2.9 Получение плазмиды pETmin/min-Dest.....	51
2.10 Получение плазмиды pET32/Dest.....	51
2.11 Синтез оптимизированного по кодонному составу для <i>E.coli</i> фрагмента ДНК, кодирующего Dest2 и получение плазмид pET-15/N-Dest+, pETmin/C-Dest+.	52
2.12 Синтез оптимизированного по кодонному составу для <i>E.coli</i> фрагмента ДНК, кодирующего Dest1 и 3. Получение плазмид pET-Dest1, pET-Dest3.	52
2.13 Синтез оптимизированного по кодонному составу для клеток эукариот фрагмента ДНК, кодирующего Dest2.	53
2.14 Получение плазмиды pET-SlyD-Dest2.....	53
2.15 Получение плазмид для трансформации дрожжей <i>P.pastoris</i>	54
2.16 Получение плазмиды pcDNA3.4-Dest-2.	55
2.17 Оптимизация схемы культивирования штаммов-продуцентов рекомбинантной дестабилазы.....	56
2.17.1 Оптимизация схемы культивирования штаммов-продуцентов рекомбинантной Dest2 слитой с тиоредоксином (Trx-Dest2).	56
2.17.2 Оптимизация схемы культивирования штаммов-продуцентов рекомбинантной Dest2: BL21(DE3)-Gold -pET15/N-Dest+ и BL21(DE3)-Gold -pETmin/minDest.	56

2.18 Получение изоформ дестабилазы (Dest1, 2, 3) с гексагистидиновым мотивом в <i>E. coli</i> , ренатурированных из телец включения.	57
2.19 Получение min-Dest2 без гексагистидинового мотива в <i>E. coli</i> , ренатурированной из телец включения.	59
2.20 Получение слитого белка дестабилазы (SlyD-Dest2) в <i>E.coli</i>	61
2.21 Получение Dest2 в дрожжах <i>P. pastoris</i>	62
2.22 Получение Dest2 в клетках Expi293F.	64
2.23 Определение концентрации белка.	64
2.24 Стандартные буферы для определения активностей.	64
2.25 Определение литической активности дестабилазы.	64
2.26 Определение мурамидазной активности дестабилазы.	65
2.27 Определение изопептидазной активности дестабилазы.	66
2.28 Получение триптических пептидов дестабилазы.	66
2.29 Определение антибактериальной активности дестабилазы и ей триптических пептидов.	66
2.30 Определение фибринолитической активности дестабилазы.	68
2.31 Гидролиз изопептида γ -Glu- ϵ -Lys под действием дестабилазы.	68
2.32 Измерение кругового дихроизма (КД) дестабилазы.	69
2.33 MALDI-TOF анализ.	69
2.34 Гель-фильтрация дестабилазы.	70
2.35 Статистический анализ данных.	70
3. РЕЗУЛЬТАТЫ	72

3.1 Схема получения Dest2 в <i>E.coli</i> .	72
3.2 Конструирование плазмид, кодирующих Dest2.	73
3.2.1 Конструирование плазмиды pBAD/GIII/Dest.	74
3.2.2 Конструирование плазмиды pET-32a/Dest.	75
3.2.3 Конструирование плазмид pET15/N-Dest и pETmin/C-Dest.	76
3.2.4 Конструирование плазмиды pETmin/min-Dest.	77
3.2.5 Конструирование плазмид, кодирующих Dest2 под контролем экспрессии промотора гена уридинфосфорилазы <i>E.coli</i> .	77
3.2.6 Конструирование плазмид, кодирующих Dest2 для экспрессии в дрожжах <i>P. pastoris</i> .	79
3.2.7. Конструирование плазмиды, кодирующей Dest2 для экспрессии в клетках человека Expi293F.	80
3.3 Определение уровня накопления рекомбинантной Dest2 в клетках <i>E.coli</i> .	81
3.4 Оптимизация условий культивирования штамма <i>E.coli</i> , несущего плазмиду pET32/Dest.	84
3.5 Оптимизация условий культивирования штамма <i>E.coli</i> , несущего плазмиды pETmin/C-Dest, pETmin/minDest и pET15/N-Dest.	85
3.5.1 Оптимизация культивирования штаммов-продуцентов Dest2 в шейкере-инкубаторе.	85
3.5.2 Оптимизация культивирования штаммов-продуцентов Dest2 в лабораторном ферментере.	88

3.8	Оптимизация условий культивирования штаммов-продуцентов дестабилазы <i>E.coli</i> BL21(DE3)-Gold-pETmin/N-Dest и <i>E.coli</i> BL21(DE3)-Gold-pETmin/minDest.....	90
3.8.1	Выбор реципиентного штамма <i>E.coli</i>	91
3.8.2	Выбор питательной среды.	92
3.8.3	Оптимизация схемы культивирования штаммов-продуцентов Dest2.	93
3.9	Выделение и ренатурация рекомбинантной дестабилазы с полигистидиновой последовательностью (C-Dest2 и N-Dest2).	93
3.10	Выделение и ренатурация рекомбинантной min-Dest2.	97
3.11	Хроматографическая ренатурация и очистка min-Dest2 с помощью катионообменной хроматографии.....	100
3.12	Хроматографическая ренатурация N-Dest2.	102
3.13	Получение рекомбинантных изоформ дестабилазы (Dest1 и Dest3)..	103
3.14	Получение слитого белка SlyD-Dest2 и его процессинг.....	104
3.15	Получение Dest2 в дрожжах <i>P. pastoris</i>	106
3.16	Получение Dest2 в линии клеток Expi293F.....	106
3.17	Определение литической активности полученных рекомбинантных дестабилаз.	108
3.18	Определение мурамидазной активности полученных рекомбинантных дестабилаз.	113
3.19	Изопептидазная активность дестабилазы.....	117

3.20 Фибринолитическая активность дестабилазы.	120
3.21 Определение общей антибактериальной активности рекомбинантной дестабилазы по отношению к <i>E.coli</i>	123
3.22 Определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) дестабилазы и её триптических пептидов.	125
3.23 Расщепление диизопептида γ -Glu- ϵ -Lys дестабилазой.....	126
3.24 Спектр кругового дихроизма (КД) дестабилазы.	127
3.25 Гель-фильтрация изоформ дестабилазы.....	128
4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	130
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	139
ВЫВОДЫ.....	141
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	142
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	143

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы и степень ее разработанности

Сердечно-сосудистые заболевания по данным Всемирной организации здравоохранения являются основной причиной смерти во всем мире (Yusuf et al., 2015). Одной из главных причин возникновения этих заболеваний является тромбоз артерий и вен (Day, 2014). В России очень высокий показатель смертности от тромбоза его последствий: 56% от общего числа умерших (Шальнова, 2012; Jargin, 2015). На настоящий момент существует целый ряд препаратов, направленных на профилактику тромбообразования и на последующее лечение тромбозов (Horne, 2005; Maksimenko, 2012). Общие недостатки существующих препаратов для лечения тромбозов – это развитие реокклюзии (15-20% случаев), кровотечения (0,1-1,0% случаев) и гипотонии (Maksimenko, 2012). Передозировка антикоагулянтами может привести к серьёзным кровотечениям (Horne, 2005). Поэтому разработка принципиально новых, инновационных лекарственных средств, предупреждающих тромбообразование и препаратов, направленных на растворение тромбов является одной из главных задач современной биотехнологии и фармацевтики. В последние годы все большую популярность в лечении и профилактике тромбозов набирает гирудотерапия (Abdualkader et al., 2013; Jha et al., 2015).

Гирудотерапия (лечение пиявками) – один из древнейших методов лечения целого ряда заболеваний, который используется и по сегодняшний день (Jha et al., 2015). Доказаны антитромботические эффекты гирудотерапии у больных с хроническими ишемическими нарушениями мозгового кровообращения, обусловленные атеросклерозом и гипертонической болезнью (Pilcher, 2004). Было подтверждено положительное влияние гирудотерапии на обмен холестерина (Abdualkader et al., 2013). Показана эффективность гирудотерапии при профилактике и лечении больных с разной стадией инфаркта миокарда и ишемическим инсультом (Zaidi et al.,

2011, Jha et al., 2015). Положительный эффект гирудотерапии обусловлен сложным составом секрета слюнных желёз пиявки (Singh, 2010). В 1985 году из секрета был выделен фермент, обладающий уникальным свойством: он растворял фибрин с высокой степенью стабилизации. Впоследствии этот фермент был назван дестабилазой (Баскова и др., 1985).

Дестабилаза медицинской пиявки – первый описанный представитель полифункциональных лизоцимов беспозвоночных (Zavalova et al., 2000). Данный фермент сочетает мурамидазную (КФ 3.2.1.17) и эндо- ϵ -(γ -Glu)-Lys-изопептидазную (КФ 3.5.1.44) активности. К настоящему моменту выявлено три гена медицинской пиявки, которые кодируют разные изоформы дестабилазы (Zavalova et al., 2003). Действие фермента направлено на растворение стабилизированного фибрина и на расщепление Д-димера (конечный продукт фибринолиза) до мономеров не путем протеолиза, а путем изопептидолиза связей ϵ -(γ -Glu)-Lys, соединяющих мономеры (Baskova and Nikonov, 1991). Была выявлена мурамидазная активность дестабилазы при разрушении клеточных стенок *Micrococcus lysodeikticus* (Zavalova et al., 2000; Баскова и др., 2008). Кроме того, даже инактивированный фермент обладает антимикробной активностью и блокирует рост микроорганизмов (Zavalova et al., 2006; Завалова и др., 2010).

Показано, что раствор нативной дестабилазы проявляет тромболитическое действие при внутривенном введении крысам (Завалова и др., 1991). Низкая скорость тромболизиса под действием этого фермента коррелирует с низкой скоростью репарации поврежденной сосудистой стенки. Известно, что несоответствие этих скоростей при срочной тромболитической терапии приводит к ретромбозам (Horne, 2005), чего практически не наблюдается при гирудотерапии (Corral-Rodriguez et al., 2010).

Ранее была получена рекомбинантная дестабилаза медицинской пиявки и показана её тромболитическая активность (Завалова и др., 2004; Завалова и др., 2010). Но сам процесс получения и выделения активной рекомбинантной

дестабилазы оказался неэффективен из-за низкого выхода конечного продукта и трудоёмкости процесса.

Таким образом, объектом нашего исследования была выбрана дестабилаза медицинской пиявки – потенциальный тромболитический агент с принципиально новым механизмом тромболизиса. Получение значительных количеств активной рекомбинантной дестабилазы и изучение её ферментативных и антибактериальных свойств открывает перспективы использования данного белка для медицинского применения в качестве нового тромболитического лекарственного средства.

Цель работы

Изучение ферментативных и антибактериальных свойств рекомбинантных дестабилаз медицинской пиявки.

Задачи

1) Получение активных рекомбинантных дестабилаз изоформ 1, 2 и 3 медицинской пиявки в клетках бактерий *Escherichia coli*, дрожжах *Pichia pastoris* и клетках почки эмбриона человека линии Expi293F.

2) Сравнение мурамидазной, изопептидазной, фибринолитической и антимикробной активностей трёх рекомбинантных изоформ дестабилаз и эффективности получения рекомбинантной дестабилазы с использованием бактерии *Escherichia coli*, дрожжей *Pichia pastoris* и клеток почки эмбриона человека линии Expi293F.

Научная новизна

Впервые в клетках *E. coli* были получены все известные изоформы дестабилазы: Dest1, Dest2 и Dest3. Впервые получена рекомбинантная Dest2 в эукариотических системах экспрессии: в дрожжах *P. pastoris* и культуре клеток человека Expi293F. В дрожжах *P. pastoris* и в клетках человека Dest2 секретировалась в культуральную жидкость.

У всех полученных Dest мы исследовали мурамидазную, изопептидазную, фибринолитическую и антимикробную активности. Впервые определены зависимости мурамидазной и изопептидазной активностей от pH и ионной силы среды. Впервые показана антимикробная активность триптических пептидов Dest по отношению к *E. coli* и *Bacillus subtilis*.

Теоретическая и практическая значимость

Нами был разработан эффективный способ получения рекомбинантной Dest2 в клетках бактерий *E. coli*: была получена серия плазмид, содержащих структурную часть гена Dest2, были получены штаммы-продуценты рекомбинантного белка, подобраны схемы культивирования, выделения, очистки и ренатурации. В результате работы мы добились увеличения более чем в пять раз (по сравнению с ранее имеющимся методом) выхода очищенной ренатурированной Dest2, который составил не менее 30 мг белка на литр исходной бактериальной культуры. В системе *E. coli* нам удалось получить Dest2 в растворимой форме: в виде слитого белка с шапероном SlyD.

Данные, полученные в настоящей работе, могут стать основой исследования взаимосвязи между мурамидазной и изопептидазной активностями мультифункционального фермента, пониманию механизма антибактериальной активности Dest. Разработанный метод получения Dest позволит получать рекомбинантный белок в больших количествах, что позволит провести доклинические и клинические испытания Dest в качестве нового тромболитического препарата.

Методология и методы исследования

В диссертации использованы общие микробиологические методы (культивирование клеток *E. coli* различных штаммов) и их трансформация, получение штаммов-продуцентов рекомбинантных белков, генно-

инженерные методы (выделение плазмидной ДНК, методы рестрикционного анализа, отбор рекомбинантных клонов и другие методы молекулярного клонирования), методы работы с линиями клеток эукариот (культивирование, трансфекция), методы работы с белками (получение и очистка рекомбинантных белков), биохимические и физико-химические методы исследования активности ферментов (мурамидазная, изопептидазная, фибринолитическая, антибактериальная).

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

- 1) Разработан способ получения и выделения активных рекомбинантных дестабилаз медицинской пиявки трех изоформ в *E. coli*.
- 2) Разработан способ получения и выделения активной рекомбинантной дестабилазы-2, полученной в эукариотических системах экспрессии: в дрожжах *P. pastoris* и культуре клеток человека Expi293F.
- 3) Охарактеризованы мурамидазная, изопептидазная, фибринолитическая и антибактериальная активности полученных в работе ферментов

Степень достоверности и апробация результатов

Для решения поставленных задач в работе использовались современные инструментальные методы. Обсуждение результатов проведено с учетом современных данных медицинской и биологической наук. Научные положения и выводы, изложенные в диссертации, обоснованы и подтверждены фактическим материалом.

Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на расширенном межлабораторном заседании Отдела молекулярной биологии и генетики ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, а также в ходе ряда конференций: "Ломоносов" (Москва, 2014, 2015), Биология - наука 21го века (Пушино, 2015), Международная школа молодых учёных по молекулярной генетике (Звенигород, 2014), конференция International Committee on

Thrombosis and Haemostasis (Монпелье, Франция, 2016), 24th Biennial International Congress on Thrombosis (Стамбул, Турция, 2016).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 3 работы в рецензируемых научных журналах и 8 работ в сборниках тезисов конференций.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Тромбозы и система гемостаза.

Согласно официальным материалам Министерства здравоохранения Российской Федерации, сердечно-сосудистые заболевания – основная причина смертности среди населения. Ежегодно в России от проблем с сердцем умирают более миллиона человек (56% от общего числа смертей) (Шальнова, 2012; Jargin, 2015), что намного выше показателя смертности в США (около 800 тысяч смертей, что составляет 31% от всех умерших) (Yusuf et al., 2015). Ключевой причиной возникновения этих заболеваний является тромбоз (Day, 2014). Венозный тромбоз может вызвать боль, отёки, сепсис. Например, смертность при тромбозе венозного синуса головного мозга составляет 4,5% (Watson et al., 2014). Артериальный же тромбоз является причиной артериальной эмболии, что потенциально угрожает инфарктом любому органу (Inniss, 2011). Например, смертность от ишемического инсульта, вызванного тромбозом, либо тромбоэмболией (80% случаев), находится на втором месте, уступая лишь смертности от ишемической болезни сердца (Vaitkus and Barnathan, 1993). Тромбоз также является причиной инфаркта миокарда в 95% случаев (Vaitkus and Barnathan, 1993).

Главная причина тромбообразования – это увеличение скорости свёртываемости крови (Boon, 1993). В 70% случаев тромбоз поражает магистральные вены ног и рук. Опасным для жизни является тромбоз бедренного и подколенного участка. Именно в них образуются тромбы, обладающие способностью к отрыву, перемещению с эмболией (закупоркой) сосудов (Vaitkus and Barnathan, 1993; Inniss, 2011).

Свёртывание крови — это важнейший этап работы системы гемостаза, отвечающий за остановку кровотечения при повреждении сосудистой системы организма. Гемостаз – защитная реакция организма на нарушение целостности кровеносных сосудов, заключающаяся в сохранении жидкого состояния крови, остановке кровотечений и растворении тромбов. Гемостаз

включает в себя тромбоцитарно-сосудистое и плазменное звенья с конечной стадией растворения тромбов (фибринолиз) (Hoffman and Monroe, 2007).

Тромбоцитарно-сосудистый (первичный) гемостаз представляет собой прекращение кровопотери за счёт спазма повреждённого сосуда и образования тромбоцитарного сгустка (Wakefield et al., 2008). После повреждения стенки сосуда высвобождаются клетки субэндотелия, которые являются высоко адгезивными по отношению к тромбоцитам из-за присутствия коллагена и фактора фон Виллебранда (Sadler, 1998). Процесс агрегации усиливает выделение из разрушенных тромбоцитов АДФ (аденозиндифосфата), адреналина, арахидоновой кислоты, простагландинов (Li et al., 2010). В результате образуется так называемый «белый тромб» (рисунок 1).

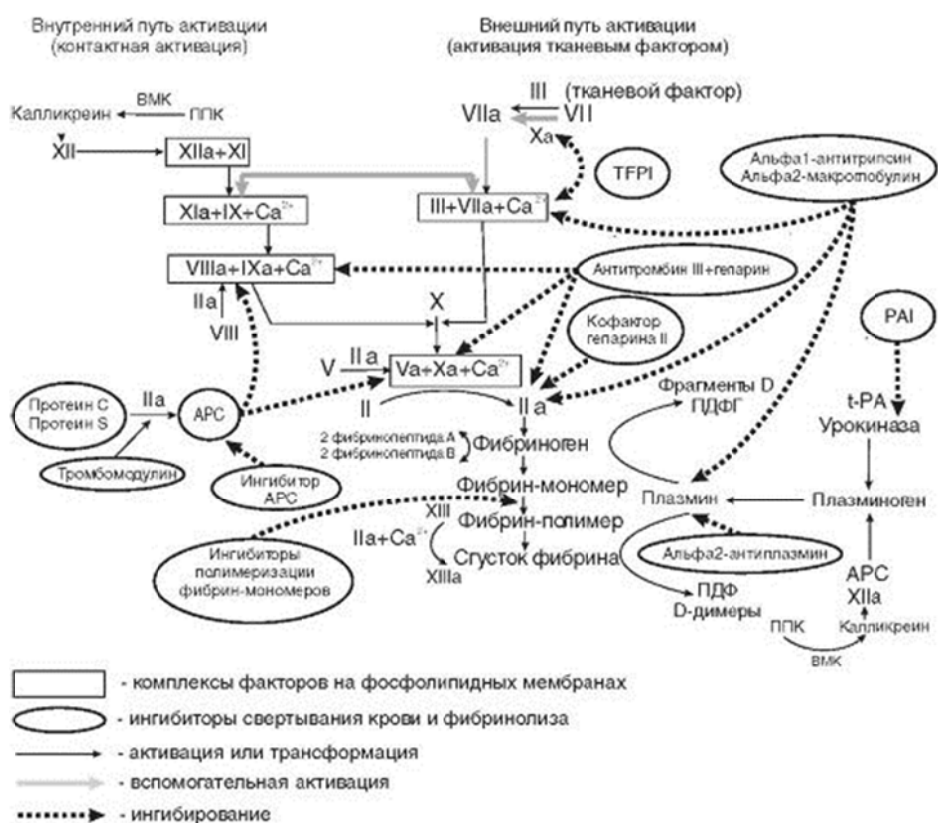


Рисунок 1. Механизм коагуляционного гемостаза. ВМК - высокомолекулярный кининоген, ППК - плазменный прекалликреин, APC - активированный протеин С, TFPI - ингибитор пути тканевого фактора, PAI - ингибитор активатора плазминогена, ПДФ - продукт деградации фибриногена (Момот, 2007).

Плазменный гемостаз регулируется многочисленными факторами свёртываемости крови и запускается тканевым фактором из тканей, окружающих повреждённый сосуд (Furie and Furie, 2007). Первая фаза - образование и высвобождение тромбопластина (фактор свёртывания крови III) из повреждённых сосудов (Mann et al., 1992). Вторая фаза – образование тромбина. Тромбин образуется при взаимодействии протромбина и тромбопластина при участии ионов кальция и других факторов свёртывания (Davie and Kulman, 2006). Третья фаза – образование фибрина. Тромбин расщепляет фибриноген, образуя фибрин-мономер. Далее фибрин-мономер самостоятельно полимеризуется до нестабильного фибрин-полимера (нестабилизованный фибрин) (Macfarlane, 1964). Фактор XIIIa (фибринолигаза, трансглутаминаза, фибрин стабилизирующий фактор) катализирует сшивание нитей нестабилизованного фибрина через образование связей между аминокислотами в положениях γ -Glu- ϵ -Lys (Kanaide and Shainoff, 1975). В результате образуется стабилизированный фибрин, обладающий значительной механической силой и резистентностью к протеолитической деградации (Soria et al., 1975).

1.2 Лечение тромбозов, тромболитические препараты.

На настоящий момент существует несколько подходов к лечению тромбозов и тромбофлебитов. В первую очередь проводится консервативное лечение, которое направлено на улучшение микроциркуляции крови, ослабление адгезивно–агрегационной функции тромбоцитов и оказание противовоспалительного действия (Joffe and Goldhaber, 2002). Основными задачами такого лечения являются профилактика тромбообразования, фиксация тромба к стенкам сосуда, ликвидация воспалительного процесса, а также воздействие на микроциркуляцию (Paul et al., 1992). Однако, основной терапией является противосвёртывающая терапия при строгом лабораторном контроле показателей системы гемостаза (Kagansky et al., 2004). В начале

заболевания применяются прямые антикоагулянты (гепарин (Hirsh and Raschke, 2004) или фраксипарин (Diquelou et al., 1995)). После этого используются непрямые антикоагулянты (блокаторы синтеза витамин К-зависимых факторов свертывания крови (Ansell et al., 2008)).

На ранней стадии образования тромба или в тяжёлых случаях эффективна тромболитическая терапия (Fath-Ordoubadi and Beatt, 1997; Geerts et al., 2004). Тромболитическая терапия направлена на то, чтобы быстро растворить фибриновый тромб и восстановить кровоток. Для этого необходимо повысить фибринолитическую функцию крови больного, чего можно достигнуть двумя путями:

- 1) введением активированного *in vitro* плазмينا, увеличивая его содержание в крови;
- 2) введением активаторов пламиногена, которые усиливают образование плазмينا из собственного пламиногена (Geerts et al., 2004).

На настоящее время классификация тромболитических препаратов по поколениям выглядит следующим образом:

- 1) Первое поколение: стрептокиназа (Olow et al., 1970; Meissner et al., 2000), урокиназа (Hayashi and Yamada, 1979; Goldberg et al., 1989; Xia et al., 2010), стрептодеказа (Popova and Pirogov, 1986) и фибринолизин (Moser, 1958; Williams and Karaffa, 1965). Они способствуют активизации одного из каскадов фибринолиза, превращая пламиноген в плазмин. Важным общим фактором для этих лекарств является то, что активируется весь плазмин крови, а не только в области тромба, что может вызвать кровотечение.

- 2) Второе поколение: альтеплаза (Neuhaus et al., 1992; Baxter-Jones et al., 1993), актилизе (Raynaud and Desveaux, 1988), рекомбинантная проурокиназа (Weaver et al., 1994; Sosnovskii et al., 2009). Препараты являются фибринселективными тромболитиками, и представляют собой рекомбинантные тканевые активаторы фибриногена. Препарат влияет только на тот пламиноген, который связан с образовавшимся тромбом, не оказывая системного эффекта.

3) Третье поколение: тенектеплаза (Rabasseda, 2001; Huicochea-Bartelt, 2015), ланотеплаза (Al-Shwafi et al., 2003), ретеплаза (Wooster and Luzier, 1999; Castaneda et al., 2002). Усовершенствованные препараты второго поколения: удлиняется период полувыведения (продолжительность действия), улучшаются показатели селективности (избирательная доставка к тромбу).

4) Четвёртое поколение: комбинированные препараты, например, препарат «урокиназа-плазминоген». Комбинирование препаратов с разным механизмом действия позволяет снизить концентрацию активного вещества до 20 раз по сравнению с монотерапией (Крылов, 2013).

В настоящее время «золотым стандартом» тромболитической терапии являются препараты второго поколения. Они хорошо изучены, не имеют ярко выраженных недостатков, как препараты первого поколения.

При возникновении риска тромбоэмболии, либо при наличии признаков флотации головки тромба, используется оперативное лечение (Berry et al., 1990). Другая стратегия – это введение кава-фильтра (Ahmad et al., 2010; Andreoli et al., 2016). Этот фильтр призван задерживать все перемещающиеся тромбы (эмболы) на пути к лёгким. Обычно кава-фильтр устанавливается только в том случае, если больной не может принимать противосвёртывающие препараты или если такая терапия неэффективна.

Каждый из методов лечения тромбозов несовершенен – есть ряд противопоказаний и осложнений. Например, фибринолизин (собственный, эндогенный плазмин) действует медленно и недостаточно эффективен в растворении артериальных тромбов (Williams and Karaffa, 1965). Кроме того, он часто вызывает пирогенную и аллергическую реакцию, а также серьезные кровотечения. Стрептокиназа обладает выраженными антигенными свойствами (Patra et al., 2015). У пациентов титр антител к стрептокиназе остаётся повышенным спустя 4 года после введения, что обуславливает резистентность к повторному введению препарата. Общие недостатки существующих тромболитических препаратов – это развитие реокклюзии

(20% случаев), кровотечения (развитие в 1,0% случаев), развитие гипотонии, короткое время полувыведения (Baxter-Jones et al., 1993; Kermode et al., 1995; Payer 2000). Передозировка антикоагулянтных препаратов может привести к кровотечениям, но уменьшает риск возникновения реокклюзии (Horne, 2005). Тромболитические препараты не назначают при лечении обширных и флотирующих тромбов, так как существует высокий риск тромбоэмболии крупных сосудов (Geerts et al., 2004).

В связи с этим, в последние годы все больше внимания уделяется поиску новых тромболитических и антитромботических агентов и методов лечения. Одним из таких методов является гирудотерапия (Singh, 2010). Было доказано антитромботическое действие гирудотерапии у больных с хроническими ишемическими нарушениями мозгового кровообращения, обусловленными атеросклерозом и гипертонической болезнью (Pilcher, 2004). Ранее было подтверждено положительное влияние гирудотерапии на обмен холестерина: в 57% случаев происходила нормализация уровня общего холестерина. Было показано снижение протромбинового индекса на 55% у больных с гипертонической болезнью и ишемической болезнью сердца, возрастание времени свёртывания крови и снижение вязкости цельной крови у 82% больных гипертонической болезнью (Pilcher, 2004; Abdulkader et al., 2013; Jha et al. 2015). Показано положительное влияние гирудотерапии при профилактике и лечении больных с разной стадией инфаркта миокарда и ишемическим инсультом.

1.3 Гирудотерапия. Действие секрета слюнных желёз медицинской пиявки (ССЖМП) на компоненты гемостаза.

Гирудотерапия является одной из наиболее древних терапевтических методик. Родоначальником лечебного метода считается греческий поэт Никандр из Колофона (Nikandros), который еще во II веке до н. э. наряду с лечением укусами змей и насекомых, впервые описал полезные свойства пиявки (Giacometti, 1987). Упоминания о гирудотерапии можно встретить в

трактатах Авиценны и Гиппократов. В настоящее время методы гирудотерапии используются не только в народной, но и в официальной медицине. Медики США и Европы активно применяют пиявок в офтальмологической практике (Nawa et al., 2006) и пластической хирургии (Van Wingerden and Oosthuizen, 1997; Houshyar et al., 2015), а китайские врачи лечат с помощью гирудотерапии атеросклероз (Dong et al., 2016). В России пиявки применяются в лечении и профилактике многих заболеваний, в основном неинфекционной природы. А сама пиявка признана лекарственным средством и занесена в Реестр лекарственных средств Российской Федерации (B01AB Гепарины, Фармакологическая группа» Антикоагулянты). В Германии пиявка производится как лекарственное средство и продаётся согласно закону врачам и их представителям. В США пиявка считается «медицинским изделием» (medical device) и зарегистрирована в 2004 году FDA US (MEDICINAL LEECHES 510(k) NO: K040187 (TRADITIONAL) SE) (Santos, 2013).

Широкое и эффективное использование в клинической практике обусловлено содержанием в ССЖМП множества активных ферментов и других веществ (таблица 1).

Таблица 1

Белковые компоненты, входящие в состав ССЖМП

Название компонента	Механизм действия компонента
γ -Глутамилтранспептидаза	Участвует в комплексе с дестабилазой в процессе гидролиза изопептидных связей (Баскова и др., 2004).
Антистазин	Ингибитор фактора Ха (Dunwiddie et al., 1989).
Апираза	Фермент, повышающий активность липопротеидлипазы, в результате чего в плазме крови снижается концентрация общего холестерина и липопротеидов низкой плотности, повышается толерантность к глюкозе (Rigbi et al., 1987).
Бделлины	Ингибиторы трипсина, плазмина и акрозина (Fink et al., 1986).
Гементерин	Активирует плазминоген (Kelen and Rosenfeld, 1975; Chudzinski-Tavassi et al., 1998).
Гементин	Разрушает фибрин и фибриноген, ингибирует рост опухоли и распространение метастазов (Malinconico et al., 1984; Sawyer et al., 1991).
Гиалуронидаза	Фермент, обеспечивающий проникновение секрета через ткани путём разрушения гиалуроновой кислоты (Linker et al., 1960).
Гирудин	Высокоспецифический ингибитор тромбина (Markwardt et al., 1967; Bhatt, 1994).
Гирустазин	Ингибирует катепсин G, тканевой калликреин, трипсин и химотрипсин (Sollner et al., 1994).
Дестабилаза	Фибринолитический агент, гидролизует изопептидные связи между мономерами

	фибрина, обеспечивает антибактериальное свойство секрета (Баскова и др., 1985; Zavalova et al. 2000; Завалова и др., 2010).
Ингибитор фактора Ха	Блокирует плазменное звено гемостаза и фактор Ха (Condra et al., 1989).
Калин	Ингибитор адгезии тромбоцитов, блокирует образование богатых тромбоцитами тромбов и связывание фактора фон Виллебранда с поверхностью коллагена (Munro et al., 1991).
Катепсин G	Гидролаза, катализирующая гидролиз пептидной связи (Seemuller et al., 1980).
Коллагеназа	Ингибитор агрегации тромбоцитов, разрушает коллаген внеклеточного матрикса (Rigbi et al., 1987; Hildebrandt and Lemke, 2011).
Оргелаза	Способствует активному распространению пиявочных антикоагулянтов и повышает скорость протекания крови по капиллярам, активизирует «закрытые» капилляры, вызывает рост новых капилляров (Hildebrandt and Lemke, 2011).
Саратин	Ингибируют адгезию тромбоцитов к поврежденной поверхности сосудистой стенки и их агрегацию (White et al., 2007).
Серотонин	Повышение концентрации серотонина в месте прокуса приводит к увеличению болевого порога (Баскова и др., 2008).
Субтилизин	Протеолитический фермент (Ascenzi et al., 1988).
Теромин	Ингибитор тромбина (Salzet et al., 2000).

Химазин	Ингибитор тромбина (Rigbi et al., 1987).
Холестерин-эстераза	Катализирует гидролитическое расщепление эфиров холестерина (Баскова и др., 1984).
Эглины	Ингибиторы химотрипсина, субтилизина и нейтральных протеиназ гранулоцитов человека (Baici and Seemuller, 1984; Snider et al., 1985).
Элатаза	Катализирует расщепление пептидных связей в белках. Выделяется в форме неактивной проэлатазы, которая под действием фермента трипсина превращается в элатазу (Hildebrandt and Lemke, 2011).

Пиявочный секрет представляет набор соединений белковой, липидной и углеводной природы, выработанный медицинской пиявкой в результате адаптации к питанию кровью теплокровных животных и направленный, в первую очередь, на блокирование гемостаза хозяина в месте нанесения ранки при прокусывании кожного покрова (Hildebrandt and Lemke, 2011).

В одной пиявке по оценочным данным может содержаться несколько мм³ секрета, который находится в клетках слюнных желёз. Количество этих клеток достигает нескольких тысяч на одну пиявку, и они располагаются равномерно во всей её головной части (Lemke et al., 2016). От каждой клетки отходит длинный канал (длиной до сантиметра), который открывается непосредственно в зуб, расположенный на челюсти пиявки (рисунок 2). Своими челюстями пиявки прокусывает кожный покров хозяина и через них на протяжении всего процесса кормления выбрасывает секрет (Hildebrandt and Lemke, 2011).

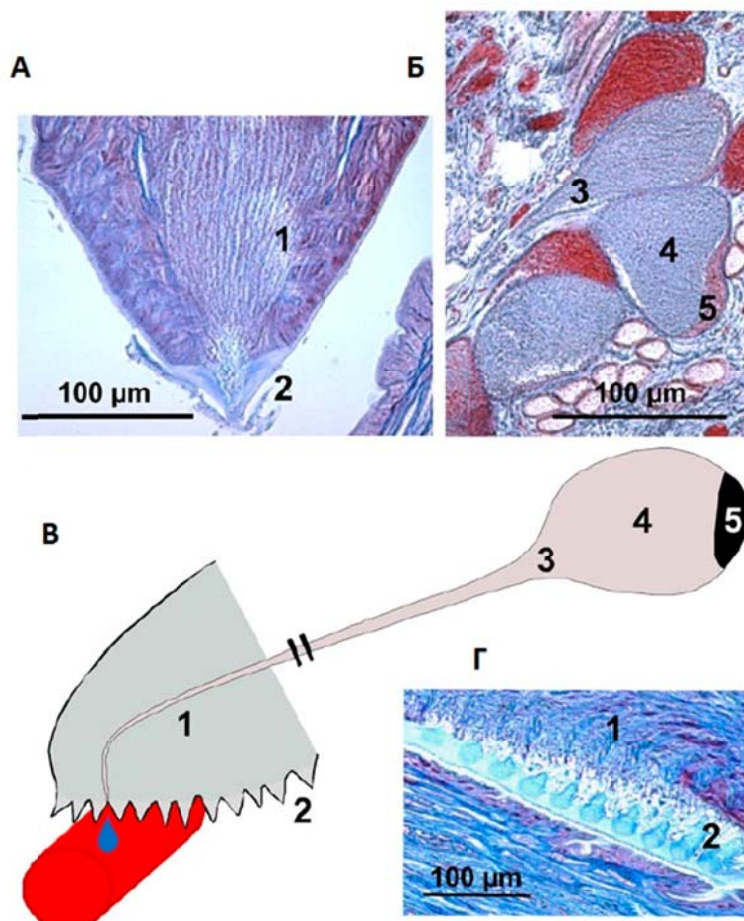


Рисунок 2. Продольные гистологические парафиновые срезы (толщина 5 мкм) передней части тела *Hirudo verbana* (А, Б, Г), окрашенные азаном, и схематический чертеж клетки слюнных желез в сочетании с челюстью (В). Поперечные (А) и продольные (Г) срезы одной из челюстей. Видны удлинённые частей канала клетки слюнной железы (1), они приближаются к отверстию у основания кальцифицированного зуба (2) на поверхности челюсти.

Б – В сегментах передней части ненакормленной пиявки видны большие клеточные тела, наполненные гранулярным материалом (4), который окрашивается азаном либо в синий, либо в красный цвет. Ядро клетки и аппарат биосинтеза могут быть локализованы в основании клетки слюнных желез (5). Удлиненный канал (3) проходит от тела клетки к отверстию в челюсти.

С – Схематичное строение клетки слюнной железы в сочетании с челюстью. (Hildebrandt and Lemke, 2011).

Поскольку система гемостаза является одним из проявлений гомеостаза и регулируется на уровне целостного организма, ССЖМП оказывает общее воздействие на организм хозяина.

Выделяется несколько этапов влияния секрета на гемостаз после попадания в кровь:

1) Первый этап (тромбоцитарный гемостаз)

Впервые ингибирование агрегации тромбоцитов компонентами ССЖМП было показано на гирудине. Гирудин – полипептид, высокоспецифичный ингибитор тромбина. Гирудин, блокируя связывание тромбина тромбоцитами, подавлял их агрегацию (Bhatt, 1994).

Показано ингибирование общей адгезии тромбоцитов человека к поверхностям, покрытым коллагеном I, II и III типов на 85-87%, причём прикрепление тромбоцитов к коллагену ингибировалось на 70-80%, а распластывание тромбоцитов подавлялось на 100%. Кроме того, коллаген IV типа, обработанный ССЖМП, аналогично ингибировал адгезию тромбоцитов (Keller et al., 1992; Depraetere et al., 1999). В 1991 году из ССЖМП был выделен ингибитор адгезии тромбоцитов, связывавшийся с коллагеном, и назван калином (Munro et al., 1991). Калин также препятствует образованию тромбов с большим содержанием тромбоцитов и ингибирует связывание фактора фон Виллебранда с поверхностью коллагена. Позднее был выделен ещё один ингибитор адгезии тромбоцитов – саратин. Он ингибирует связывание фактора фон Виллебранда с коллагенами всех типов (Cruz et al., 2001). Было показано, что секрет ингибирует агрегацию тромбоцитов, индуцированную АДФ и ФАТ (1-О-алкил-2-ацетил-*sn*-3-глицерофосфорилохолин). Позже были обнаружены апираза (фермент, отщепляющий фосфат от молекул АТФ и АДФ) и ингибитор ФАТ (Rigbi et al., 1987).

2) Второй этап (коагуляционный гемостаз)

Тромбин – многофункциональный фермент, являющийся главным участником плазменного гемостаза. Главным образом, тромбин активирует фибриноген, тем самым позволяя ему спонтанно полимеризоваться в фибриновый сгусток (Hoffman and Monroe, 2007). Гирудин блокирует все свойства тромбина (как свободного, так и адсорбированного на фибриновом сгустке), образуя с ним прочный нековалентный стехиометрический комплекс (Bhatt, 1994). Было показано, что ССЖМП, лишённый антитромбиновой активности, удлиняет время свёртывания плазмы крови (Баскова, Никонов, 1986). Помимо этого из ССЖМП был выделен ингибитор фактора Ха, который катализирует превращение протромбина в тромбин в присутствии ионов кальция и фактора свёртывания V (Condra et al., 1989).

3) Третий этап (фибринолиз)

Реализуется преимущественно полифункциональным ферментом – дестабилазой, которая гидролизует изопептидные связи, образованные в фибрине в результате стабилизации фактором XIIIa в присутствии ионов кальция (Баскова и др., 1985; Baskova and Nikonov, 1991).

1.4 Дестабилаза медицинской пиявки.

Дестабилаза – первый полифункциональный представитель лизоцимов беспозвоночных, сочетающий в себе свойства эндо- ϵ -(γ -Glu)-Lys-изопептидазы и лизоцима (Zavalova et al., 2000). Впервые он был обнаружен в составе секрета слюнных желез и выделен из него (Баскова и др., 1985). Действие фермента направлено на растворение стабилизированного фибрина и на расщепление Д-димера до мономеров не путём протеолиза, а путем изопептидолиза связей ϵ -(γ -Glu)-Lys, соединяющих мономеры (Баскова и др., 1990; Завалова и др., 1991). В экспериментах на животных установлено, что такой механизм приводит к разрушению тромбов, и поэтому дестабилазу можно считать тромболитическим ферментом (Baskova and Nikonov, 1991). Выявлена мурамидазная активность дестабилазы при разрушении клеточных

стенок *Micrococcus lysodeikticus* (Zavalova et al., 2000). Мурамидазная активность проявляется как специфическая гликозидазная по отношению к гексамеру N-ацетилглюкозамина (Завалова и др., 2010).

Дестабилаза медицинской пиявки долгое время оставалась единственным известным примером полифункционального фермента, выполняющего изопептидазную, мурамидазную и антимикробную функции. В 2003 г. были опубликованы данные о структуре и свойствах лизоцима, выделенного из морского двустворчатого моллюска *Tapes japonica* (TJL), которые выявили его эндоизопептидазную активность (Takeshita et al., 2003). Идентичность аминокислотных последовательностей между этими ферментами (46%) показывает, что у лизоцима в течение относительно короткого промежутка времени появилась дополнительная изопептидазная функция.

В 2000 году показана противотромбическая активность дестабилазы. Дестабилаза способна блокировать как спонтанную, так и индуцированную агрегацию тромбоцитов (Baskova et al., 2000).

К настоящему моменту описано три гена, которые кодируют разные изоформы дестабилазы (*Dest 1*, *Dest 2*, *Dest 3*) (Zavalova et al., 1996; Zavalova et al., 2003). Белок *Dest2* состоит из 115 аминокислотных остатков, его гомология с другими изоформами *Dest1* и *Dest3* составляет 75,7% и 66,1% соответственно. Все белки характеризуются высоким содержанием цистеина (14 из 115 аминокислотных остатков) и предположительно имеет 7 дисульфидных связей (рисунок 3) (Zavalova et al., 2003).

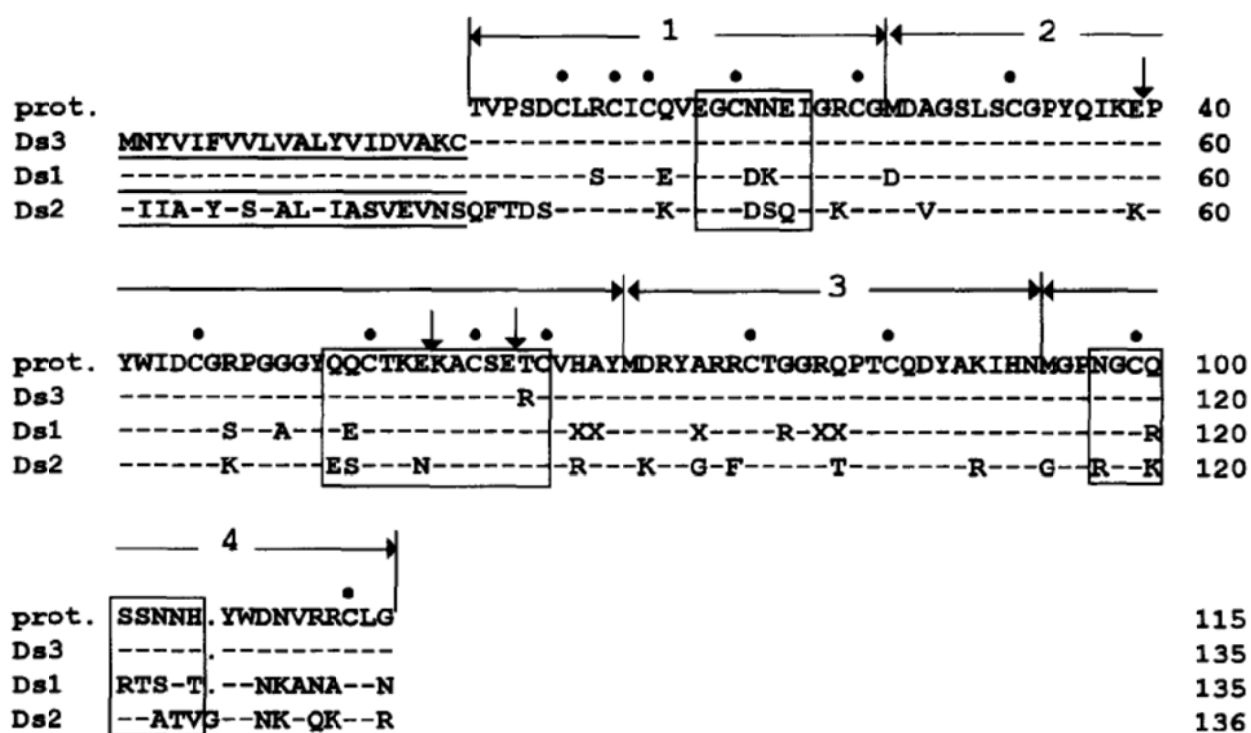


Рисунок 3. Сравнение первичной структуры изоформ дестабилазы Dest1, Dest2 и Dest3 и структуры, полученной путем белкового секвенирования бромциановым методом образца, выделенного из секрета слюнных желез медицинской пиявки (prot). Идентичные остатки показаны дефисом, сигнальные последовательности подчеркнуты, прямоугольниками выделены области, обогащенные гидрофильными остатками. Позиции 14 консервативных Cys отмечены черными кружками. Пептиды, полученные при бромциановом расщеплении дестабилазы, пронумерованы сверху. Вертикальные стрелки показывают позиции длиннейшего расщепления BrCN пептидов стафилококковой протеиназой V-8 (Zavalova et al., 2003).

Было показано, что дестабилаза способна образовывать агрегаты, которые благодаря липидному компоненту могут изменять свою пространственную ориентацию (Баскова и др., 1996). В пользу этого свидетельствует тот факт, что дестабилаза проявляет свои свойства (т.е. гидролиз изопептидных связей) как в водных, так и в органических растворителях. Образующиеся в растворе агрегаты дестабилазы, приобретают свойства мицеллы, способной в зависимости от физико-химических свойств

растворителя менять свою пространственную ориентацию, экспонируя или гидрофильную, или гидрофобную части своей структуры (Nikonov and Titova, 1999). Таким образом, дестабилаза образует довольно прочный комплекс с простагландиновым компонентом, гирудином и ингибитором калликреина плазмы крови. Этот комплекс называют «дестабилазным комплексом» (Fradkov et al., 1996; Nikonov and Titova, 1999).

Подобная структурная организация комплекса обеспечивает не только стабилизацию входящих в его состав компонентов, но и облегчает проникновение их путём активного переноса через мембрану клетки (трансмембранный перенос) как при внутривенном, так и пероральном введении экспериментальным животным (Baskova and Nikonov, 1991).

Природа взаимосвязей дестабилазы с другими биологически активными веществами, вырабатываемыми медицинской пиявкой, пока не совсем ясна. Внутривенные инъекции очищенного нативного препарата дестабилазы приводят не только к деградации кровяного сгустка, но и к резкому повышению времени коагуляции фибриногена с тромбином и времени рекальцификации плазмы крови (Баскова и др., 1985; Baskova and Nikonov, 1991, Fradkov et al., 1996).

1.4.1 Получение рекомбинантной дестабилазы.

Первые попытки получения рекомбинантной Dest2 медицинской пиявки в *E. coli* были предприняты в 2000 г. Завалова с соавторами сообщают об использовании нескольких экспрессионных систем (Zavalova et al., 2000). Во всех случаях целевой полипептид накапливался в клетках в нерастворимой форме. Попытки отделить белок от нерастворимых телец и затем рефолдировать его в ферментативно активную форму с использованием концентрированных растворов мочевины или гуанидинхлорида с последующим диализом оказались безуспешными. Не увенчались успехом попытки получить Dest2 в дрожжах. В результате,

авторы применили бакуловирусную систему экспрессии в клетках линии IPLB-Sf бабочки *Spodoptera frugiperda*.

Дальнейшее развитие данное направление получило в следующей работе Заваловой и соавторов (Завалова и др. 2004). Для синтеза Dest2 в *E.coli* были применены векторы на базе плазмид pKK OmpA (lac-промотор), pET3A (T7 промотор) и pQE-30 (T5 промотор). Dest3 была получена в виде слитого белка с тиоредоксином с использованием плазмиды pET32. Плазмида pKK OmpA содержит кодирующий участок сигнального пептида белка внешней мембраны *E.coli*, плазмида pET3A была использована в форме с участками ДНК, кодирующими сигнальные пептиды Dest3 и дрожжевого феромона Fα1 и без сигнального пептида. Использование плазмид, кодирующих Dest2 с сигнальным пептидом, сопровождалось разрушением растущих клеток *E. coli*. В то же время, при использовании pET-3A, не кодирующей сигнальный пептид, и pQE-30 наблюдался нормальный рост бактериальной культуры. При использовании конструкции на базе pQE-30 наблюдалось значительное накопление нерастворимого продукта в виде телец включения. Однако, слитой белок тиоредоксин-Dest3 накапливался в цитоплазме в растворимом виде, вследствие чего в дальнейшей работе, после протеолитического отщепления тиоредоксина, был использован именно он. Сравнение мурамидазной активности полученной из *E. coli* Dest2 и Dest3, полученной из клеток насекомых с использованием бакуловирусной системы экспрессии показало, что активность Dest3 вчетверо превосходит Dest2 (Завалова и др., 2004).

Следующая попытка получения дестабилазы в *E.coli* оказалась более успешной. Dest2 накапливалась в клетках в виде телец включения. Осадок, полученный из клеточного лизата, растворяли в буфере, содержащем 8М мочевины, и очищали путем металл-хелатной аффинной хроматографии. Ренатурацию Dest2 проводили методом быстрого двадцатикратного разведения буфером (0,1 М Tris- ацетат, pH 8,1, 10 мМ восстановленный глутатион, 1 мМ окисленный глутатион) при интенсивном перемешивании.

Полученный препарат концентрировали с помощью ультрафильтрации и использовали в дальнейших исследованиях. Было показано, что рекомбинантная Dest2 обладает всеми типами активности, описанными для фермента, полученного из секрета слюнных желез пиявки — изопептидазной, мурамидазной и антимикробной (Завалова и др., 2010). Однако, выход целевого белка в данной работе был крайне невысок, а способ рефолдинга приводит к получению сильно разбавленных образцов. Таким образом, описанный подход не до конца удовлетворяет задаче крупномасштабного биотехнологического синтеза дестабилазы.

1.4.2 Изопептидазная активность дестабилазы.

В 80-х годах XX века было показано, что ССЖМП не обладает протеолитической активностью (Rigbi et al., 1987), однако ранее было продемонстрировано, что действие секрета увеличивает просвет сосуда в результате тромболизиса, то есть секрет проявляет фибринолитическую активность (Eldor et al., 1996). При анализе фибринолитической активности *in vitro* на стабилизированном фибрине была определена обратная зависимость: чем выше стабилизация фибрина, тем лучше он разрушается под действием ССЖМП (Баскова и др., 1984). Поэтому было предсказано существование фермента, гидролизующего ϵ -(γ -Glu)-Lys-изопептидные связи в стабилизированном фибрине. После разрушения этих связей происходит спонтанная и необратимая диссоциация молекул фибрин-мономера. В 1985 году этот фермент был выделен из ССЖМП и назван дестабилазой (Баскова и др., 1985). В 1991 году механизм действия был подтверждён на диизопептиде ϵ -(γ -Glu)-Lys и была продемонстрирована тромболитическая активность нативной дестабилазы на крысах с индуцированными тромбами (Baskova and Nikonov, 1991).

ϵ -(γ -Glu)-Lys связи соединяют γ - γ и α - α цепи соседних молекул фибрина и формируют мультимерную пространственную структуру

стабилизированного фибринового сгустка, составляющего основу тромба, обеспечивая его механическую прочность и стабильность по отношению к ферменту плазмину (Matacic and Loewy, 1968). Посредством такого рода «сшивок» связываются фибрин с α_2 -антиплазмином, фибронектином и тромбоспонином; коллаген с фибронектином и с фактором фон Виллебранда, а также обеспечивается образование полимеров фактора V (Greenberg et al., 1991). Такие связи найдены в структурных белках и в мембранных белках тромбоцитов и эритроцитов. Изопептидные ϵ -(γ -Glu)-Lys связи обнаружены в белках при ряде патологических состояниях организма. Так, при катаракте хрусталика обнаружено кросс-линкирование молекул β -кристаллина, поперечные сшивки между белками мембран эритроцитов выявлены при некоторых заболеваниях крови. Показано, что образование изопептидных связей сопровождается старением клеток (Birckbichler et al., 1973, Birckbichler et al., 1978; Kang and Baker, 2011).

В 1991 году был продемонстрирован эндо-изопептидолиз Д-димера до Д-мономеров под действием нативной дестабилазы (Завалова и др., 1991). Д-димер, белок с молекулярной массой 190 кДа – это продукт протеолитического распада фибрина. Д-димер состоит из 3-х цепей мономера фибрина (α , β , γ) и двух изопептидных связей (рисунок 4), образованных Lys405 и Gln397 на С-конце γ -цепи. Он является маркером тромбообразования, так как при этом процессе вместе с возникновением тромбов запускается и их растворение с образованием Д-димеров (Gaffney et al., 1975). Доказательством механизма расщепления Д-димера до Д-мономеров по изопептидной связи служит анализ N-концевых аминокислотных последовательностей γ -цепей Д-мономера (Zavalova et al., 1993).

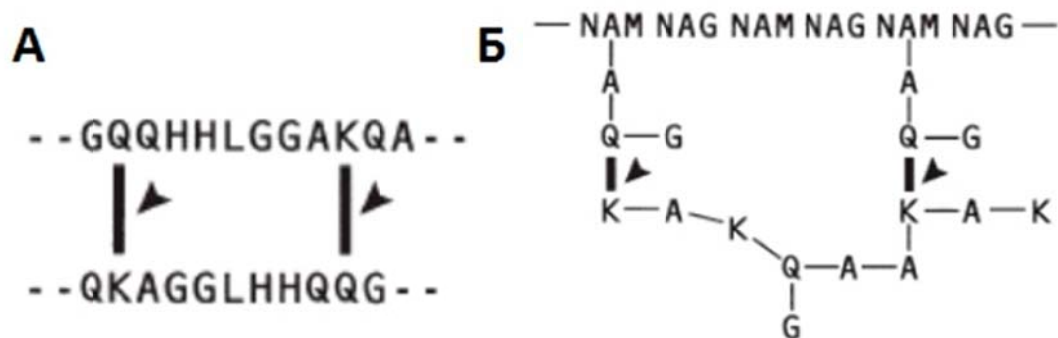


Рисунок 4. Расположение изопептидных связей в Д-димере (А) и в пептидогликане (Б) (Zavalova et al., 2006) .

Возможный путь фибринолитического действия дестабилазы показан на рисунке 5. Предполагается, что спонтанная деполимеризация дестабилизированного фибрина обусловлена перераспределением зарядов в результате того, что из-за расщепления изопептидных связей появляются остатки лизина и глутаминовой кислоты вместо остатков лизина и глутамина, исходно участвующих в образовании изопептидных связей при стабилизации фибрина фактором XIIIa в присутствии ионов кальция (Баскова, 2005; Баскова и др., 2008).

Повышенный уровень Д-димера в крови отмечается из-за вторичного фибринолиза в участке поврежденного сосуда. Накопление Д-димера влияет на состояние гемостаза таким образом, что сдвигает равновесие в сторону превращения фибриногена в фибрин и дальнейшего тромбообразования (Speiser et al., 1990). Одним из путей, способных сдвинуть это равновесие в сторону активации фибринолиза, является утилизация Д-димера (рисунок 6). В этой связи представляется важной способность дестабилазы катализировать гидролиз изопептидных связей в Д-димере.

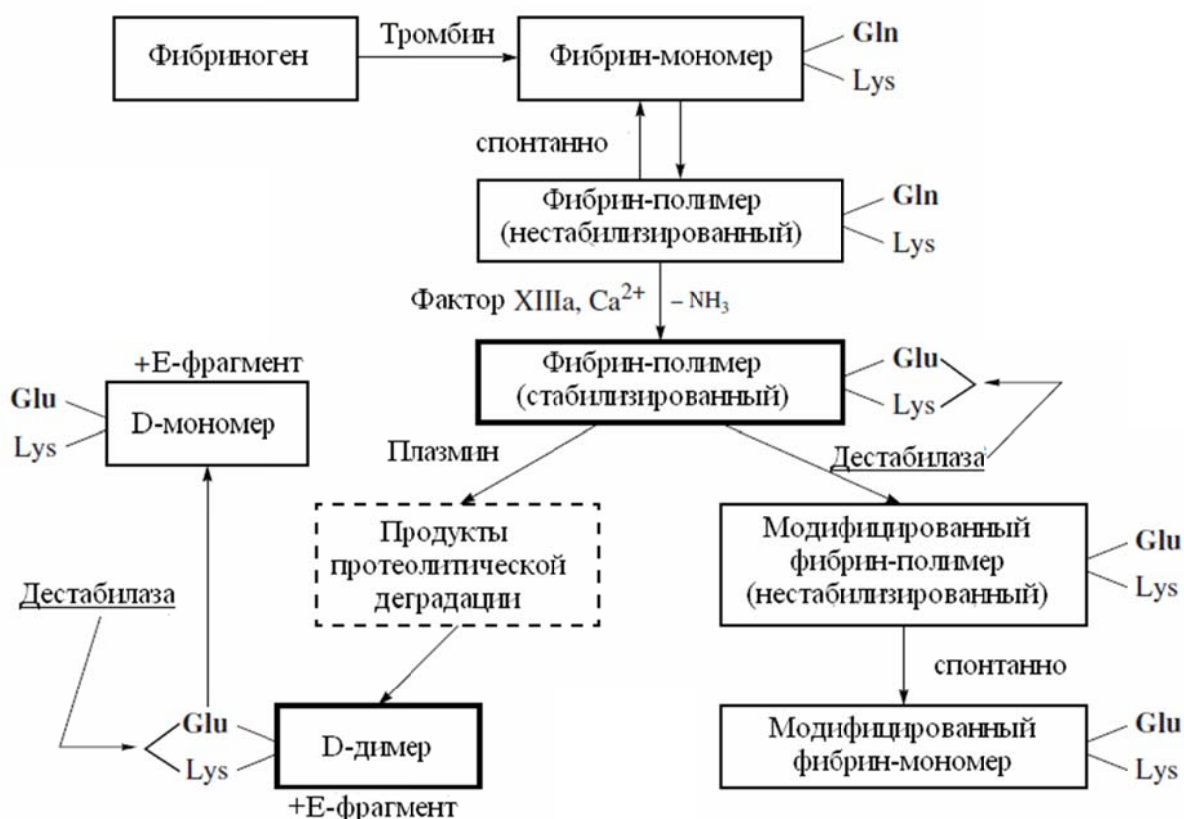


Рисунок 5. Сравнительная схема двух возможных путей разрушения стабилизированного фибрина плазмином и дестабилазой (Баскова, 2005)

На рисунке 6 представлена картина мономеризации Д-димера после инкубации с рекомбинантной Dest2. Анализ фибриногена и бычьего сывороточного альбумина (БСА) с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (SDS-PAGE) не выявил никаких изменений после инкубации с Dest2. Это указывает на избирательность действия дестабилазы в отношении гидролиза изопептидных связей, сшивающих мономеры в Д-димере, которых нет ни в фибриногене, ни в сывороточном альбумине (Завалова и др., 2010).

Интересно, что зависимость скорости реакции от концентрации Д-димера не линейна (рисунок 7). Такая кинетика типична для ферментов, имеющих более одного сайта связывания, которые характеризуются близкими по значению константами. Можно предположить, что в определённых условиях дестабилаза образует олигомеры (Баскова и др., 2008).

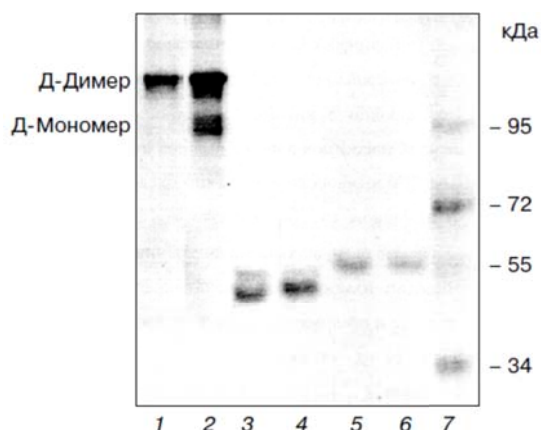


Рисунок 6. Воздействие рекомбинантной Dest2 на белковые субстраты при инкубации в течение 20 часов при 22⁰С. Исходные препараты: Д-димер из бычьей крови (1), бычий фибриноген (3), БСА (5), те же препараты после инкубации с дестабилазой (2,4,6 соответственно), 7 – маркёры молекулярных масс (Завалова и др., 2010).

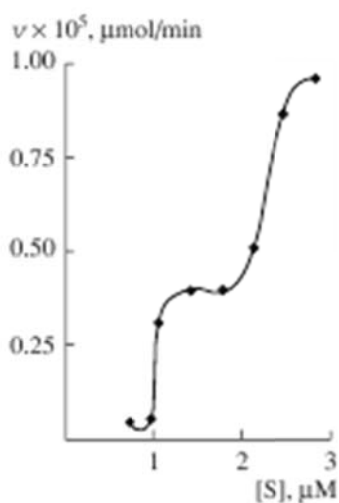


Рисунок 7. Зависимость уровня мономеризации Д-димера рекомбинантной Dest2 от концентрации Д-димера, определённой по SDS-PAGE (Баскова и др., 2008).

Показано, что дестабилаза очень чувствительна к внешним воздействиям, например, различные детергенты могут активировать у дестабилазы протеиназную функцию. Дестабилаза будет гидролизовать не

только Д-димер, но и казеин, и БСА. В то же время, в физиологических условиях дестабилаза проявляет высокую специфичность в отношении изопептидных связей и не гидролизует обычные пептидные связи (Zavalova et al., 1994). Авторы предполагают, что причиной этому может служить пространственная перегруппировка в активном центре или изменение четвертичной структуры фермента, как это было показано для TJL (Abe and Ueda 2009).

Свидетельством изопептидолиза служат результаты тонкослойной хроматографии (ТСХ) расщепления изопептида ϵ -(γ -Glu)-Lys дестабилазой, представленные на рисунке 8 (Завалова, Лазарев, 2010). Изопептид ϵ -(γ -Glu)-Lys (дорожка 2) гидролизует до соответствующих аминокислот (дорожка 3), в то время как α -(α -Glu)-Lys не претерпевает изменений в результате его инкубации с рекомбинантной Dest2 (дорожки 4 и 5).

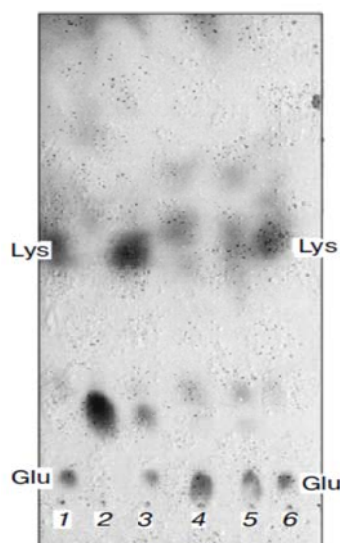


Рисунок 8. Хроматограмма продуктов 24 ч инкубации при 22⁰С рекомбинантной Dest2 с ϵ -(γ -Glu)-Lys (3) и с α -(α -Glu)-Lys (5) по сравнению с исходными дипептидами (2 и 4 соответственно). 1 и 6 - смесь глутаминовой кислоты и лизина (Завалова и др., 2010).

Свидетельством изопептидолиза служит амидолитическая активность дестабилазы в отношении хромогенного субстрата L- γ -Glu-p-NA (L- γ -

глутамил-пара-нитроанилид), ферментативная активность по отношению к которому при pH 8,0 и 37°C составила $0,15 \text{ нмоль} \times \text{с}^{-1} \times \text{мг}^{-1}$; $K_m = 2,2 \times 10^{-4} \text{ М}$; $k_{\text{кат}} = 3,53 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ (Баскова и др., 1990). Показано, что ϵ -аминокапроновая кислота, L-лизин блокируют амидолитическую активность дестабилазы. Прогревание дестабилазы на 70°C в течение 5 мин повышает изопептидазную активность на 28% (Fradkov et al., 1996; Zavalova et al., 2006).

Препараты нативной дестабилазы проявляли тромболитическое действие при внутривенном введении крысам. Спустя 67 часов после введения препарата тромбы лизировались на 67%, и только спустя 137 часов наблюдалось полное их растворение (Baskova and Nikonov, 1991). Низкая скорость тромболизиса под действием этого фермента коррелирует с низкой скоростью репарации поврежденной сосудистой стенки. Известно, что несоответствие этих параметров при срочной тромболитической терапии приводит более чем в 30% случаев к ретромбозам, чего, практически, не наблюдается при гирудотерапии. Таким образом, в предварительных исследованиях дестабилаза медицинской пиявки проявила себя как вещество, потенциально способное выступить в качестве основы для создания нового тромболитического препарата.

1.4.3 Мурамидазная активность дестабилазы. Особенности строения активного центра.

Лизоцимы (мурамидазы, ЕС 3.2.1.17) широко распространены среди эукариот и прокариот. Они катализируют гидролиз бактериальной клеточной стенки и действуют как неспецифические агенты врождённого иммунитета против бактериальных патогенов. Лизоцимы (основываясь на их структурных, каталитических и иммунологических свойствах) подразделяются на 6 типов: с-тип (куриные), g-тип (гусиные), р-тип (фаговые), бактериальные, растительные и i-тип (беспозвоночных)

(Callewaert and Michiels, 2010). Первый лизоцим i-типа был описан для морской звезды *Asterias rubens* (Perin and Jolles, 1976).

Мурамидазная активность лизоцима определяется как способность гидролизировать гликозидную связь между N-ацетилглюкозамином и N-ацетилмурамовой кислотой пептидогликана, основным компонентом бактериальной клеточной стенки (рисунок 9).

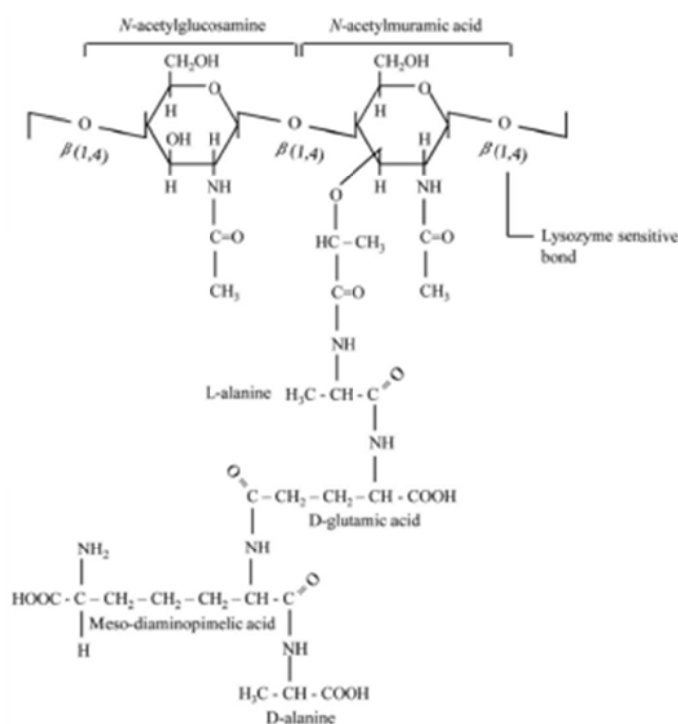


Рисунок 9. Часть периодической структуры пептидогликана клеточной стенки *E.coli* (van Heijenoort, 2011).

Но некоторые лизоцимы кроме мурамидазной активности обладают протеолитической активностью. Они гидролизуют связи между аминокислотными остатками пептидогликана, хотя структура их активного центра совпадает со структурой активных центров остальных лизоцимов (Callewaert and Michiels, 2010).

Исходя из сходств аминокислотной последовательности лизоцима *A. rubens* и дестабилазы (46,4%), была предсказана мурамидазная активность последней (Zavalova et al., 2000). Причём все три изоформы дестабилазы

имеют различие среди лизоцимов всех типов, что позволило выделить дестабилазу в новое семейство лизоцимов.

Основываясь на высокой гомологичности TJL и дестабилазы-2, была предложена трёхмерная структура последней (рисунок 10), основываясь на пространственное расположение атомов C_{α} (Завалова и др., 2012). Проводилось детальное исследование этой модели для нахождения предполагаемых сайтов мурамидазной и изопептидазной активности фермента.

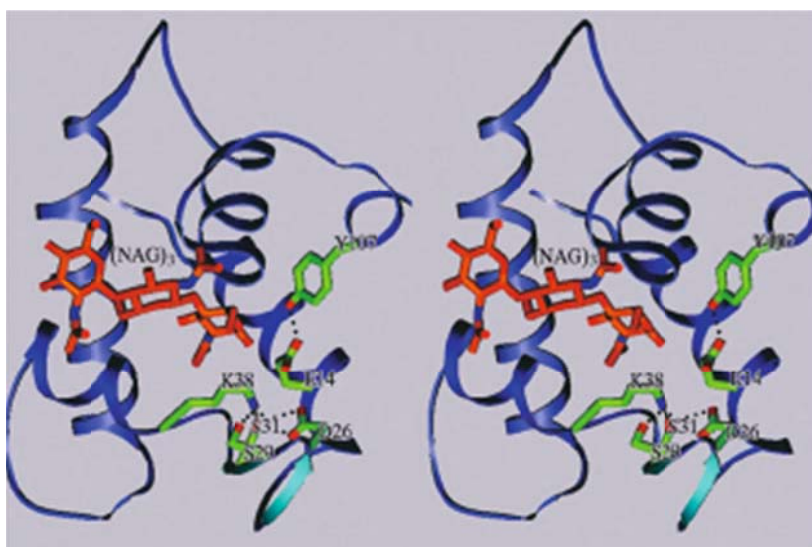


Рисунок 10. Пространственная модель структуры Dest2 в комплексе с $(NAG)_3$ (три-N-ацетилглюкозамин). Наиболее важные водородные связи между боковыми цепями показаны пунктиром (Завалова и др., 2012).

Методом сайт-направленного мутагенеза было показано, что изопептидазная активность реализуется каталитическим сайтом Ser29/Lys38. Показана функциональная роль аминокислот Glu14, Asp26, Ser29, Ser31, Lys38, His92, определяющих мурамидазную активность и был определён каталитический центр мурамидазной активности – аминокислотные остатки Glu14 и Asp26 (Завалова и др., 2012).

Одной из важных особенностей дестабилазы является разобщение изопептидазной и мурамидазной активностей. При фракционировании

нативной дестабилазы с помощью обращённо-фазовой хроматографии на колонке Vidas 300-5C4 при элюировании в линейном градиенте ацетонитрила получали фракции дестабилазы либо с мурамидазной, либо с изопептидазной функцией (Баскова и др., 2001). Хотя при гель-фильтрации рекомбинантной дестабилазы на суперозе-12 HR белок не проявлял разобщения этих активностей, но выделялись фракция высокоактивной дестабилазы (Фадеева и др., 2014). Предполагается, что при фракционировании происходит образование двух форм в зависимости от различных условий и один их активных центров может оказаться заблокированным.

Для подтверждения механизма действия дестабилазы был проведён гидролиз низкомолекулярного субстрата гекса-N-ацетилглюкозамина. Методом масс-спектрометрии был показан полный гидролиз гексамера, при этом наблюдалось появление пиков, соответствующих димеру, тримеру и тетрамеру N-ацетилглюкозамина. Количественно эта активность определялась на флуорогенном субстрате (GlcNAc)₄-MeU (4-метилумбеллиферил хитотетраозид) и сравнивалась с яичным лизоцимом (HEWL) (Завалова и др., 2010). Показано, что рекомбинантная Dest2 проявляет к субстрату значительно меньшее родство, чем HEWL, что обусловлено различиями в структуре активных центров.

В дальнейшем у беспозвоночных был обнаружен целый ряд лизоцимов, обладающих изопептидазной активностью. Среди них есть ферменты, выделенные из кольчатого червя *Eisenia andrei* (Joskova et al., 2009), морского огурца *Stichopus japonicus* (Cong et al., 2009), пресноводной устрицы *Cristaria plicata* (Dai et al., 2015), морского ушка *Haliotis discus* (Bathige et al., 2013), моллюска *Meretrix meretrix* (Yue et al., 2011), красного болотного рака *Procambarus clarkii* (Zhang et al., 2010). Данные белки имеют молекулярную массу 12,3 - 17,8 кДа. Наибольшее сходство с дестабилазой имеет лизоцим из червя *E. andrei*: эти белки имеют идентичные аминокислотные остатки в 72% позиций. У красного болотного рака было

обнаружено два новых лизоцима, Pclysi1 и Pclysi2, имеющие сходный тканеспецифичный профиль. Синтез обоих белков активируется при бактериальном воздействии на организм рака. Zhang с соавторами получили рекомбинантные Pclysi1 и Pclysi2 в *E.coli* и исследовали их свойства (Zhang et al., 2010). Оказалось, что они существенно различаются по своей ферментативной активности. Pclysi1 не имел изопептидазной и мурамидазной активностей, но проявлял антибактериальные свойства. Pclysi2 имел низкую мурамидазную активность и не имел антибактериальной активности, но проявлял высокую изопептидазную активность. Таким образом, можно предположить, что мурамидазная и изопептидазная активности лизоцимов беспозвоночных (в том числе, и дестабилазы) реализуются независимо друг от друга.

1.4.4 Антимикробная активность дестабилазы.

В ряде публикаций последних лет сообщается об антимикробной активности лизоцимов, не зависящей от их мурамидазной функции (Kluter et al., 2014; Yuceer and Caner, 2014; Cosentino et al., 2016; Park et al., 2016). Неферментативные антибактериальные функции были найдены у лизоцимов куриного, гусиного, фагового и человеческого типов (например, лизоцим белка куриного яйца, HEWL). Отделение мурамидазной функции от общей антимикробной, происходит путём инактивации мурамидазной функции продолжительным нагревом. Денатурированный нагревом лизоцим был способен блокировать рост бактерий. Данная активность была обнаружена у HEWL и у лизоцима фага T4, а также у их фрагментов с альфа-спиральными участками (Callewaert and Michiels, 2010). Их антимикробное действие связано с наличием амфипатической альфа-спирали, содержащей положительно заряженные аминокислотные остатки, что обеспечивает взаимодействие с липополисахаридами и липотейхоевой кислотой в клеточных мембранах. Но представители i-лизозимов такого домена не

содержат. Поэтому была проанализирована активность не только самого белка, но и его альфа-спирализованных фрагментов.

В работе рекомбинантную Dest2 инкубировали при 100⁰С в течение 5-50 мин. Оказалось, что инкубирование в течение 5 минут привело к уменьшению мурамидазной активности на 16%, а 20 мин – 22%. Полная инактивация фермента происходила после 40 мин прогрева. Неферментативная антимикробная активность фермента проверялась на клетках *E. coli* и *M. luteus* (Zavalova et al., 2006). Была показана антимикробная активность одного альфа-спирального амфипатического пептида (остатки 67-77) по отношению к *E. coli*, *M. luteus*, *Bacillus brevis* и *Streptomyces chrisomallus* (Завалова и др., 2010).

Для анализа антимикробного действия дестабилазы использовали клетки *Methanosarcina barkeri* (традиционного модельного объекта исследования архей), чьи клеточные стенки состоят преимущественно из белков и из гетерополисахаридов, но не содержат ни муреина, ни псевдомуреина. Как известно, клетки архей отличаются от клеток других доменов прокариот и эукариот прежде всего химическим составом и строением их цитоплазматической мембраны.

Об ингибирующем действии рекомбинантного белка на рост клеток архея *M. barkeri* судили по уменьшению оптического поглощения суспензии клеток при 600 нм в семь раз через сутки культивирования при 37⁰С.

Дестабилаза вызывает практически полный лизис клеток. При этом наблюдается образование характерного осадка – флоков, что свидетельствует о нарушении нормального физиологического состояния культуры, большинство клеток которой лизировалось (рисунок 11).

На рисунке 11 представлен вид клеток архея *M. barkeri* до и после инкубации с рекомбинантной Dest2 (концентрация 35 мкг/мл) при 37⁰ в течение 1 ч. Эти результаты свидетельствуют о том, что дестабилаза приводит к быстрому лизису конгломератов клеток *M. barkeri*, который

происходит без участия ферментативной (гликозидазной) активности дестабилазы.

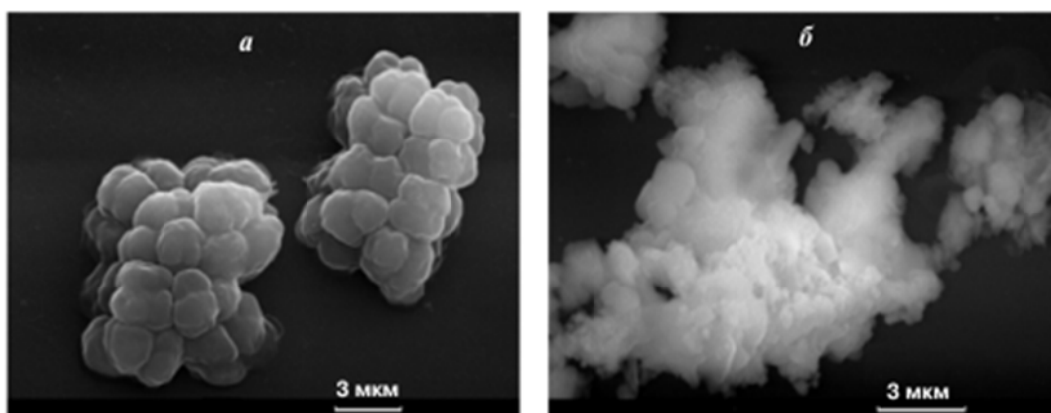


Рисунок 11. Фотография со сканирующей электронной микроскопии конгломератов клеток *M. barkeri* до (а) и после (б) их инкубации с рекомбинантной Dest2 (Завалова и др., 2010).

Можно предположить, что воздействие дестабилазы на клетки *M. barkeri* обусловлено суммарным эффектом, который зависит как от свойств и характеристик самого фермента, так и от выбранных условий взаимодействия фермента с клетками (Завалова и др., 2010):

1) во-первых, непосредственное воздействие амфипатических фрагментов белка на клеточную стенку и перфорирование цитоплазматической мембраны *M. barkeri* путем взаимодействия его гидрофильных положительно заряженных фрагментов с отрицательно заряженными участками липидного слоя;

2) во-вторых, не исключена вероятность присутствия в составе клеточной стенки *M. barkeri* самих изопептидных связей ϵ -(γ -Glu)-Lys;

3) в-третьих, еще один возможный механизм, приводящий к лизису клеток *M. barkeri*, заключается в том, что при взаимодействии амфипатического фрагмента фермента с клеточной оболочкой может произойти изменение структуры остальной части белковой молекулы

дестабилазы, что приведет к изменению её свойств и по принципу кооперативности усилит перфорирование клеточной стенки.

Антимикробная активность дестабилазы была показана на грибах *Botrytis cinerea*, *Verticillium lateriticum*, дрожжах *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida guilliermondii*, грамположительных (*M. luteus*) и грамотрицательных бактериях (*E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*) (Zavalova et al., 2006).

Подводя итог, следует заметить, что дестабилаза, несмотря на свой небольшой размер, обладает полифункциональностью: дестабилаза проявляет изопептидазную, мурамидазную и антибактериальную активности. Механизм неферментативной антибактериальной активности до конца не ясен. Благодаря своим свойствам, дестабилаза может использоваться в качестве препарата для разрушения тромбов, не путём протеолиза, а путём изопептидолиза. Данная работа посвящена получению и изучению известных на сегодняшний день изоформ дестабилазы. Мы надеемся, что полученные результаты помогут более полно охарактеризовать данный фермент и понять природу его полифункциональности.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Реактивы и материалы.

В работе использовали реактивы фирм «Merck» (Германия), «Sigma» (США), «Хеликон» (Россия) и реактивы квалификации х.ч. и о.с.ч. отечественного производства; наборы для рестрикции, лигирования и ПЦР фирмы ThermoScientific (США), Taq-полимеразу (НПФ «Литех», Россия), ампициллин ОАО «Синтез» (Россия); дрожжевой экстракт, бактоагар, триптон, пептон (Difco, США); клеточные стенки *M. lysodeikticus*, HEWL, протеиназа К, РНК-аза А (Sigma-Aldrich, США); фибриноген, тромбин (Технология-Стандарт, Россия), ДНК-маркеры молекулярной массы, белковые маркеры молекулярной массы фирмы ThermoScientific (США), бычий сывороточный альбумин (БСА) и QuickStart™ Bradford 1xDyeReagent фирмы Bio-rad (США), наборы GeneJET Gel Extraction Kit и GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, США), хроматографические сорбенты CM Sepharose® Fast Flow и Ni Sepharose High Performance (GE Healthcare Life Sciences, США).

2.2 Штаммы и плазмиды.

В работе были использованы бактериальные штаммы *E.coli* Top10, Origami(DE3), Origami(DE3)pLysS, BLR, BLRpLysS, BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, BL21(DE3)-Gold, B834 фирм Novagen (США) и Life Technologies (США). В процедурах клонирования и экспрессии использовались плазмиды серии pET (Novagen, США), pBAD и pcDNA3.1 (Life Technologies, США), а также набор PichiaPink Expression System kit (Life Technologies, USA). Плазмиды pURLV, pURLH, pURLB, pURLT, pUC18R(H) были любезно предоставлены В. А. Мануверой (ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России).

2.3 Полимеразная цепная реакция (ПЦР).

ПЦР проводили в объёме 20 – 25 мкл при 2-3мМ MgCl₂; 0,2 мМ каждого из dNTP; 67мМ Tris-HCl (pH8,3); 16,7мМ (NH₄)₂SO₄; 0,5 ед. Taq-полимеразы; 1-10 нг ДНК; 5 пмоль каждого праймера. Режим амплификации (°C /сек): 1) 95/120; 2) 95/10; 3) 60/10; 4) 72/20; 5) 72/180. Стадии 2-4 – 25-30 циклов; стадии 1,5 – 1 цикл.

2.4 Олигодезоксирибонуклеотиды.

Таблица 2.

Список используемых олигонуклеотидов.

Название	Структура 5' ->3'
DsEc-Bam	TGGATCCCAGTTTACCGATAGCTGCCTGCGTTGCATTTGCAAAG
DsEc-02	CCTGCGTTGCATTTGCAAAGTGGAAGGCTGCGATAGCCAGATTG
DsEc-03	AGGCTGCGATAGCCAGATTGGCAAATGCGGCATGGATGTGGGCAG
DsEc-04	TGCGGCATGGATGTGGGCAGCCTGAGCTGCGGTCCGTATCAGAT
DsEc-05	AGCTGCGGTCCGTATCAGATTAAGAAACCGTATTGGATTGATTGC
DsEc-06	GAAACCGTATTGGATTGATTGCGGCAAACCGGGTGGTGGCTATGA
DsEc-07	CAAACCGGGTGGTGGCTATGAAAGCTGCACCAAAAACAAAGCGTG
DsEc-08	TACGCACGCACGCAGGTTTCGCTGCACGCTTTGTTTTTGGTGCAG
DsEc-09	GCAAAAGGTGCCATAACGTTTCATATACGCACGCACGCAGGTTTCG
DsEc-10	CAGGTCGGAGTACGACCACCGGTGCAAAAGGTGCCATAACGTTTCA
DsEc-11	CGTTATGAATACGCGCATAATCCTGGCAGGTCGGAGTACGACCAC
DsEc-12	GCTTTTGCAGCCACGCGGACCACCGTTATGAATACGCGCATAATC
DsEc-13	TGTTCCAATAGCCCACGGTCGCGCTGCTTTTGCAGCCACGCGGA
DsEc-14	TCAACGCAGGCATTTCTGCACTTTGTTCCAATAGCCCACGGTC
DsEc-Sal	ATTAGTCGACTCAACGCAGGCATTTCTGCA
DsEc-00	TGCGTCCGTGGAAGTTAATTCCCAGTTTACCGATAGCTGCCT

DsEc-01	GGAATTAAC TTCCACGGACGCAATCAGCAGCGCCAGGGACAC
SP-Bam	ATGGATCCATGATTATTGCGATTTATGTGTCCCTGGCGCTGCTG
CrDes2	TGGATCCGTGGAAGTTAATTCCCAGTTTACCGATAGCTGCCTG
Ds1-01	GTGCTGGTGGCGCTGTATGTGATTGATGTGGCGAAATGCACCGT
Ds1-02	ATGTGGCGAAATGCACCGTGCCGTCCGATTGCCTGTCCTGCATTTGC
Ds1-03	GATTGCCTGTCCTGCATTTGCGAAGTGGAAGGCTGCGATAAAG
Ds1-04	AGTGGAAGGCTGCGATAAAGAAATTGGCCGTTGCGGCGATGATGC
Ds1-05	GCCGTTGCGGCGATGATGCGGGCTCCCTGTCCTGCGGCCCCGTATC
Ds1-06	TGTCCTGCGGCCCCGTATCAGATTAAAGAACCGTATTGGATTGATTG
Ds1-07	AGAACCGTATTGGATTGATTGCGGTTCCCCTGGTGCGGGGCTATCAG
Ds1-08	GAGCACGCTTTTTCTTTGGTGCATTCCTGATAGCCCGCACCAGG
Ds1-09	CATATACGCATGCACGCAGGTTTCGGAGCACGCTTTTTCTTTGGTG
Ds1-10	GTGCAACGACGAAAATAACGATCCATATACGCATGCACGCAGGT
Ds1-11	TGGCAGGTTCGGTTCACGACCACGGGTGCAACGACGAAAATAACG
Ds1-12	ACCCATATTATGAATTTTCGCATAATCCTGGCAGGTTCGGTTCACGA
Ds1-13	GAGGTACGACGGCAGCCATTCGGACCCATATTATGAATTTTCGCA
Ds1-14	CATTCGCTTTATTCCAATAGGTATTGGAGGTACGACGGCAGCCA
Ds1-Sal	ATTAGTCGACTTAATTCAGGCACGCATTCGCTTTATTCCAATAGG
pDs1-Bam	AGGATCCATGAATTATGTGATTTTTGTGGTGCTGGTGGCGCTGTATG
CrDes1	ATGGATCCGATGTGGCGAAATGCACCG
mDs1-Bam	TGGATCCACCGTGCCGTCCGATTGC
dest3-bam0	CATGGATCCACCGTGCCGAGCGATTGC
dest3-bam5	CATGGATCCGATGTGGCGAAATGCACCG
dest3-bam	CATGGATCCATGAACTATGTGATTTTCGTGGTGCTGGTGGCACTGT
dest3-sal	TTAGTCGACTCAGCCCAGGCAACGACGCACGTTATC
dest3-1	CGTGGTGCTGGTGGCACTGTATGTGATTGATGTGGCGAAATGCAC
dest3-2	TGATTGATGTGGCGAAATGCACCGTGCCGAGCGATTGCCTGCGTTGC
dest3-3	CGAGCGATTGCCTGCGTTGCATTTGCCAGGTGGAAGGCTGCA
dest3-4	TGCCAGGTGGAAGGCTGCAACAACGAAATTGGCCGTTGCGGCA

dest3-5	CGAAATTGGCCGTTGCGGCATGGATGCAGGCAGCCTGAGCTGCG
dest3-6	TGCAGGCAGCCTGAGCTGCGGCCCCGTATCAGATTAAAGAACCGT
dest3-7	CGTATCAGATTAAAGAACCGTATTGGATTGATTGCGGGTCGTC
dest3-8	GTGCACTGCTGATAACCACCACCCGGACGACCGCAATCAATCCA
dest3-9	ACGTTCGCTGCACGCTTTCTCTTTGGTGCACCTGCTGATAACCAC
dest3-10	ACGATCCATATACGCATGCACGCAACGTTTCGCTGCACGCTTTCT
dest3-11	GACCACCGGTACAACGACGCGCATAACGATCCATATACGCATGCAC
dest3-12	TCGCATAATCCTGGCAGGTCGGCTGACGACCACCGGTACAACGACGC
dest3-13	AGCCGTTTCGGGCCCCATGTTGTGAATTTTCGCATAATCCTGGCAGGTC
dest3-14	CAGTAGTGGTTGTTGCTGCTCTGGCAGCCGTTTCGGGCCCCATGTTGTG
dest3-15	CAGGCAACGACGCACGTTATCCCAGTAGTGGTTGTTGCTG
SP-01m	CAAGAATCAGTAAATTGGGAATTA ACTTCCACGGACGCAATC
SP-02	GGAATTA ACTTCCACGGACGCAATCAGCAGCGCCAGGGACAC
SP-Koz	CGCCACCATGATTATTGCGATTTATGTGTCCCTGGCGCTG
CYC1	GGGACCTAGACTTCAGGTTG
AOX1	GACTGGTTCCAATTGACAAGC
6His-KPN	TCAATGGTGATGGTGATGATGGGTAC
DY-3Kpn	CTTTGGTACCTCATCTCAAACACTTTTGAACCT
DY-5Bl	ATGCAATTTACTGATTCTTGTTTGAGA
DY01	CAATTTACTGATTCTTGTTTGAGATGTATTTGTAAGGTTGAAGGT
DY02	GTATTTGTAAGGTTGAAGGTTGTGATTCTCAAATTGGTAAGTGTG
DY03	GATTCTCAAATTGGTAAGTGTGGTATGGATGTTGGTTCTTTGTC
DY04	GTATGGATGTTGGTTCTTTGTCTTGTGGTCCATACCAAATTAAGAAGC
DY05	GGTCCATACCAAATTAAGAAGCCATACTGGATTGATTGTGGT
DY06	CCATACTGGATTGATTGTGGTAAGCCAGGTGGTGGTTACGAATC
DY07	CCAGGTGGTGGTTACGAATCTTGTACTAAGAACAAGGCTTGTTT
DY08	GTACTAAGAACAAGGCTTGTTCTGAACTTGTGTTAGAGCTTACA
DY09	GAACTTGTGTTAGAGCTTACATGAAGAGATACGGTACTTTTTGTAC
DY10	AAGAGATACGGTACTTTTTGTACTGGTGGTAGAACTCCA ACTTGTC

DY11	GTGGTAGAACTCCAACTTGTCAAGATTACGCTAGAAATCCATAACG
DY12	GATTACGCTAGAAATCCATAACGGTGGTCCAAGAGGTTGTAAGTC
DY13	GGTCCAAGAGGTTGTAAGTCTTCTGCTACTGTTGGTTACTGGAAC
DY14	GCTACTGTTGGTTACTGGAACAAGGTTCAAAAGTGTTTGAGATGA

2.5 Конструирование плазмид, кодирующих *Dest2*, под контролем промотора арабинозного оперона *E.coli*.

Для клонирования участка ДНК, кодирующего *Dest2*, использовали коммерчески доступные плазмиды pBAD/GIII-B и pBAD/Мус-HisA (LifeTechnologies, США). Кодирущая часть гена *dest2* была амплифицирована путём ПЦР с использованием олигонуклеотидов DestN-BglI и DestN-Sal (таблица 2) и плазмиды pQE-Dest, любезно предоставленной И. П. Басковой (МГУ им. М. В. Ломоносова) в качестве матрицы. Полученный ДНК-фрагмент расщепляли эндонуклеазами рестрикции BglII и SalI. Реципиентные плазмиды pBAD/GIII-B и pBAD/Мус-His обрабатывали теми же эндонуклеазами, лигировали с полученным фрагментом и трансформировали продуктами реакции клетки *E.coli* Top10, которые высевали на чашки Петри с агаризованной средой LB, содержащей ампициллин в концентрации 100мкг/мл. Выросшие колонии анализировали путём ПЦР клеточной суспензии с использованием олигонуклеотидов DestN-BglI и DestN-Sal. Колонии, содержащие плазмиды со вставкой, пересеивали в жидкую среду LB, после чего из культуры выделяли плазмидную ДНК. Соответствие структуры полученных плазмид ожидаемой подтверждали путем секвенирования по методу Сэнгера с использованием капиллярного секвенатора AbiPrism 3730xl (Applied Biosystems, США).

2.6 Конструирование плазмид, кодирующих Dest2, под контролем промотора гена уридинфосфорилазы *E.coli*.

Фрагмент ДНК, кодирующий Dest2 (GenBank: U24122.1), клонировали в составе плазмид pURLB, pURLH, pURLV, pURLT и pUC18R(H). Первые четыре из них имеют в своем составе участки ДНК, кодирующие сигнальные пептиды стафилококкового энтеротоксина В (pURLB), стафилококкового энтеротоксина Н (pURLH), стрептавидина (pURLV) и триметиламин-N-оксидоредуктазы *E.coli* (pURLT). Кодированная часть гена была амплифицирована путем ПЦР с использованием олигонуклеотидов DestN-Bam и DestN-Sal и плазмиды pQE-Dest в качестве матрицы. Полученный ДНК-фрагмент и реципиентную плазмиду расщепляли эндонуклеазами BamHI и SalI, Дальнейшие действия проводились аналогично тому, как это описано в пункте 2.5

2.7 Получение реципиентных плазмид pETmin и pET15MCS.

На основе коммерчески доступных плазмид pET-22b и pET-15b (Novagen, США) были получены плазмиды с измененным полилинкером (pET15MCS) и удалённым сигнальным пептидом (pETmin). Для этого pET-22b и pET-15b обрабатывали эндонуклеазами NdeI и BamHI. К раствору расщепленной плазмиды добавляли раствор, содержащий эквимольные количества олигонуклеотидов 15MCSf и 15MCSr (таблица 2) в молярном отношении олигонуклеотид:плазмида равным 2000:1. Дальнейшие операции выполняли как описано в пункте 2.5. Таким образом, из плазмиды pET-15b была получена плазида pET15MCS, содержащая, как и исходная, участки, кодирующие гексагистидиновую последовательность и сайт расщепления тромбина, введённый полилинкер и терминатор транскрипции.

2.8 Получение плазмид pETmin/C-Dest и pET15/N-Dest.

Для получения Dest2, имеющей в своем составе гексагистидиновые участки в N-концевой (N-Dest2) либо C-концевой (C-Dest2) части белка, нами была амплифицирована структурная часть *Dest2* без стоп-кодона с использованием олигонуклеотидов DestN-Bam и DestN-Sal (таблица 2) и матричной ДНК – плазмиды pQE-Dest. Полученный ДНК-фрагмент клонировали в составе плазмид pET15MCS и pETmin. Для этого ПЦР-фрагмент обрабатывали ферментами BamHI и SalI. Плазмиду pET15MCS расщепляли с помощью тех же ферментов, а pETmin – посредством BamHI и XhoI. Дальнейшие операции выполняли как описано в пункте 2.5.

2.9 Получение плазмиды pETmin/min-Dest.

Для получения дестабилазы, не имеющей дополнительной гексагистидиновой последовательности, мы встроили в плазмиду pETmin участок ДНК, кодирующий *Dest2* и имеющий стоп-кодон. Конструирование проводили аналогично тому, как это описано в пункте 2.8 для pETmin/C-Dest, за исключением того, что для ПЦР-амплификации использовали олигонуклеотиды DestN-Bam и DestN-min (таблица 2).

2.10 Получение плазмиды pET32/Dest.

Структурная часть гена *dest2*, имеющая стоп-кодон была ПЦР-амплифицирована с использованием олигонуклеотидов DestN-Bam и DestN-Sal (таблица 2) и матричной ДНК – плазмиды pQE-Dest. Полученный ДНК-фрагмент клонировали в составе плазмиды pET-32a(+) (Novagen, США). Для этого ПЦР-фрагмент, очищенный с помощью электрофореза в агарозном геле, обрабатывали ферментами BamHI и SalI. Плазмиду расщепляли с помощью тех же ферментов. Дальнейшие операции выполняли как описано в пункте 2.5.

2.11 Синтез оптимизированного по кодонному составу для *E.coli* фрагмента ДНК, кодирующего Dest2 и получение плазмид pET-15/N-Dest+, pETmin/C-Dest+.

Фрагмент ДНК, кодирующий Dest2, был получен путем ферментативной достройки синтетических олигонуклеотидов. Для этого готовили смесь олигонуклеотидов DsEc02-DsEc14 (таблица 2) с концентрацией каждого олигонуклеотида 10мкМ. 1мкл смеси переносили в пробирку, содержащую 20мкл раствора следующего состава: однократный ПЦР-буфер (Литех, Россия), 0,2мМ каждого из дезоксинуклеозидтрифосфатов, 0,25ед. Taq-полимеразы. Реакционную смесь подвергали циклическому изменению температуры в режиме: 95°C - 10с, 60°C -10с, 72°C – 15с, суммарно 25 циклов. Продукты реакции использовали в качестве матрицы в ПЦР-реакции с использованием олигонуклеотидов DsEc-Bam и DsEc-Sal в качестве праймеров. ПЦР-фрагмент клонировали в составе плазмид pET15MCS (pET-15/N-Dest+) и pETmin (pETmin/C-Dest+) аналогично тому, как это описано в пунктах 2.8 и 2.9.

2.12 Синтез оптимизированного по кодонному составу для *E.coli* фрагмента ДНК, кодирующего Dest1 и 3. Получение плазмид pET-Dest1, pET-Dest3.

Фрагмент ДНК, кодирующий Dest1, был получен, как описано в пункте 2.11. Для этого готовили смесь олигонуклеотидов Ds1-01 - Ds1-14 (таблица 2) и проводили первый этап ПЦР. Продукты реакции использовали в качестве матрицы в ПЦР-реакции с использованием олигонуклеотидов Ds1-Sal и pDs1-Bam в качестве праймеров.

Для получения фрагмента ДНК, кодирующего Dest3, готовили смесь олигонуклеотидов dest3-1 - dest3-15 (таблица 2) и проводили первый этап

ПЦР. Продукты реакции использовали в качестве матрицы в ПЦР-реакции с использованием олигонуклеотидов dest3-sal и dest3-bam5 в качестве праймеров.

ПЦР-фрагменты клонировали в составе плазмиды pET15MCS, как это описано в пункте 2.8.

2.13 Синтез оптимизированного по кодонному составу для клеток эукариот фрагмента ДНК, кодирующего Dest2.

Фрагмент ДНК, кодирующий Dest2, был получен аналогично тому, как описано в пункте 2.11. Для первого цикла ПЦР использовали олигонуклеотиды DY01-DY14 (таблица 2). Продукты реакции использовали в качестве матрицы в ПЦР-реакции с использованием олигонуклеотидов DY-5B1 и DY-3Kpn в качестве праймеров

2.14 Получение плазмиды pET-SlyD-Dest2.

Для получения плазмиды, кодирующей слитой белок SlyD-Dest2, была использована плазида pET-SlyD, любезно предоставленная Михаилом Шнейдером (ИБХ РАН). Синтетический фрагмент, кодирующий Dest2 с кодонным составом, оптимизированным для экспрессии в *E.coli*, амплифицировали с использованием олигонуклеотидов DsEc-Bam и DsEc-Sal (таблица 2). Полученный ДНК-фрагмент обрабатывали эндонуклеазами BamHI и SalI совместно с плазмидой. Продукты реакции подвергали лигированию. Далее, выполняли стандартные операции по трансформации *E.coli*, ПЦР-отбору колоний, выделению плазмид и секвенированию. В результате, мы получили плазмиду pET-SlyD-Dest2, несущую ген слитого белка SlyD-Dest2 с N-концевым гексагистидиновым мотивом под контролем промотора поздних генов бактериофага T7.

2.15 Получение плазмид для трансформации дрожжей *P.pastoris*.

Рекомбинантную Dest2 в дрожжах *P.pastoris* получали с помощью набора PichiaPink Expression System (Life Technologies, USA). В состав данного набора входит две плазмиды (pPink-НС и pPink-LC) и четыре штамма дрожжей (с разной комбинацией делеций генов протеиназ А и В). Кроме того, имеются восемь фрагментов ДНК, кодирующих различные сигнальные пептиды (альфа-амилазы *Aspergillus niger*, глюкоамилазы *Aspergillus awamori*, сывороточного альбумина *Homo sapiens*, инулиназы *Kluyveromyces fragilis*, лизоцима *Gallus gallus*, инвертазы, альфа-фактора спаривания и белка-киллера *Saccharomyces cerevisiae*). Мы получили все шестнадцать возможных вариантов плазмид, кодирующих Dest2, следуя схеме, рекомендованной производителем набора. Для этого, синтетический фрагмент, кодирующий дестабилазу с кодонным составом, оптимизированным для экспрессии в дрожжах, амплифицировали с использованием олигонуклеотидов DY-5B1 и DY-3Kpn (таблица 2). Полученный ДНК-фрагмент обрабатывали эндонуклеазой KpnI. Плазмиды pPink-НС и pPink-LC обрабатывали эндонуклеазами EcoRI и KpnI. ДНК-фрагмент, расщепленную плазмиду и участок, кодирующий сигнальный пептид, объединяли и проводили лигирование в условиях, рекомендованных производителем набора. Отбор целевых клонов, выделение плазмид и секвенирование выполняли по стандартным методикам. Полученные плазмиды расщепляли эндонуклеазой KpnI и лигировали с дуплексом из олигонуклеотидов His-KpnF и His-KpnR, кодирующих гексагистидиновый мотив. Далее, выполняли стандартные операции по трансформации *E.coli*, ПЦР-отбору колоний, выделению плазмид и секвенированию. В результате, мы получили плазмиды на основе pPink-НС и pPink-LC, кодирующие Dest2, имеющую один из восьми сигнальных пептидов и С-концевой гексагистидиновый мотив.

2.16 Получение плазмиды pcDNA3.4-Dest-2.

Плазмиду для экспрессии гена Dest2 в культуре клеток человека линии Expi293F конструировали с использованием набора pcDNA3.4-TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, USA). ДНК-фрагмент, кодирующий зрелую дестабилазу с С-концевым гексагистидиновым мотивом получали путем ПЦР-амплификации с использованием олигонуклеотидов CYC1 и mDest5 (таблица 2) и плазмиды pHС-sAmy-mDest-6His (плазмида для получения Dest2 в дрожжах *P. pastoris*, содержащая гексагистидиновый мотив и сигнальный пептид амилазы *A. niger*) в качестве матрицы. Полученный фрагмент очищали путем препаративного электрофореза в агарозном геле и использовали в реакции достройки с целью введения последовательности, кодирующей аутентичный сигнальный пептид. Для этого в ПЦР-пробирку помещали смесь следующего состава: 1^х ПЦР-буфер, 2мМ dNTP, 10нг ДНК-фрагмента, 0,5ед. Taq-полимеразы и по 1пкМ олигонуклеотидов CYC1, SP-KOZ, SP-01m, SP-2 в объеме 20мкл (все компоненты производства ООО НПФ Литех, Россия). Реакционную смесь подвергали циклической температурной обработке: 95°C-10sec, 60°C-10sec, 60°C-10sec, всего 15 циклов. Продукты реакции использовали в качестве матрицы для ПЦР-амплификации с олигонуклеотидами SP-KOZ и 6His-KPN (таблица 2). Полученный ДНК-фрагмент клонировали в составе плазмиды pcDNA3.4-TOPO в соответствии с рекомендациями фирмы Invitrogen. В результате получена плазмида pcDNA3.4-Dest2, кодирующая Dest2 с собственным сигнальным пептидом, имеющую С-концевой гексагистидиновый мотив.

2.17 Оптимизация схемы культивирования штаммов-продуцентов рекомбинантной дестабилазы.

2.17.1 Оптимизация схемы культивирования штаммов-продуцентов рекомбинантной Dest2 слитой с тиоредоксином (Trx-Dest2).

Мы провели культивирование штаммов-продуцентов Dest2 при различных температурах (25°C, 30°C, 37°C) и в присутствии двух типов индуктора – D-лактозы или IPTG в разных концентрациях:

1) в пробирку, содержащую 2мл LB, помещали отдельную колонию, добавляли лактозу до концентрации 10мМ, 1мМ и 0,1мМ и инкубировали 18 часов при температуре 25°C, 30°C и 37°C;

2) в пробирку, содержащую 2мл LB, помещали отдельную колонию, инкубировали в течение ночи при 37°C. Затем, 50мкл ночной культуры переносили в пробирку с 2мл свежей среды, подращивали при 37°C до $OD_{600}=0,8$ и добавляли лактозу до концентрации 10мМ, 1мМ и 0,1мМ. Инкубировали 4 часа при температуре 25°C, 30°C и 37°C;

3) в пробирку, содержащую 2мл LB, помещали отдельную колонию, инкубировали в течение ночи при 37°C. Затем, 50мкл ночной культуры переносили в пробирку с 2мл свежей среды, подращивали при 37°C до $OD_{600}=0,8$ и добавляли IPTG до концентрации 1мМ, 0,1мМ и 0,01мМ. Инкубировали 4 часа при температуре 25°C, 30°C и 37°C.

Культивирование проводилось в шейкере-инкубаторе в присутствии ампициллина в концентрации 100 мг/л.

2.17.2 Оптимизация схемы культивирования штаммов-продуцентов рекомбинантной Dest2: BL21(DE3)-Gold -pET15/N-Dest+ и BL21(DE3)-Gold -pETmin/minDest.

Мы опробовали четыре схемы культивирования штаммов-продуцентов Dest2:

1) высевались отдельные колонии в среду, содержащую индуктор. Время роста 18ч и 24ч;

2) отдельные колонии высевались в среду без индуктора и культивировались при 37°C в течение ночи. Ночную культуру добавляли к свежей среде в количестве 1/20 объема и подращивали до $OD_{600}=0,8$, после чего добавляли индуктор и растили 4ч, 16ч и 24ч;

3) отдельные колонии высевались в среду без индуктора и культивировались при 37°C в течение ночи. Ночную культуру добавляли к свежей среде в количестве 1/20 объема и подращивали до $OD_{600}=2,0$, после чего добавляли индуктор и растили 4ч, 16ч и 24ч;

4) отдельные колонии высевались в среду без индуктора и культивировались при 37°C в течение ночи. Клетки осаждали центрифугированием и ресуспендировали в объеме свежей среды, равном объему исходной ночной культуры. После инкубации в течение часа, добавляли индуктор. Растили 4ч, 16ч и 24ч.

Каждый вариант культивирования проводился в восьми вариантах. Испытывались индукторы в разных концентрациях — лактоза 10мМ и 1мМ, IPTG – 1мМ и 0,1мМ. Во всех случаях рост проходил при двух температурах – 37°C и 25°C.

2.18 Получение изоформ дестабилазы (Dest1, 2, 3) с гексагистидиновым мотивом в *E. coli*, ренатурированных из телец включения.

Отдельные колонии *E.coli*, штамма BL21(DE3)-Gold, трансформированные плазмидами, кодирующие дестабилазу трёх изоформ, высевались в среду SB (3,5% триптона, 2% дрожжевого экстракта, 0,5% NaCl) (50 мл) без индуктора и культивировались при 37°C в течение ночи. Ночную культуру добавляли к одному литру свежей среды SB и подращивали до $OD_{600}=0,8$, после чего добавляли лактозу до концентрации

10мМ. Растили 6-7ч при 37°C. Биомассу осаждали центрифугированием при 5000g 15мин и ресуспендировали в буфере для лизиса (20мМ TrisCl, 100мМ NaCl, 0,1% TritonX-100), после чего разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора Branson 250 Sonifier (Branson, США) при 22кГц 10мин. Лизат центрифугировали (20000g, 15 мин). Полученный осадок ресуспендировали в 1% раствором Triton X-100 и осаждали центрифугированием при 20000g в течение 20 мин. Отмывку детергентом повторяли троекратно, после чего однократно промывали PBS. Отмытые тельца включения солюбилизировали в буфере А (8М мочевины, 20мМ Na⁺-фосфатный буфер, 10мМ имидазол, 0,5М NaCl, 0,1% 2-меркаптоэтанола, pH 7,5) из расчёта не менее 10мл буфера на тельца включения, полученные из одного литра культуры. Раствор инкубировался 1 час при 50°C. Растворимую фракцию отделяли от осадка центрифугированием (15000g, 15 мин), отбирали и фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,45мкм (Sartorius). Полученный раствор наносили на хроматографическую колонку XK-16/20 (GE Healthcare, США), заполненную 10 мл сорбента Ni Sepharose High Performance (GE Healthcare, США) и уравновешенную тем же буфером. После нанесения, колонку промывали исходным буфером (не менее 50 мл) и отмывочным буфером (8М мочевины, 20мМ Na⁺-фосфатный буфер, 40мМ имидазол, 0,5М NaCl, pH 7,5), элюировали связавшиеся с сорбентом полипептиды буфером для элюции (20мМ Na⁺-фосфатный буфер, 8М мочевины, 0,5М NaCl, 500мМ имидазол, pH 7,4). Скорость потока буфера составляла 1 мл/мин, контроль процесса и сбор фракций осуществлялся на основании проточного измерения оптической плотности элюата при длине волны 280нм. Все операции по хроматографическому разделению выполнялись с помощью хроматографа АКТА FPLC (GE Healthcare, США). Далее очищенный с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии препарат дестабилазы ренатурировали диализом. Образец разводили буфером А до концентрации не более 0,5 мг/мл. Полученный препарат подвергали ступенчатому диализу против 20мМ фосфатного буфера, pH 5, сначала с концентрацией мочевины 4М, 2М,

1М и, в конечном итоге, без мочевины. Операции проводили при температуре 4°C, продолжительность каждой стадии не менее 12ч. Полученный препарат очищали от выпавшего в осадок белка центрифугированием при 20000g 20 мин.

N-Dest2, очищенную с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии, ренатурировали на колонке. Для этого выделенную N-Dest2 диализовали против буфера Б (8М мочевины, 20мМ цитрат натрия, 0,1% 2-меркаптоэтанола, pH 5). Раствор наносили на хроматографическую колонку XK-26/40 (GE Healthcare, США), заполненную 150 мл сорбента CM Sepharose® Fast Flow (GE Healthcare LS, США) и уравновешенную тем же буфером. После нанесения, колонку промывали исходным буфером (не менее 2-х объемов сорбента), и линейным градиентом объемом 50мл от исходного буфера до 50% буфера В (20мМ цитрат натрия, 4М мочевины, pH 5) со скоростью потока 3 мл/мин. Далее, скорость потока снижали до 1,5мл и промывали линейным градиентом (объем 100мл) от 50% буфера А и 50% буфера В до 100% буфера В. Далее элюировали связавшиеся с сорбентом полипептиды буфером для элюции (20мМ карбонат натрия, 250мМ NaCl) с линейным градиентом смены буфера, объемом 150мл. Скорость потока буфера составляла 3 мл/мин, контроль процесса и сбор фракций осуществлялся на основании проточного измерения оптической плотности элюата при 280нм. Все операции по хроматографическому разделению выполняли с помощью хроматографа АКТА FPLC (GE Healthcare, США).

2.19 Получение min-Dest2 без гексагистидинового мотива в *E. coli*, ренатурированной из телец включения.

Отдельные колонии *E.coli* BL21(DE3)-Gold-pETmin/minDest высевались в среду LB2х без индуктора и культивировались при 37°C в течение ночи. Клетки осаждали центрифугированием и ресуспендировали в объеме свежей среды LB2х, равном объему исходной ночной культуры.

После инкубации в течение часа при 25°C добавляли IPTG до концентрации 1мМ. Растили 8ч при 25°C. Тельца включения выделяли так, как это было описано в пункте 2.17. Отмытые тельца включения min-Dest2 солюбилизировали в буфере Б из расчёта не менее 5мл буфера на тельца включения, полученные из одного литра культуры. Раствор инкубировался 1 час при 50°C. Растворимую фракцию отделяли от осадка центрифугированием (15000g, 15 мин), отбирали и фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,45мкм (Sartorius).

Полученный препарат подвергали ступенчатому диализу против 20мМ цитратного буфера pH 5 с начальной концентрацией мочевины 4М, 2М, 1М и, в конечном итоге, без мочевины. Операции проводили при комнатной температуре. Полученный препарат очищали от выпавшего в осадок белка центрифугированием при 20000g в течение 20мин.

Min-Dest2 ренатурировали из телец включения на колонке с СМ-сефарозой. Раствор ренатурированных телец включения наносили на хроматографическую колонку Tricorn 5/50 (GE Healthcare, США) наполненную 4,5 мл сорбента CM Sepharose® Fast Flow (GE Healthcare LS, США) и уравновешенную хроматографическим буфером для нанесения (20мМ цитрат натрия, pH 5). После нанесения, колонку промывали исходным буфером и проводили элюцию линейным градиентом от исходного буфера до элюционного (20мМ карбонат натрия, 250мМ NaCl, pH 10,5). Объем градиента — 50 мл. Скорость потока буфера составляла 1,5 мл/мин, контроль процесса и сбор фракций осуществлялся на основании оптической плотности элюата при 280нм. Все операции по хроматографическому разделению выполнялись с помощью хроматографа АКТА FPLC (GE Healthcare, США).

2.20 Получение слитого белка дестабилазы (Dest2-SlyD) в *E.coli*.

Плазмидой pET-SlyD-Dest2 трансформировали штамм *E.coli* BL21(DE3)-Gold. Одиночную колонию переносили в 100мл среды LB с ампициллином (150мкг/мл) и растили в шейкере-инкубаторе восемь часов. Полученную культуру переносили в ферментёр New Brunswick BioFlo 110 Fermentor/Bioreactor (Fisher Scientific), заполненный 2,5 литра среды LB2х, содержащей 150мкг/мл ампициллина и 10мМ лактозы. Ферментацию проводили 18 часов при температуре 28°C, максимальной аэрации и скорости перемешивания 750 об/мин. Культуру осаждали центрифугированием в течение 15мин при ускорении 2500g. Биомассу промывали раствором PBS и вновь осаждали центрифугированием. Осадок ресуспендировали в 250мл воды. Клетки разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора Branson 250 Sonifier, (Branson, USA) в течение 10мин при 50% мощности и охлаждении льдом. Лизат центрифугировали 15мин при 15000g. К супернатанту добавляли хроматографический буфер (500 mM NaCl, 20mM NaH₂PO₄, 10mM имидазол, pH 7.4 доведенный NaOH) и центрифугировали 15мин при 15000g. Аликвоты объемом 50мл полученного раствора переносили в пробирки, содержащие по 5 мл сорбента Ni Sepharose High Performance (GE Healthcare, USA), промытого хроматографическим буфером. Сорбент ресуспендировали и инкубировали 15мин при комнатной температуре и периодическом перемешивании. Сорбент осаждали центрифугированием 1мин при 500g, промывали хроматографическим буфером и переносили в колонку. Колонку промывали 200мл отмывочного буфера (500mM NaCl, 20mM NaH₂PO₄, 40mM имидазол, pH 7.4), и элюционным буфером (500mM NaCl, 20mM NaH₂PO₄, 500mM имидазол, pH 7.4). Скорость потока буфера составляла 1,5мл/мин, контроль процесса и сбор фракций осуществлялся на основании оптической плотности элюата при 280нм. Полученный раствор слитого белка диализовали в течение ночи против раствора 50мМ фосфата натрия и 50мМ хлорида натрия, pH 7, при комнатной температуре. Выпавший осадок отделяли центрифугированием

15мин при 15000g. Далее, определяли концентрацию белка в растворе методом Брэдфорд и добавляли 1% по массе TEV-протеиназы и 0,5% по объему β-меркаптоэтанола, после чего инкубировали 16ч при комнатной температуре. Полученный раствор центрифугировали 15мин при 15000g, после чего к нему добавляли раствор 8М мочевины до конечной концентрации 1М. Далее, к раствору при постоянном перемешивании по каплям добавляли 10% уксусную кислоту. При понижении pH шаперон SlyD начинал выпадать в осадок. Добавление кислоты продолжали до прекращения интенсивного образования осадка (pH около 5). Осадок отделяли центрифугированием 15мин при 15000g. Раствор наносили на колонку Tricorn 10/50, заполненную CM-SepharoseFastFlow (GE Healthcare, USA), уравновешенную стартовым буфером (20mM NaH₂PO₄, 1М мочевины, pH 5,5 доведенный NaOH). После нанесения колонку промывали стартовым буфером и проводили элюцию связавшихся белков линейным градиентом от стартового буфера до конечного (20mM NaH₂PO₄, 1М мочевины, 500mM NaCl, pH 5,5) объемом 45 мл. Скорость потока буфера составляла 1мл/мин, контроль процесса и сбор фракций осуществлялся на основании оптической плотности элюата при 280нм. Нахождение дестабилазы в полученных фракциях определялось методом SDS-PAGE. Целевые фракции объединяли, диализовали против буфера (20mM NaH₂PO₄, 135mM NaCl, pH5,5) и хранили в замороженном виде при -20°C.

2.21 Получение Dest2 в дрожжах *P. pastoris* (Dest2-Yeast).

Рекомбинантные штаммы *P. pastoris* получали в соответствии с инструкциями к использованному набору PichiaPink Expression System (Life Technologies, USA). Полученные плазмиды обрабатывались эндонуклеазой рестрикции Kpn2I, пересаживались этанолом. Электрокомпетентные клетки и трансформацию проводили согласно рекомендации производителя набора. Селекцию клонов проводили на твердой питательной среде PAD (13,4 г/л

YNB, 10г/л глицерин, 4 мг/л биотин, 15 г/л агар). Положительные колонии рассевали на отдельные чашки и проверяли с помощью ПЦР.

Проверку накопления дестабилазы в культуральной жидкости проводили в соответствии с рекомендациями производителя. По его результатам, был выбран штамм *P. pastoris* №4 (*ade2*, *prb1*, *pep4*) (Life Technologies, USA), несущий в геноме встроенную плазмиду pLC-Kill-Dest6His. Рекомбинантный участок ДНК кодирует Dest2, имеющую на N-конце сигнальный пептид белка-киллера (Killer Protein) из *S. cerevisiae* и гексагистидиновый мотив на С-конце. Ферментацию с целью получения белка проводили по следующей схеме. Штамм-продуцент рассевали на твёрдую питательную среду YPD (10 г/л дрожжевой экстракт, 20г/л пептон, 15г/л агар, 20 г/л глюкоза) и инкубировали при 30⁰С до образования отдельных колоний. Единичную колонию переносили в жидкую среду BMGY (10 г/л дрожжевой экстракт, 20г/л пептон, 100 мМ К-фосфат pH 8, 13,4 г/л YNB, 4 мг/л биотин, 20 г/л глицерин). Инкубировали трое суток в шейкере-инкубаторе при температуре 30⁰С. Далее, клетки осаждали центрифугированием (5 мин, 500g) и ресуспендировали в эквивалентном объеме среды BMMY такого же объёма (состав аналогичен BMGY, но не содержит глицерина). Культуру инкубировали в термошейкере при температуре 22-24⁰С, ежедневно добавляя метанол из расчета 20мл на 1л культуры. После трех суток инкубации, клетки осаждали центрифугированием (5 мин, 500g). К культуральной жидкости добавляли концентрированный хроматографический буфер (конечная концентрация — 20mM Na₂HPO₄, 500mM NaCl, 10mM имидазол, pH 7,5). Раствор центрифугировали (15000g, 15min) и наносили на хроматографическую колонку Tricorn 5/50 с сорбентом Ni Sepharose High Performance (GE Healthcare, США), уравновешенную буфером того же состава. После нанесения, колонку промывали и элюировали буфером с имидазолом (20mM Na₂HPO₄, 500mM NaCl, 500mM имидазол, pH 7,5). Раствор дестабилазы диализовали против 5mM Na₂HPO₄, pH 5,0 и лиофилизировали.

2.22 Получение Dest2 в клетках Expi293F (Dest2-Expi).

Клетки почки эмбриона человека линии Expi293F, продуцирующую Dest2, получали с использованием набора Expi293F™ ExpressionSystemKit (LifeTechnologies, USA) в соответствии с рекомендациями производителя. Клетки осаждали центрифугированием (5 мин, 500g), дальнейшие операции по выделению дестабилазы из культуральной жидкости полностью аналогичны описанным в пункте 2.21 для дрожжевой культуры.

2.23 Определение концентрации белка.

Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд с использованием реагента Bio-Rad Protein Assay и стандартных растворов БСА (Bio-Rad, США) по протоколу High concentration assay от производителя на планшетном фотометре Multiskan Ascent (Thermo Fisher Scientific Inc., США) с использованием 96-и луночных планшетов (Corning, США)

2.24 Стандартные буферы для определения активностей.

Для определения зависимости активности фермента от pH среды, мы использовали следующие буферы: лимонная кислота/цитрат натрия для диапазона pH от 1 до 5, цитрат натрия/фосфат натрия для диапазона pH от 5 до 7, фосфат натрия/гидроксид натрия для pH от 7 до 12 и хлорид калия/гидроксид натрия для pH от 12 до 13. Общая концентрация составляющих была 10 mM (Speight, 2005).

2.25 Определение литической активности дестабилазы.

Литическую активность определяли по количеству выделившегося суммарного белка из бактерий после обработки их дестабилазой. Данная

активность проверялась на бактериях *E. coli* Top10 и *B. subtilis* 186RT. Ночная культура клеток пересеивалась в свежую среду LB (1/20 объёма) и подращивалась до $OD_{600}=1-1,2$. Далее клетки из 200 мкл клеточной культуры осаждались центрифугированием при 10000g, 2 мин и ресуспендировались в 200 мкл стандартных буферов. Концентрация ферментов составляла 20 мкг/мл. Инкубацию проводили в течение 30 мин при 37⁰С. Далее пробу разводили до 1 мл дистиллированной водой и осаждали центрифугированием 10000g 10 мин. Литическая активность фермента принималась равным значению концентрации выделившегося суммарного белка из клеток, которая определялась методом Бредфорда (пункт 2.23).

Литическая активность в присутствии ЭДТА определялась аналогично. В стандартные буферы (пункт 2.24) добавлялась ЭДТА до концентрации 5мМ.

2.26 Определение мурамидазной активности дестабилазы.

Мурамидазная активность дестабилазы определялась по уровню просветления суспензии клеточных стенок *M.luteus* (Sigma, США) как описано (Zavalova et al. 2000). Определение зависимости активности от pH и ионной силы проводилось в стандартных буферах (пункт 2.24). Концентрация клеточных стенок составляла 0,5 мг/мл. Концентрация HEWL и дестабилазы 0-20 мкг/мл. Инкубацию проводили в течение 30 мин при 25⁰С в 96-и луночном планшете, объём пробы составлял 200 мкл. Оптическую плотность измеряли на планшетном фотометре MultiskanAscent (ThermoFisherScientific, США) на 405 нм. Абсолютную активность измеряли по разнице оптических плотностей до и после инкубации. Относительную активность рассчитывали относительно HEWL с известной активностью при данных условиях.

2.27 Определение изопептидазной активности дестабилазы.

Изопептидазную активность определяли с помощью хромогенного субстрата L-g-Glu-pNA (L-γ-глутамил-пара-нитроанилид) (Sigma, США) как описано (Баскова и др., 1990). Инкубация проходила стандартных в буферах с добавлением L-g-Glu-pNA до 1 мг/мл. Концентрация ферментов составляла 50-1000 мкг/мл. Инкубация проходила при 37⁰С в течение 0-120 ч в 96-и луночном планшете, объём пробы составлял 200 мкл. Активность фермента определялась по формуле: $A = (\Delta OD_{405}^{\Phi} - \Delta OD_{405}^K) * 1000$, где ΔOD_{405}^{Φ} – разность оптических плотностей образца с ферментом до и после инкубации на 405 нм, а ΔOD_{405}^K – разность оптических плотностей на 405 нм образца с контрольным буфером до и после инкубации. Оптическую плотность измеряли на планшетном фотометре MultiskanAscent (ThermoFisherScientific, США).

2.28 Получение триптических пептидов дестабилазы.

В раствор ренатурированной диализом дестабилазы (пункт 2.18) с концентрацией 200 мкг/мл добавляли трипсин (Promega, США) до концентрации 0,1 мкг/мл. Образец инкубировали 1ч при 37⁰С. После этого трипсин ингибировали PMSF в концентрации 1мМ и инкубировали 3ч при комнатной температуре. В качестве контрольного образца использовался буфер для рефолдинга (20 мМ NaH₂PO₄, 8,8 г/л NaCl, pH 5) с аналогичной пробоподготовкой.

2.29 Определение антибактериальной активности дестабилазы и её триптических пептидов.

Антибактериальную активность дестабилазы и её триптических пептидов измеряли тремя методами.

Определение титра клеток после обработки ферментами. Ночную культуру клеток *E. coli* и *B. subtilis* добавляли к 20 объёмам LB и растили 2,5-3 часа при 37°C до OD₆₀₀=1-1,5. Клеточную культуру в объёме 200 мкл осаждали центрифугированием, клетки ресуспендировались в 200 мкл буфера, содержавшего 20 мМ Na-фосфат, 0,3М NaCl, pH 6,3. К клеточной суспензии добавляли исследуемый фермент или его пептиды до концентрации 30 мкг/мл. Инкубировали 60 мин при 37°C. Высевали серийные разведения полученной суспензии на твёрдую питательную среду на чашки Петри. Чашки инкубировали 18 часов при 37°C и производили подсчёт выросших колоний.

Определение кривых роста бактерий, обработанных ферментами. Ночную культуру клеток *E.coli* или *B. subtilis* добавляли к 20 объёмам LB и растили при 37°C с ферментом в концентрации 0-20 мкг/мл в 96-и луночном планшете, объём пробы составлял 200 мкл. Оптическую плотность измеряли на планшетном фотометре MultiskanAscent (ThermoFisherScientific, США) на 600 нм каждые 30 мин. Строили графики зависимости OD₆₀₀ от времени. По полученным кривым роста визуально определяли ингибирующие свойства ферментов и их триптических пептидов.

Определение МИК (минимальной ингибирующей концентрации) ферментов и их триптических пептидов. Определение МИК дестабилазы проводили как описано в Wiegand, Hilpert et al., 2008 с модификацией. В лунку 96-и луночного планшета помещали 150 мкл LB, содержащего $5 \cdot 10^5$ КОЕ/мл *E. coli* или *B. subtilis*. Инкубировали 16-18 часов при 37°C с ферментом в концентрации 0-20 мкг/мл. Высевали серийные разведения полученной суспензии на твёрдую питательную среду LB на чашки Петри. Чашки инкубировали 18 часов при 37°C и производили подсчёт выросших колоний.

2.30 Определение фибринолитической активности дестабилазы.

Фибринолитическая активность дестабилазы определялась путём измерения лизированной зоны на фибриновой пластине (Kim et al., 1998). Фибриновые пластины приготавливались растворением 6 мг фибриногена (Технология-Стандрат, Россия) в 15 мл 0,1М Tris-HCl, содержащего 0,15 М NaCl и 10 мМ CaCl₂, pH 7.4. После этого к раствору добавляли 0,5 ед. тромбина (Технология-Стандарт, Россия) и быстро перемешивали. Конечный раствор переливали в 80 мм чашку Петри и ставили на ровную поверхность в течение 24 ч на 37°C. Процент стабилизированного фибрина определяли по количеству нерастворимого фибрина в 2% уксусной кислоте: нестабилизированный фибрин растворяется в кислоте, а стабилизированный образует нерастворимый осадок (Schwartz et al., 1971). Для этого методом Брэдфорд определяли концентрацию белка в исходном растворе фибриногена и концентрацию белка стабилизированного фибрина, перешедшего в раствор 2% уксусной кислоты и находили процент нерастворившегося фибриногена.

Далее на фибриновую пластину помещали 3 мкл раствора дестабилазы с концентрацией 2 мг/мл и 3 мкл контрольного буфера. Пластина инкубировалась при комнатной температуре в течение 48 часов. Диаметр лизированной зоны измеряли (в трёх направлениях).

2.31 Гидролиз изопептида γ -Glu- ϵ -Lys под действием дестабилазы.

Гидролиз изопептида γ -Glu- ϵ -Lys дестабилазой исследовали с помощью метода тонкослойной хроматографии (ТСХ) как описано (Завалова и др., 2010).

Для приготовления проб использовали буфер, содержащий 0.05 М Tris-HCl, 0.01 М CaCl₂, 0.15 М NaCl, 1 мг/мл γ -Glu- ϵ -Lys (Sigma, USA), pH 7.4 и дестабилазу с концентрацией 1 мг/мл. В качестве контроля использовали буфер с добавлением дипептида Gly-Gly или отдельных аминокислот Glu,

Lys, Gly (Sigma, USA). Все пробы инкубировались при 25°C в течение 72 часов. После инкубации 5 мкл каждого образца наносили на пластину Kieselgel 60 F254 (Merck). Элюция проходила в растворе, содержащем 60% н-бутанол, 15% уксусной кислоты и 25% дистиллированной воды. Для визуализации результатов пластинку обрабатывали раствором 1% нингидрина в ацетоне с последующим нагреванием до 105°C в течение 5 минут.

2.32 Измерение кругового дихроизма (КД) дестабилазы.

Спектр КД был снят на приборе ChiroscanCDspectrophotometer (AppliedPhotophysics, Великобритания) в лаборатории искусственного антителогенеза ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА. Спектр измерялся в диапазоне 180-280 нм (шаг 1 нм) при 20°C. В измерении использовалась ячейка с длиной пути 2мм. Концентрация белка в буфере (5 mM Na₂HPO₄, pH 2.2, 3.2 и 6.5) составляла 2 мг/мл

2.33 MALDI-TOF анализ.

Масс-спектрометрический анализ рекомбинантных белков был выполнен в лаборатории протеомного анализа ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России. Триптический гидролиз белка в полиакриламидном геле проводили следующим образом: вырезанный фрагмент геля размером около 2мм³ дважды промывали для удаления красителя путем инкубации в 100 мкл 40% раствора ацетонитрила в 0,1 М NH₄HCO₃ в течение 30 мин при 37°C. После удаления раствора для дегидратации геля добавляли по 100 мкл ацетонитрила. Удалив ацетонитрил и высушив фрагмент геля, добавляли к нему 4 мкл раствора модифицированного трипсина с концентрацией 12,5 мкг/мл (TrypsinGold, Promega, США), содержащего 40 mM NH₄HCO₃ и 10% ацетонитрил. Гидролиз проводили в течение 16 ч при 37°C, далее к раствору

добавляли 8 мкл 0,5 % трифторусусной кислоты (ТФУ) и тщательно перемешивали, инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин. Надгелевый раствор использовали для получения MALDI-масс-спектров.

Для проведения масс-спектрометрического анализа на мишени-подложке смешивали по 2 мкл раствора образца и 0,3 мкл раствора 2,5-дигидроксibenзойной кислоты (BruckerDaltonics, 75 мг/мл в 30% ацетонитриле, 0,5% ТФУ в воде). Масс-спектры получали на tandemном MALDI-времяпролетно-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex II BRUKER (Германия), оснащенном УФ лазером (Nd) в режиме положительных ионов в линейной моде и с использованием рефлектрона. Точность измеренных средних масс в линейной моде составляет 5 Да, точность измеренных моноизотопных масс в рефлекто-моде составляет 0,005%. Идентификацию белков по «пептидному фингерпринту» осуществляли при помощи программы Mascot (www.matrixscience.com)

2.34 Гель-фильтрация дестабилазы.

Гель-фильтрацию проводили на колонке Tricorn 10/300, заполненной сорбентом Superdex 200 (Amersham, Швеция). Колонку уравнивали буфером, содержащим 20 мМ фосфата натрия и 8 г/л хлорида натрия, pH 7,4. Скорость потока буфера – 1 мл/мин, объем вносимой пробы – 0,1 мл, содержащих целевого белка – 1 мг. Калибровку колонки осуществляли с помощью маркеров Gel Filtration Calibration Kit LMW (GE Healthcare, США) в полном соответствии с рекомендациями производителя. Все операции выполняли на хроматографе АКТА FPLC (GE Healthcare, США).

2.35 Статистический анализ данных.

Статистическая обработка полученных результатов осуществлялась с использованием пакетов прикладных программ Statistica 10 и MS Excel 2010.

Проверка на нормальность проводилась при помощи критерия Шапиро-Уилка. Данные представлены как среднее значение и стандартное отклонение ($M \pm \sigma$). Результаты расценивались как статистически значимые при уровне статистической значимости $p < 0,05$. Статистическая значимость различий количественных показателей в группах определялась с использованием непараметрических критериев Манна-Уитни.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Схема получения Dest2 в *E.coli*.

Для полного изучения свойств дестабилазы и для проведения дальнейших экспериментов необходимо получить её в достаточном количестве. Ранее рекомбинантную Dest2 в *E.coli* удалось получить только в нерастворимой форме и с низким выходом, который составлял не более 5 мг/л бактериальной культуры (Завалова и др., 2010). В нашей работе мы попытались увеличить конечный выход Dest2 по следующей схеме:

1) Подбор плазмиды, кодирующей Dest2. Для экспрессии гена Dest2 было сконструировано 13 плазмид под контролем различных промоторов. Для некоторых плазмид кодонный состав дестабилазы был оптимизирован для получения её в *E.coli*. Этими плазмидами были трансформированы соответствующие штаммы *E.coli*, проводилась инкубация культуры в одинаковых условиях и определялась внутриклеточная локализация Dest2. Было выбрано несколько плазмид, которые обеспечили наибольший выход Dest2.

2) Выбранными плазмидами трансформировали восемь различных штаммов *E.coli*: origami (DE3), origami (DE3) pLysS, BLR, BLR pLysS, BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, BL21(DE3)-Gold, B834. Инкубацию клеточной культуры проводили при одинаковых условиях на двух температурах: 25⁰С и 37⁰С. После этого было выбрано несколько штаммов с наибольшим выходом Dest2.

3) Выбранные штаммы-продуценты Dest2 культивировались на семи различных средах (LB, LB2х, SOB, M9+Glc, 2YT, TB, SB) с разными схемами (концентрация индуктора, температура, время).

4) Оптимизация метода выделения Dest2 из полученной биомассы.

5) Подбор метода ренатурации выделенного белка и исследование его активности.

3.2 Конструирование плазмид, кодирующих Dest2.

С целью обеспечения высокого уровня накопления рекомбинантной Dest2 в *E.coli* нами был получен ряд плазмид (таблица 3), содержащих структурную часть гена *Dest2* под контролем различных промоторов: поздних генов бактериофага T7, промоторно-операторной области гена уридинфосфорилазы *E.coli* (Pudp), промоторной области арабинозного оперона *E.coli* (araB). Для дальнейшего повышения уровня наработки рекомбинантных белков нами была синтезирована структурная часть гена *Dest2*, оптимизированная по составу кодонов для *E.coli*. Все плазмиды для получения Dest2 в *E.coli*, сконструированные в ходе работы, перечислены в таблице 3.

Таблица 3.

Плазмиды, полученные в ходе работы.

№	Название реципиентной плазмиды	Промотор	Сигнальный пептид	N-6His	C-6His	Название полученной плазмиды
1	pBAD/GIII B	araB	GIII	-	+	pBAD/GIII/Dest
2	pBAD/Myc-		-	-	+	pBAD/Dest
3	pET-32a	T7	-	-	+	pET-32a/Dest
4, 4*	pET-15MCS		-	+	-	pET-15/N-Dest+
5, 5*	pETmin		-	-	+	pETmin/C-Dest+
6			-	-	-	pETmin/min-Dest
7	pURLV	Pudp	SAV	-	+	pURLV/Dest
8	pURLH		SEH	-	+	pURLH/Dest
9	pURLB		SEB	-	+	pURLB/Dest
10	pURLT		TorA	-	+	pURLT/Dest
11	pUC18R(H)		-	-	+	pUC18/Dest

* - сконструировано два варианта плазмиды - с природной первичной структурой гена *Dest2* и с кодонным составом, оптимизированным для синтеза белка в *E.coli*

GIII – один из минорных капсидных белков фага fd, SAV – стрептавидин, SEH и SEB – стафилококковые энтеротоксины H и B, TorA – триметиламин N-оксид-редуктаза *E.coli*.)

Вследствие того, что дестабилаза является ферментом животного происхождения, частота встречаемости кодонов в кодирующей части ее гена сильно отличается от оптимальной для *E.coli*. С целью повысить выход рекомбинантного белка при гетерологичной экспрессии в *E.coli*, мы синтезировали из олигонуклеотидов структурную часть гена *Dest2* оптимизированную по кодонному составу. Далее, полученный фрагмент ДНК был клонирован в составе плазмид pET-15MCS и pETmin.

Таким образом, мы сконструировали тринадцать плазмид, несущих ген *Dest2* под контролем трёх различных промоторов. Кодируемый белок имел в своем составе различные дополнительные элементы – гексагистидиновые последовательности, сигнальные пептиды, тиоредоксин (таблица 3).

Также, мы сконструировали плазмиды, несущие ген *Dest2*, для экспрессии в дрожжах *P. pastoris* и клетках человека Expi293F.

3.2.1 Конструирование плазмиды pBAD/GIII/Dest.

Нами были получены плазмиды pBAD/GIII/Dest и pBAD/Dest (рисунок 12). В них участок ДНК, кодирующий *Dest2*, находится под контролем промотора оперона *araBAD E.coli*, который активирует транскрипцию в присутствии L-арабинозы. В 3'-концевом участке структурной части рекомбинантных генов имеется участок, кодирующий гексагистидиновый мотив. Кроме того, в плазмиде pBAD/GIII/Dest 5'-концевой участок открытой рамки считывания кодирует сигнальный пептид белка GIII бактериофага fd, который предназначается для транспорта белка через плазматическую мембрану посредством Seq-транслоказы.

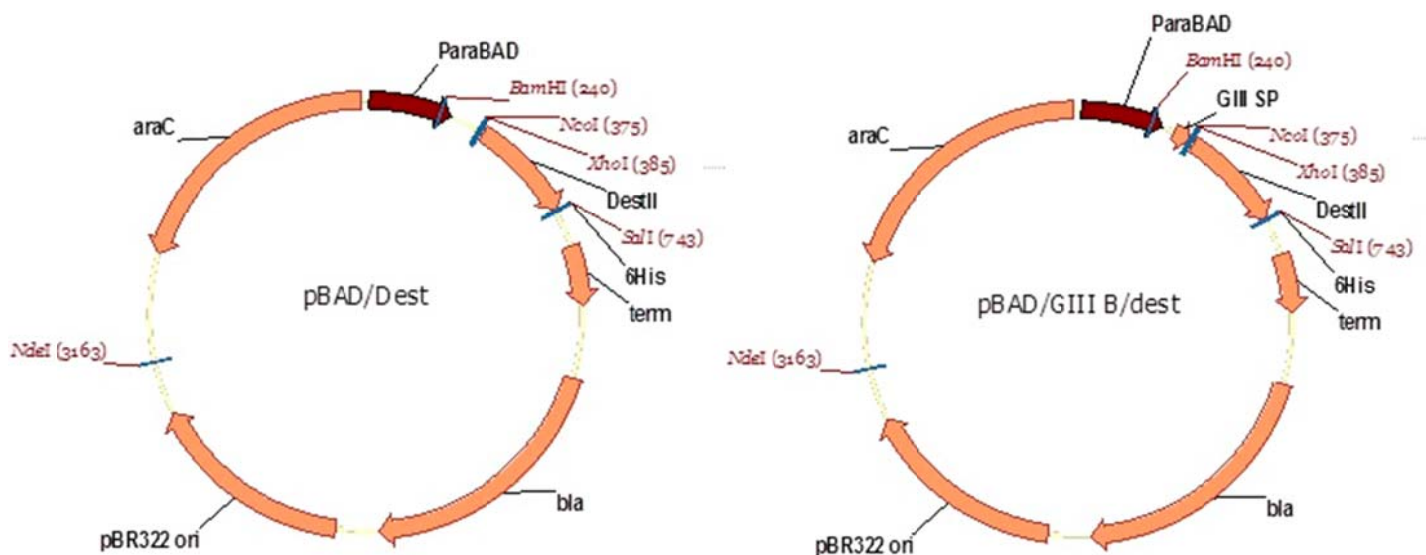


Рисунок 12. Схема плазмид pBAD/GIII/Dest и pBAD/Dest. ParaBAD – промотор оперона *araBAD E.coli*; GIIISP – участок, кодирующий сигнальный пептид белка GIII, *DestII* – структурная часть гена *Dest2*; 6His – участок, кодирующий гексагистидиновый мотив; *term* – терминатор транскрипции; *bla* – ген бета-лактамазы; pBR322ori – точка начала репликации плазмиды pBR322; *araC* – ген *araC E.coli*.

3.2.2 Конструирование плазмиды pET-32a/Dest.

С целью повышения растворимости рекомбинантных белков часто получают их в виде слитого белка с тиоредоксином (Trx) или мальтозосвязывающим белком (MBP) *E.coli*. Мы использовали плазмиду pET-32a(+) (Novagen, США) для получения слитого полипептида Trx-Dest2.

Сконструированная плазмида pET32/Dest кодирует слитой полипептид, состоящий из нескольких частей. N-концевой участок соответствует тиоредоксину *E.coli*, за ним следует гексагистидиновый участок (6His), сайты расщепления тромбином и энтерокиназой. С-концевой участок соответствует Dest2 (рисунок 13).

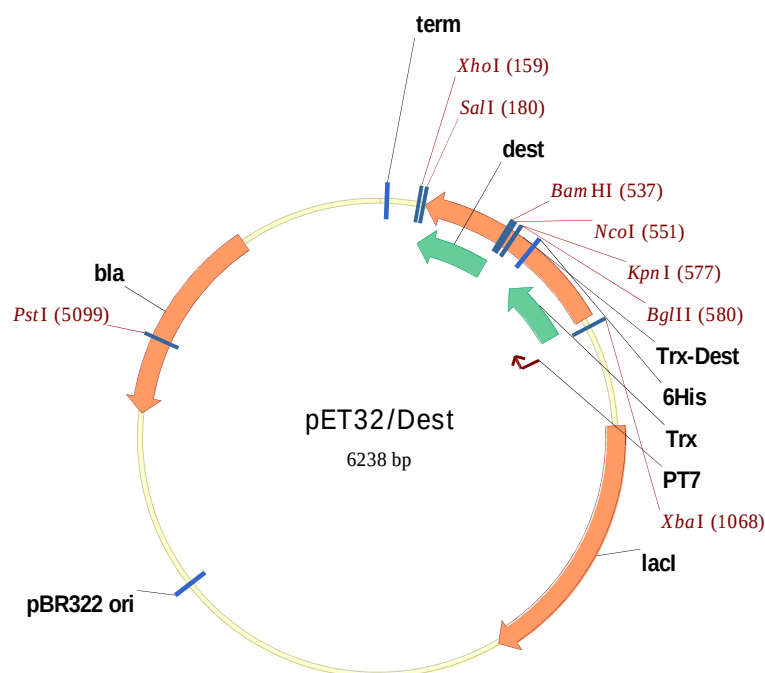


Рисунок 13. Схема плазмиды pET32/Dest. PT7 – промотор поздних генов бактериофага T7; dest – структурная часть гена Dest2; Trx – участок, кодирующий тиоредоксин *E.coli*; 6His – участок, кодирующий гексагистиридиновый мотив; term – терминатор транскрипции; bla – ген бета-лактамазы; pBR322ori – точка начала репликации плазмиды pBR322; lacI – ген *lacI E.coli*.

3.2.3 Конструирование плазмид pET15/N-Dest и pETmin/C-Dest.

Для получения Dest2, имеющей в своем составе 6His участки в N-концевой (N-Dest2) либо C-концевой (C-Dest2) части нами была ПЦР-амплифицирована структурная часть гена *Dest2*. Полученный ДНК-фрагмент клонировали в составе плазмид pET15MCS и pETmin.

В результате, были получены плазмиды pET15/N-Dest и pETmin/C-Dest. Первая из них кодирует N-Dest2, pETmin/C-Dest кодирует C-Dest2 (рисунок 14).

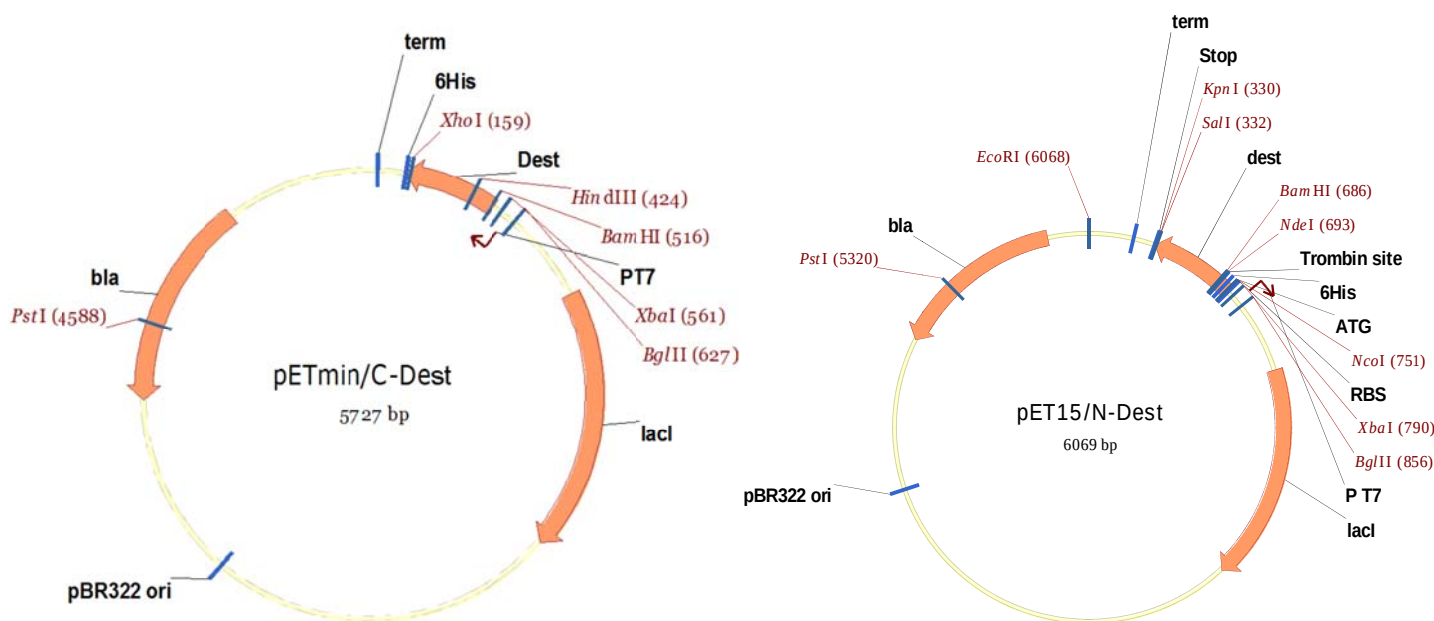


Рисунок 14. Схема плазмид pETmin/C-Dest и pET15/N-Dest. PT7 – промотор поздних генов бактериофага T7; dest – структурная часть гена Dest2; 6His – участок, кодирующий гексагистиридиновый мотив; term – терминатор транскрипции; bla – ген бета-лактамазы; pBR322ori – точка начала репликации плазмиды pBR322; lacI – ген *lacI* *E.coli*; Stop – стоп-кодон; Trombin site – сайт расщепления тромбином; ATG – стартовый кодон; RBS – сайт связывания рибосомы.

3.2.4 Конструирование плазмиды pETmin/min-Dest.

Для получения Dest2, не имеющей дополнительных 6His участков (min-Dest2), мы встроили в плазмиду pETmin участок ДНК, кодирующий Dest2 и имеющий стоп-кодон. Полученная плазида pETmin/min-Dest полностью аналогична pETmin/C-Dest (рисунок 14), за исключением триплета TGA, следующего за кодирующей последовательностью гена *Dest2*, что предотвращает синтез С-концевого 6His участка.

3.2.5 Конструирование плазмид, кодирующих Dest2 под контролем экспрессии промотора гена уридинфосфорилазы *E.coli*.

Промоторно-операторная область гена уридинфосфорилазы обеспечивает «мягкую» конститутивную транскрипцию дистальных районов

ДНК, уровень которой зависит от общего метаболического статуса клетки (Вейко и др., 1994). В ряде случаев это позволяет получать рекомбинантные белки в растворимой форме. Мы клонировали фрагмент ДНК, кодирующий *Dest2* в составе плазмид pURLB, pURLH, pURLV и pUC18R(H) (Манувера и др., 2008). Первые четыре из них имеют в своем составе участки ДНК, кодирующие сигнальные пептиды стафилококкового энтеротоксина В (pURLB), стафилококкового энтеротоксина Н (pURLH), стрептавицина (pURLV) и триметиламин-N-оксидоредуктазы *E.coli* (pURLT).

Таким образом, были получены плазмиды pUR-Dest, pURLB/Dest, pURLH/Dest, pURLT/Dest и pURLV/Dest. В них кодирующий *Dest2* участок ДНК слит со структурами, кодирующими сигнальные пептиды (за исключением pUR-Dest) и С-концевой 6His мотив (рисунок 15).

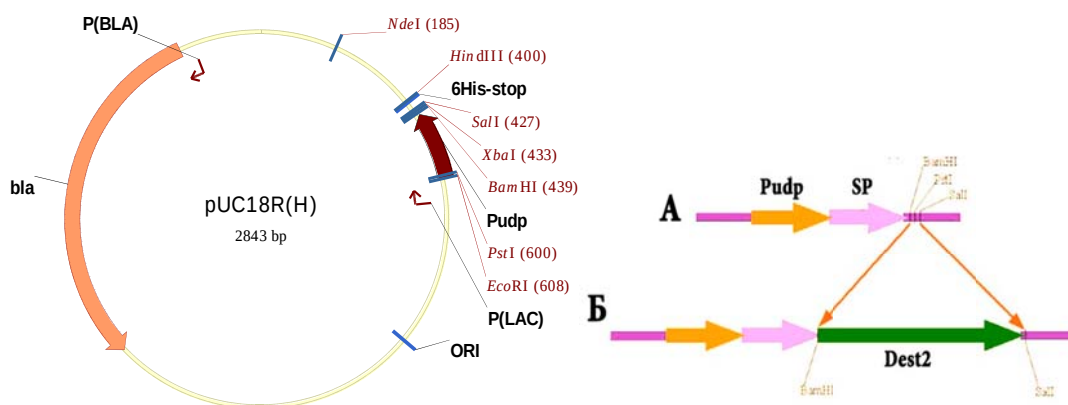


Рисунок 15. Схема плазмиды pUC18R(H). P(LAC) – промотор лактозного оперона *E.coli*; Pudp – промотор-операторная область гена уридинфосфорилазы *E.coli*; 6His-stop – участок, кодирующий гексагистидиновый мотив и терминатор трансляции; bla – ген бета-лактамазы; ori – точка начала репликации плазмиды.

А – схема участков плазмид pURLH, pURLAB, pURLV, pURLT, содержащих фрагмент ДНК, кодирующий соответствующий сигнальный пептид (SP). Б - схема участка плазмид, кодирующих рекомбинантные белки, слитые с сигнальным пептидом. Pudp – промотор-операторная область гена уридинфосфорилазы *E.coli*.

3.2.6 Конструирование плазмид, кодирующих Dest2 для экспрессии в дрожжах *P. pastoris*.

Рекомбинантную Dest2 в дрожжах *P. pastoris* получали с помощью набора PichiaPink Expression System (Life Technologies, USA). В состав данного набора входит две плазмиды (pPink-НС и pPink-LC) и четыре штамма дрожжей с разным набором делеций генов (PichiaPink™ Strain 1: *ade2*; PichiaPink™ Strain 2: *ade2*, *pep4*; PichiaPink™ Strain 3: *ade2*, *prb1*; PichiaPink™ Strain 4: *ade2*, *prb1*, *pep4*). Кроме того, имеются восемь фрагментов ДНК, кодирующих различные сигнальные пептиды (альфа-амилазы *A. niger*, глюкоамилазы *A. awamori*, сывороточного альбумина *H. sapiens*, инулиназы *K. maxianus*, лизоцима *G. gallus*, инвертазы, альфа-фактора спаривания и белка-киллера *S. cerevisiae*). Мы получили все шестнадцать возможных вариантов плазмид, кодирующих Dest2, следуя схеме, рекомендованной производителем набора. Далее, выполняли стандартные операции по трансформации *E.coli*, ПЦР-отбору колоний, выделению плазмид и секвенированию. В результате, мы получили плазмиды на основе pPink-НС и pPink-LC, кодирующие Dest2, сигнальный пептид белка-киллера *S. cerevisiae* и С-концевой 6His мотив (рисунок 16).

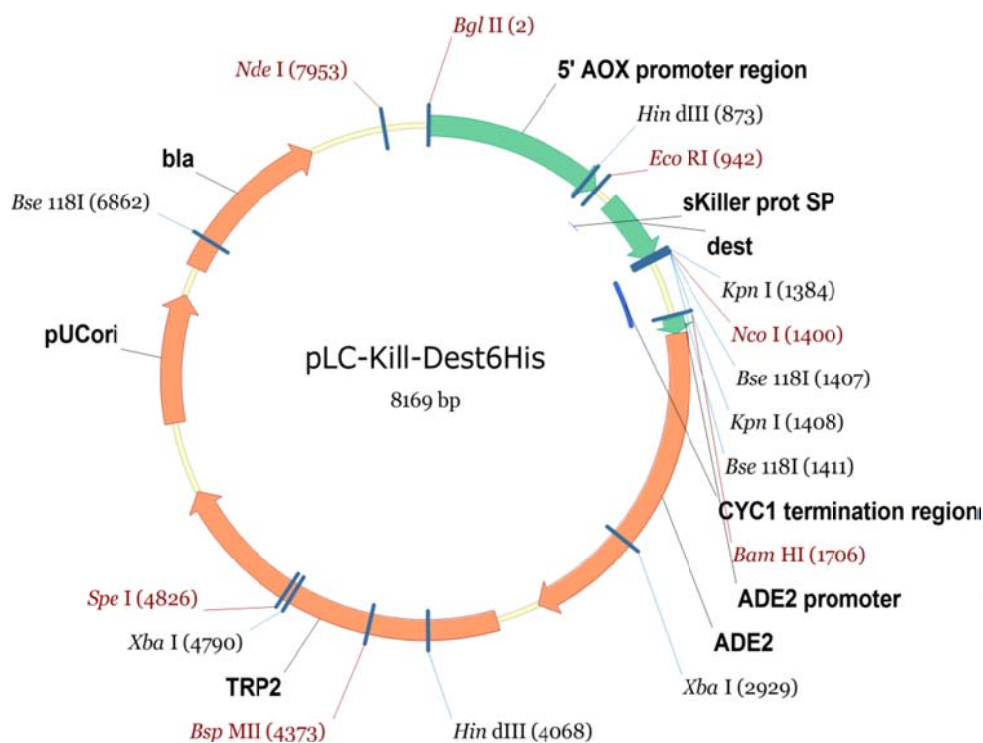


Рисунок 16. Схема плазмиды pLC-Kill-Dest6His. 5' AOX promoter region – промотор гена AOX, sKiller prot SP – последовательность сигнального пептида белка-киллера *S. cerevisiae*, dest – последовательность, кодирующая Dest2, CYC1 terminator region – терминатор транскрипции гена CYC1, ADE2 promoter – промотор гена ADE2, TRP2 – ген антранилат-синтазы, pUCori – точка начала репликации плазмиды, bla – ген бета-лактамазы, устойчивости к ампициллину; ADE2 – ген фосфорибозиламиноимидазол-карбоксилазы.

3.2.7. Конструирование плазмиды, кодирующей Dest2 для экспрессии в клетках человека Expi293F.

Мы сконструировали плазмиду pcDNA3.4-Dest2, кодирующую Dest2 с собственным сигнальным пептидом и имеющую С-концевой 6His мотив согласно рекомендации производителя (pcDNA3.4 TOPO TA Cloning Kit) (рисунок 17).

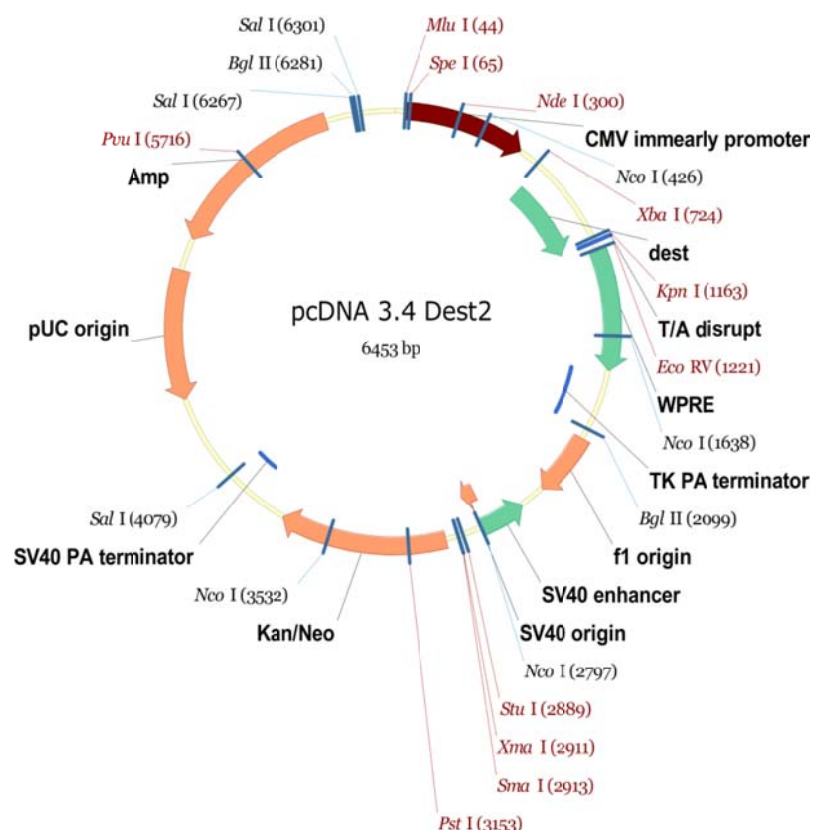


Рисунок 17. Схема плазмиды pcDNA3.4-Dest2. CMV promoter – промотор ранних генов цитомегаловируса человека, dest – последовательность, кодирующая Dest2, WPRE – посттрансляционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков, f1 origin – начало репликации фага f1, SV40 enhancer, origin – энхансер и начало репликации вируса SV40, Kan/Neo – ген устойчивости к канамицину/неомицину, pUC origin – точка начала репликации плазмиды, Amp – ген устойчивости к ампициллину; TK PA terminator – терминатор сигнала полиаденилирования тимидин-киназы; SV40 PA termination – терминатор сигнала полиаденилирования вируса SV40.

3.3 Определение уровня накопления рекомбинантной Dest2 в клетках *E.coli*.

На первом этапе определяли наличие рекомбинантной Dest2 в клетках *E.coli*, трансформированных плазмидами (таблица 3), и ее внутриклеточную локализацию. Рекомбинантными плазмидами трансформировались штаммы *E.coli*, совместимые с регуляторной областью рекомбинантных плазмид и

обеспечивающие высокий уровень экспрессии гена *dest2* (таблица 4). После инкубации в условиях, необходимых для активации экспрессии под контролем конкретного промотора (как это рекомендовано фирмой Novagen для плазмид на базе pET, Invitrogen для pBAD и описано для плазмид на базе pUC18R(H)) у клеток *E.coli* выделяли периплазму, цитоплазму и осадок. Полученные образцы анализировались с помощью SDS-PAGE по Лэммли с окраской Кумасси G-250.

Таблица 4.

Реципиентные штаммы *E.coli*, использованные для трансформации различными плазмидами.

Рекомбинантная плазида	pBAD/GIII/Dest pBAD/Dest	pET-32a/Dest pETmin/C-Dest pETmin/min-Dest pET-15/N-Dest	pURL/pUC/ Dest
Реципиентный штамм	Top10	BL21(DE3) BL21-Gold (DE3) B834(DE3)	Top10 K-12 MG1655

Установлено, что рекомбинантная Dest2 обнаруживается только во фракции нерастворимых белков (таблица 5). Не удалось обнаружить рекомбинантную Dest2 в клетках, трансформированных плазмидами, в которых транскрипция регулируется промоторно-операторной областью гена уридинфосфорилазы *E.coli*. В случае использования плазмид на основе pBAD, Dest2 обнаруживалась во фракции нерастворимых белков и только в форме с сигнальным пептидом. При экспрессии рекомбинантного гена под контролем промотора поздних генов бактериофага T7 целевой белок обнаруживался во всех случаях, но только в водонерастворимой фракции. Мы полагаем, что дестабилизосодержащий осадок представляет собой бактериальные тельца включения, так как он не меняет состав, объем и консистенцию при обработке мягкими детергентами, например, 1%

раствором TritonX-100, имеет характерный внешний вид и скорость осаждения.

Таблица 5.

Внутриклеточная локализация рекомбинантной Dest2 в клетках штаммов-продуцентов.

Рекомбинантная плазмида	Штамм-продуцент	Пери-плазма	Растворимые белки	Нерастворимые белки	Культуральная жидкость
pBAD/Dest	Top10	-	-	-	-
pBAD/GIII/Dest	Top10	-	-	+	-
pET-32a/Dest	BL21(DE3)	-	-	+	-
	BL21-Gold (DE3)	-	-	+	-
	B834(DE3)	-	-	+	-
pET-15/N-Dest	BL21(DE3)	-	-	+	-
	BL21-Gold (DE3)	-	-	+	-
	B834(DE3)	-	-	+	-
pETmin/C-Dest pETmin/min-Dest	BL21(DE3)	-	-	+	-
	BL21-Gold (DE3)	-	-	+	-
	B834(DE3)	-	-	+	-
pURL/pUC/Dest	Top10	-	-	-	-
	K-12 MG1655	-	-	-	-

Таким образом, для дальнейшей работы были выбраны плазмиды pET-15/N-Dest, pETmin/C-Dest и pETmin/min-Dest. От использования плазмиды pBAD/GIII/Dest решено было отказаться из-за низкого уровня накопления белка. Оптимизация по кодонному составу для *E.coli* гена *Dest2*, позволила повысить уровень выхода дестабилазы примерно на 30%. Дальнейшие эксперименты по определению и сравнению активностей проводили с реконструированными плазмидами, получившими название pET-15/N-Dest+ и pETmin/C-Dest+. Далее, проводили эксперименты по подбору сред и оптимальных условий культивирования, в результате чего выбраны условия культивирования штаммов-продуцентов.

3.4 Оптимизация условий культивирования штамма *E. coli*, несущего плазмиду pET32/Dest.

Плазмида pET32/Dest, кодирующая слитой белок с тиоредоксином Trx-Dest2, была нами получена для наработки рекомбинантного белка в растворимой форме в цитоплазме клеток *E. coli*. Однако, первичные эксперименты показали, что целевой продукт, несмотря на наличие тиоредоксина, выпадает в осадок. Мы провели культивирование штаммов *E. coli* BL21(DE3)-pET32/Dest, BL21(DE3)-Gold-pET32/Dest и B834(DE3)-pET32/Dest при различных температурах (25°C, 30°C, 37°C) и в присутствии двух типов индуктора – D-лактозы или IPTG в разных концентрациях, как описано в п. 2.17.1.

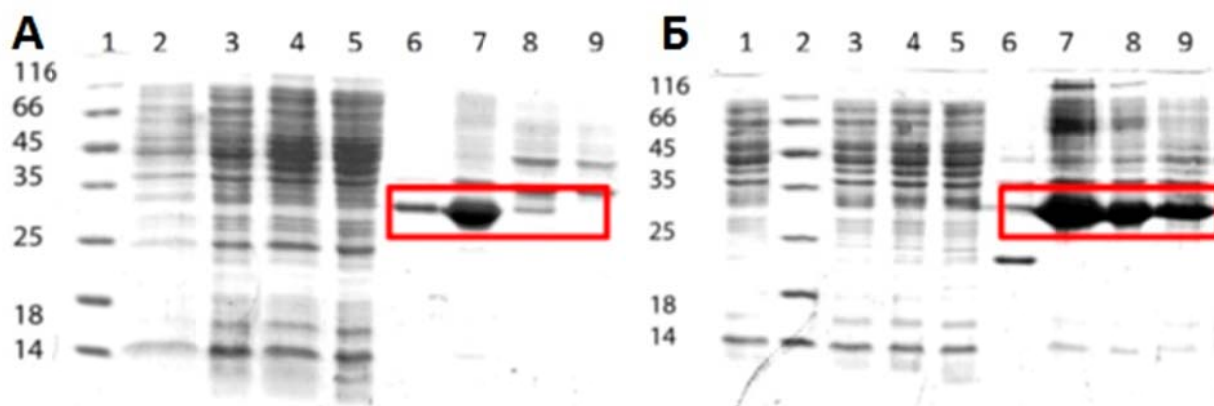


Рисунок 18. Электрофореграмма разделения в 15% SDS-PAGE фракций клеток штаммов BL21(DE3)-pET32a/Dest и B834(DE3)-pET32a/Dest. А – BL21(DE3)-pET32a/Dest. Инкубация с IPTG в течение 6 часов при 37°C. 1 – маркер молекулярных масс (кДа); 2-5 – фракции растворимых белков при концентрации IPTG 0.1, 1, 0.01 и 0 mM соответственно; 6-9 – нерастворимые фракции культуры при концентрации индуктора 100, 1000, 10 и 0 мкМ соответственно. Б – B834(DE3)-pET32a/Dest. Инкубация с лактозой в течение 18 часов при 25°C. 2 – маркер молекулярных масс (кДа); 2,3-5 – цитоплазматические фракции культуры при концентрации индуктора 10, 1, 0,1 и 0 mM соответственно; 6-9 – нерастворимые фракции культуры при концентрации индуктора а 0, 10, 1 и 0,1 mM соответственно. Окраска геля Кумасси G-250. Рамкой выделена область локализации целевого белка.

Во всех случаях Trx-Dest2 обнаруживалась только в тельцах включения. На рисунке 16 в качестве примера приведены электрофореграммы результатов разделения фракций клеток штаммов BL21(DE3)-pET32/Dest (индукция IPTG) и B834(DE3)-pET32/Dest (индукция лактозой).

3.5 Оптимизация условий культивирования штамма *E.coli*, несущего плазмиды pETmin/C-Dest, pETmin/minDest и pET15/N-Dest.

На следующем этапе работы мы оптимизировали условия культивирования штаммов-продуцентов с целью повышения выхода продукта, т. к. в стандартных условиях накопление Dest2 не превышало 2-3 мг на литр бактериальной культуры.

3.5.1 Оптимизация культивирования штаммов-продуцентов Dest2 в шейкере-инкубаторе.

Подбор условий культивирования бактерий проводили по схеме, описанной в п. 2.17.1

Наилучший результат был получен при использовании в качестве реципиентного штамма *E.coli* BL21(DE3)-Gold. На рисунке 19 в качестве примера приведены электрофореграммы с результатами разделения фракций растворимых и нерастворимых белков клеток штаммов *E.coli* BL21(DE3) и BL21(DE3)-Gold. Во втором случае полоса, соответствующая Dest2, чётко детектируется.

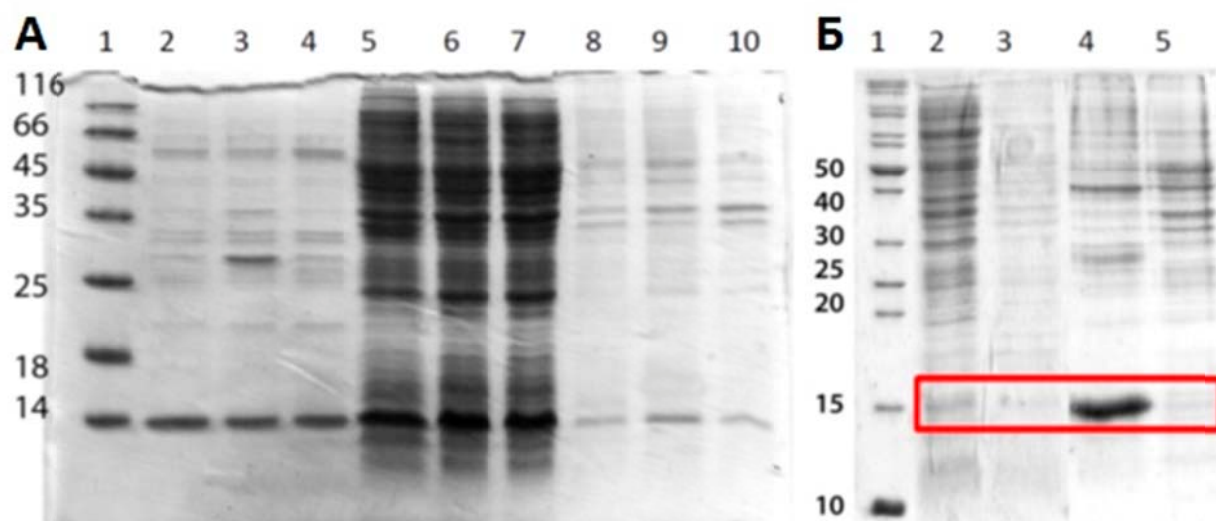


Рисунок 19. А – электрофореграмма разделения в 15% SDS-PAGE фракций клеток штамма *E.coli* BL21(DE3)-pET15/N-Dest. Инкубация с лактозой в течение 18 часов при 37⁰С. 1 – маркёр молекулярных масс (кДа); 2-4 - периплазматические фракции, концентрация лактозы 1, 10 и 0 мМ; 5-7 – фракции растворимых белков, концентрация лактозы 1, 10 и 0 мМ; 8-10 – нерастворимые фракции культуры при концентрации индуктора 1, 10 и 0 мМ. Б – результаты электрофоретического разделения в 15% SDS-PAGE фракций клеток штамма *E.coli* BL21(DE3)-Gold-pET15/N-Dest. 1 - маркёр молекулярных масс (кДа); 2,3 - цитоплазматические фракции, концентрация лактозы 1 и 0мМ соответственно, 4,5 – фракции растворимых белков, концентрация лактозы 1 и 0мМ соответственно. Культивирование клеток проводили в присутствии лактозы в течение 18 часов при 37⁰С. Окраска геля Кумасси G-250. Рамкой выделена область локализация целевого белка.

Выявлены различия в оптимальной температуре культивирования при наработке N-Dest2 и min-Dest2. Если в первом случае наилучшее накопление достигалось при температуре 37⁰С, то во втором – при 25⁰С (рисунок 20). При сравнении эффективности индукции экспрессии рекомбинантных генов было установлено, что использование IPTG более предпочтительно, чем лактозы.

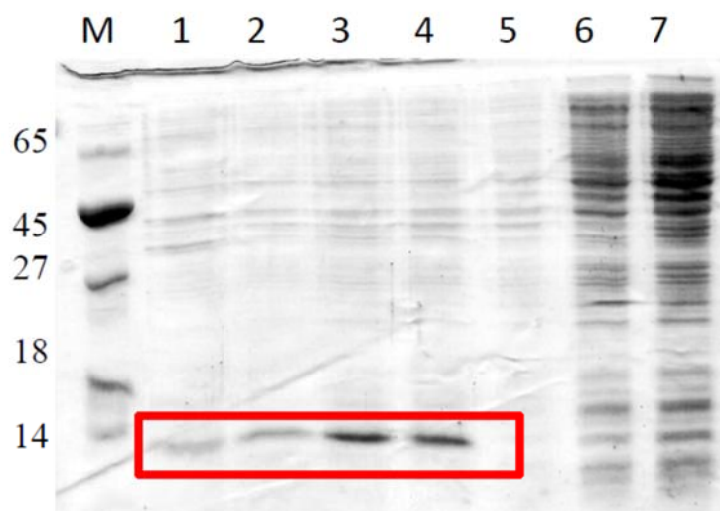


Рисунок 20. Электрофореграмма разделения в 15% SDS-PAGE фракции нерастворимых белков из клеток штамма *E.coli* BL21(DE3)-Gold-pETmin/minDest. М – маркеры молекулярных масс (кДа); дорожки 1, 2 – инкубация 16 часов при 25⁰С (концентрация IPTG 0,1 и 1 мМ соответственно); дорожки 3, 4 - инкубация 16 часов при 20⁰С (IPTG 0,1 и 1 мМ); дорожки 6, 7 - инкубация 6 часов при 37⁰С (IPTG 0,1 и 1 мМ); дорожка 5 – фракция нерастворимых белков штамма BL21(DE3)-Gold/pETmin (контрольный образец). Окраска геля Кумасси G-250. Рамкой выделена область локализации целевого белка.

Колониями клеток *E.coli* инокулировали жидкую питательную среду LB с ампициллином (100 мкг/мл) и культивировали в шейкере-инкубаторе 18ч при 180 об/мин и 37⁰С. Далее, 1/20 объемом культуры переносили в среду LB с ампициллином (100 мкг/мл), культивировали в шейкере-инкубаторе при 37⁰С до достижения ОП₆₀₀~0,6-0,8 и индуцировали экспрессию рекомбинантного гена *Dest2* добавлением IPTG до концентрации 0.01 мМ; 0.1 мМ или 1 мМ. Культивировали индуцированную культуру 6 часов при температуре 25⁰С (для pETmin/minDest) или 37⁰С (для pETmin/C-Dest и pET15/N-Dest). В качестве реципиентного штамма использовали *E.coli* BL21(DE3)-Gold.

Оптимизация условий культивирования не позволила существенно поднять выход целевого белка, который все равно не превышал 5мг/л бактериальной культуры.

3.5.2 Оптимизация культивирования штаммов-продуцентов Dest2 в лабораторном ферментере.

Для культивирования штаммов-продуцентов дестабилазы использовали лабораторный ферментёр Brunswick BioFlo 110 Fermentor/Bioreactor (Fisher Scientific) объёмом 5л. Условия выбирали на основании результатов культивирования в шейкере-инкубаторе (п. 3.5.1). Клетки, продуцирующие N-Dest2 и C-Dest2 культивировали при 37⁰С, а min-Dest2 - при 25⁰С. Индукцию проводили путем добавления раствора IPTG до концентрации 1мМ после достижения культурой OD₆₀₀≈0,8. Использовали среды ТВ и LB2х, определяли длительность инкубации.

В случае с N-Dest2 и min-Dest2 оказалось, что наибольшее количество целевого белка накапливается при культивировании в среде ТВ в течение 3-3,5 часов (рисунок 21). В среде LB2х такие же результаты приносила инкубация в течение 7-8 часов.

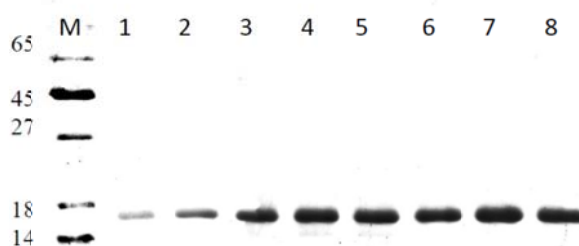


Рисунок 21. Электрофореграмма разделения в 15% SDS-PAGE фракции нерастворимых белков из клеток штамма *E.coli* BL21(DE3)-Gold-pET15/N-Dest после инкубации в ферментёре, в среде ТВ при 37⁰С, концентрация IPTG 1мМ. Время после индукции: 1 – 0,5ч; 2 – 1ч; 3 – 1,5ч; 4 – 2ч; 5 – 2,5ч; 6 – 3ч; 7 – 3,5ч; 8 – 4ч. М – маркёры молекулярных масс. Исследуемый образец телец включения, нанесенный на гель, получен из 30 мкл клеточной культуры. Окраска геля Кумасси G-250.

Для культивирования штаммов *E.coli* BL21(DE3)-Gold-pET15/N-Dest и BL21(DE3)-Gold-pETmin/C-Dest использовали следующую схему. Колониями клеток *E.coli* инокулировали в 300 мл жидкой питательной среды LB с ампициллином (100 мкг/мл) и культивировали в шейкере-инкубаторе 18ч при 180об/мин при 37°C. Далее культуру добавляли к 3л ТВ, культивировали в ферментёре при 37°C в течение 1,5 часов. Добавляли IPTG до конечной концентрации 1мМ и далее культивировали при 37°C в течение 3,5 часов. Биомассу отделяли центрифугированием, лизировали с помощью ультразвукового дезинтегратора и отмывали тельца включения.

В случае с min-Dest2, мы выбрали в качестве среды для культивирования LB2х. Это объясняется тем, что тельца включения, полученные при культивировании штаммов-продуцентов с этой средой, содержат меньше примесных белков, чем при использовании ТВ (рисунок 22).

Таким образом, в дальнейшем, при наработке min-Dest2 колонию клеток *E.coli* BL21(DE3)-Gold-pETmin/minDest засекали в 300 мл жидкой питательной среды LB с ампициллином (100 мкг/мл) и культивировали в шейкере-инкубаторе 18ч при 180 об/мин при 37°C. Далее, ночную культуру добавляли к 3л LB2х, культивировали в ферментёре при 25°C в течение 1,5 часов. Добавляли IPTG до конечной концентрации 0,5мМ и далее культивировали при 25°C в течение 5 часов. Из полученной биомассы выделяли тельца включения.

Использование ферментера позволило несколько повысить выход рекомбинантной дестабилазы, примерно до 10мг/л культуры для N-Dest2 и 5мг/л культуры для min-Dest2. Этого оказалось достаточно для оптимизации методов выделения и рефолдинга дестабилазы, однако для дальнейшей работы требовалось повысить уровень накопления целевого продукта.

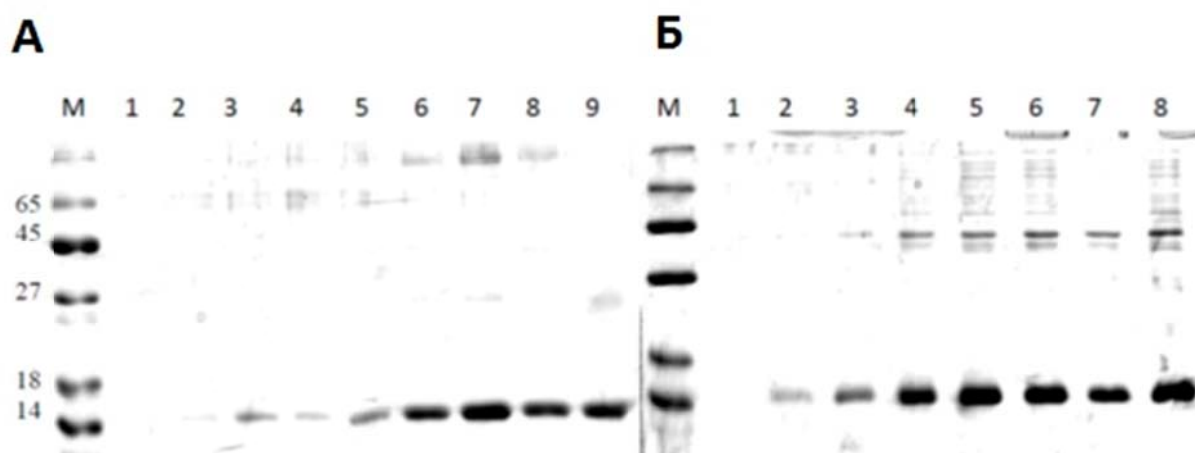


Рисунок 22. Электрофореграмма разделения в 15% SDS-PAGE фракции нерастворимых белков из клеток штамма *E.coli* BL21(DE3)-Gold-pETmin/minDest после инкубации в ферментёре при 25⁰С, концентрация IPTG 0,5мМ. А – ферментация в среде LB2х, образец телец включения, нанесенный на гель, получен из 50 мкл клеточной культуры. Б – ферментация в среде ТВ, образец телец включения, нанесенный на гель, получен из 80 мкл клеточной культуры. Время после индукции: 1 – 0ч; 2 – 1ч; 3 – 2ч; 4 – 3ч; 5 – 4ч; 6 – 5ч; 7 – 6ч; 8 – 7ч; 9 – 8ч. М – маркёры молекулярных масс.

3.8 Оптимизация условий культивирования штаммов-продуцентов дестабилазы *E.coli* BL21(DE3)-Gold-pETmin/N-Dest и *E.coli* BL21(DE3)-Gold-pETmin/minDest.

Как уже было сказано выше, первичный подбор условий культивирования штаммов-продуцентов дестабилазы не привел к существенному повышению выхода целевого белка. Для повышения уровня накопления дестабилазы мы произвели следующее:

- 1) проводили культивирование в различных питательных среды: LB, LB2х, SOB, M9+Glc, 2YT, TB, SB;
- 2) имеющимися плазмидами трансформировали различные реципиентные штаммы *E.coli*: origami (DE3), origami (DE3) pLysS, BLR, BLRpLysS, BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, BL21(DE3)-Gold, B834;

- 3) использовали два индуктора транскрипции: лактозу и IPTG;
- 4) получение биомассы проводили, используя различные схемы наращивания культуры: изменяли время роста, температуру и оптическую плотность при индукции.

Кроме того, мы получили плазмиды pETmin/minDest+ и pET15/N-Dest+, несущие оптимизированный по составу кодонов кодирующий участок для дестабилазы.

Культивирование осуществляли в шейкере-инкубаторе с ампициллином (100 мг/л) при 180 об/мин (орбита — 2,5 см). Из полученной бактериальной культуры выделяли фракцию нерастворимых белков и анализировали с помощью SDS-PAGE по Лэммли. Уровень накопления белка определяли денситометрически, используя в качестве стандарта гель с нанесенными в известных количествах лизоцимом куриного яйца (HEWL) и БСА.

3.8.1 Выбор реципиентного штамма *E.coli*.

Плазмидами pETmin/minDest, pET15/N-Dest, pETmin/minDest+, pET15/N-Dest+ трансформировали клетки *E.coli* штаммов origami (DE3), origami (DE3) pLysS, BLR, BLR pLysS, BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, BL21(DE3)-Gold, B834. Полученные колонии пересекали в среду LB и растили, 18 часов в присутствии 10мМ лактозы. Температура культивирования для каждого штамма составляла 37°C и 25°C. В результате электрофоретического анализа фракций нерастворимых белков для дальнейшей работы были отобраны штаммы *E.coli* BL21(DE3)-Gold-pET15/N-Dest+, BL21(DE3)-Gold-pET15/N-Dest, origami(DE3), BL21(DE3)-Gold, BL21(DE3)-Gold-pETmin/minDest. Результаты определения уровня накопления рекомбинантной Dest2 приведены в таблице 6.

Таблица 6.

Уровень накопления (миллиграмм на литр бактериальной культуры) рекомбинантной Dest2 в различных штаммах и при разной температуре.

Плазмида	Т, °C	Реципиентный штамм <i>E. coli</i>							
		origami	origami pLysS	BLR	BLR pLysS	BL21-Gold (DE3)	BL21 (DE3)	BL21 pLysS	B834 (DE3)
pET15/N-Dest	37	-	-	-	-	25	5	15	25
	25	30	-	-	-	40	25	30	30
pET15/N-Dest+	37	-	-	-	-	20	5	10	15
	25	40	-	-	-	35	30	45	40
pETmin/minDest	37	-	-	-	-	20	-	-	-
	25	-	-	-	-	15	5	-	-
pETmin/minDest+	37	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	10	5	-	-

3.8.2 Выбор питательной среды.

Выбранные штаммы культивировали в питательных средах LB, LB2х, SOB, M9+Glc, 2YT, TB, SB. В питательную среду высевалась отдельная колония. Рост проходил в течение 18 часов при температурах для каждого образца 37°C и 25°C. По результатам электрофоретического анализа фракций нерастворимых белков для дальнейшей работы были выбраны следующие пары штамм/среда:

E. coli BL21(DE3)-Gold-pET15/N-Dest+ и SB;

E. coli BL21(DE3)-Gold-pETmin/minDest и LB2х.

Результаты определения уровня накопления рекомбинантной дестабилазы приведены в таблице 7.

Таблица 7.

Уровень накопления (миллиграмм на литр бактериальной культуры) рекомбинантной Dest2 в различных штаммах и при разной температуре.

Штамм	Питательная среда						
	LB	LB2х	SOB	M9	2YT	TB	SB
BL21-Gold (DE3)-pET15/N-Dest	45	50	45	-	50	50	50
BL21-Gold (DE3)-pET15/N-Dest+	45	60	-	-	40	65	65
BL21-Gold (DE3)-pETmin/minDest	-	-	-	-	-	-	-
BL21-Gold (DE3)-pETmin/minDest+	20	30	-	-	-	-	-

3.8.3 Оптимизация схемы культивирования штаммов-продуцентов Dest2.

Для каждой пары штамм/среда мы опробовали четыре схемы культивирования, описанных в п. 2.17.2.

По результатам электрофоретического анализа фракций нерастворимых белков были выбраны следующие схемы культивирования:

E.coli BL21(DE3)-Gold-pET15/N-Dest+ культивировали по схеме 2 при 37°C с индукцией лактозой;

E.coli BL21(DE3)-Gold-pETmin/minDest культивировали по схеме 4 при 25°C с индукцией IPTG.

После дополнительного эксперимента по уточнению времени роста культуры, были выбраны следующие условия культивирования.

Отдельные колонии *E.coli* BL21(DE3)-Gold-pET15/N-Dest+ высевались в среду SB без индуктора и культивировались при 37°C в течение ночи. Ночную культуру добавляли к свежей среде SB в количестве 1/20 объема и подращивали до OD₆₀₀=0,8, после чего добавляли лактозу до концентрации 10мМ. Растили 6-7ч при 37°C.

Отдельные колонии *E.coli* BL21(DE3)-Gold-pETmin/minDest высевались в среду LB2х без индуктора и культивировались при 37°C в течение ночи. Клетки осаждали центрифугированием и ресуспендировали в объеме свежей среды LB2х, равном объему исходной ночной культуры. После инкубации в течение часа при 25°C добавляли IPTG до концентрации 1мМ. Растили 8ч при 25°C.

3.9 Выделение и ренатурация рекомбинантной дестабилазы с полигистидиновой последовательностью (C-Dest2 и N-Dest2).

Рекомбинантная Dest2 накапливалась в клетках *E.coli* в виде телец включения, поэтому её необходимо перевести в растворимую форму. Для этого, тельца включения, содержащие Dest2, растворяли в фосфатном буфере

с 8М мочевиной. Очистку Dest2 выполняли с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии в денатурирующих условиях (рисунок 23). Во фракции элюата Dest2 четко различимы три полосы (а, b и с, рисунок 23). С помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии установлено, что все они образованы дестабилазой. Таким образом, дестабилаза формирует комплексы неясной природы, не разрушаемые при пятиминутном кипячении в растворе, содержащем 1% SDS и 2% 2-меркаптоэтанол.

Мы провели эксперименты по подбору и оптимизации условий ренатурации Dest2 методом диализа. На первом этапе подбирали состав буфера, при диализе против которого наибольший процент белка остается в растворе. Использовали препарат очищенной N-Dest2. Диализ проводили в объеме 200мкл против 50мл буфера в течение ночи. Далее, полученные образцы центрифугировали в микроцентрифуге при 13400g 20мин, отделяли супернатант от осадка. Осадок растворяли в 200мкл 1%SDS. Полученные пробы анализировали с помощью SDS-PAGE.

Были использованы следующие буферы: 20мМ натрий-фосфатный буфер с рН 5, 6, 7, 8, 9 и 20мМ Tris-HCl с рН 5, 6, 7, 8, 9. Диализ проходил при 4°C в течение 18 часов. Далее с помощью SDS-PAGE оценивалось соотношение количества N-Dest2 в растворе и осадке: с увеличением рН в обоих случаях процент перехода в растворимую форму уменьшался, но в целом ренатурация диализом против натрий-фосфатного буфера проходила эффективнее, чем против Tris-HCl (рисунок 24). Поэтому для дальнейших исследований был выбран 20мМ натрий-фосфатный буфер с рН равным пяти.

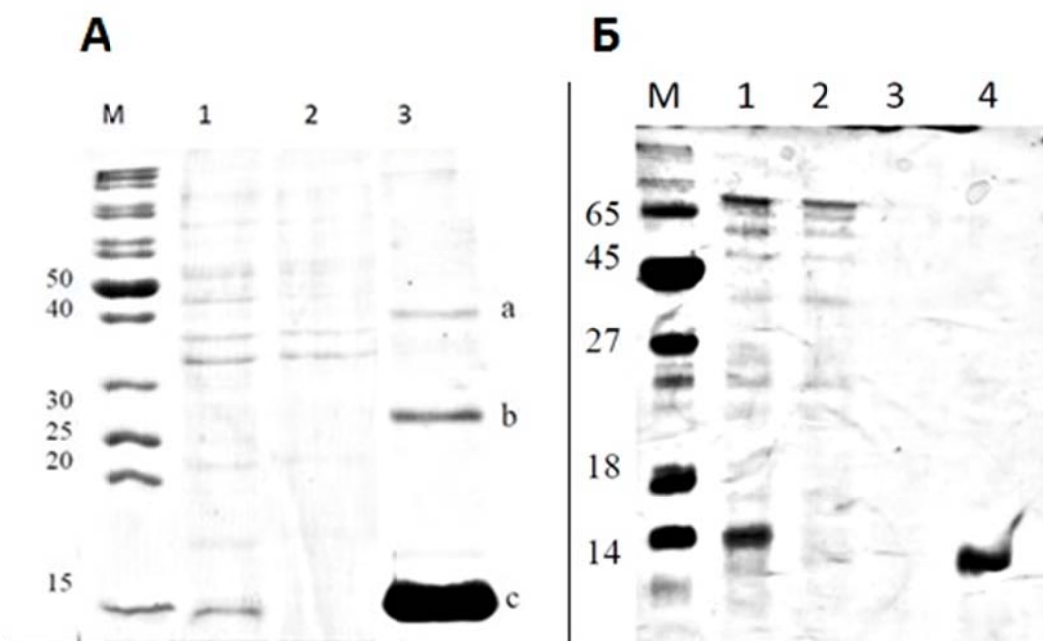


Рисунок 23. Электрофоретический анализ в 15% SDS-PAGE фракций, полученных в результате металл-хелатной аффинной хроматографии раствора телец включения, содержащих N-Dest2 (А). 1 – исходный образец до очистки; 2 – фракция белков, не связавшихся с сорбентом; 3 – фракция белков, связавшаяся с сорбентом. М – маркёры молекулярных масс (кДа). Полосы а, б, с в очищенном препарате, по результатам MALDI-TOF масс-спектрометрии, образованы дестабилазой. Аналогичный анализ фракций, полученных в результате катионообменной хроматографии на CM-сефарозе ренатурированной из телец включения min-Dest2 (Б). 1 – исходный образец до очистки; 2 – фракция белков, не связавшихся с сорбентом; 3, 4 – фракции, соответствующие пикам оптической плотности элюата при 280нм, полученные в процессе градиентной элюции. М – маркёры молекулярных масс (в килодальтонах). Окраска геля Кумасси G-250.

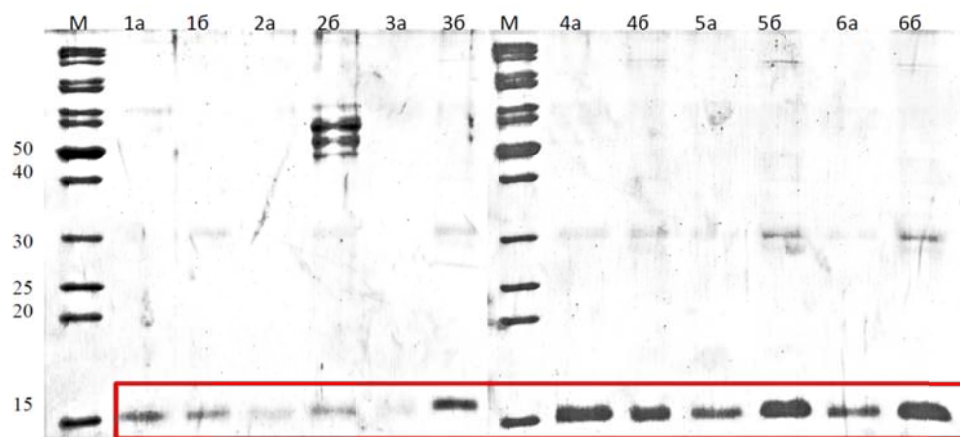


Рисунок 24. Электрофоретический анализ в 15% SDS-PAGE фракций, полученных после проведения одностадийного диализа денатурированного образца N-Dest2 против 20мМ Tris-HCl (дорожки 1-3) и против 20мМ натрий-фосфатного буфера (дорожки 4-6); дорожки 1, 4 – pH 5; дорожки 2, 5 – pH 6; дорожки 3, 6 – pH7; а – растворимая фракция, б – осадок. М – маркёры молекулярных масс. Окрашивание гелей проводили Кумасси G-250. Рамкой выделена область локализации целевого белка.

В ранее описанном способе ренатурации дестабилазы быстрым разведением (Завалова и др., 2010) буфер содержал смесь окисленного и восстановленного глутатиона. В наших экспериментах оказалось, что присутствие глутатиона снижает выход растворимого белка.

Для N-Dest2 показана зависимость эффективности рефолдинга от температуры, при которой проходит диализ и от концентрации самой дестабилазы в исходной пробе. Чем меньше исходная концентрация белка, тем меньшая его часть выпадает в осадок. При температуре 4°C ренатурация проходит эффективнее, чем при более высокой температуре (25°C и 37°C).

В общем случае, чем медленнее при диализе из белкового образца удаляется денатурирующий агент (в нашем случае, это 8М мочевины), тем эффективнее проходит рефолдинг. Поэтому было проведено сравнение одностадийного диализа со ступенчатым диализом с уменьшающейся концентрацией мочевины в буфере (4М, 2М, 1М, 0М). Ступенчатый диализ

проводили при 4⁰С, каждая стадия проходила 6 часов, последняя стадия – 18 часов. Эффективность ренатурации ступенчатым диализом оказалась выше, чем при одностадийном диализе. Установлено, что в этом случае в растворе остается около 70% от исходного количества N-Dest2.

Результаты эксперимента по подбору условий ренатурации диализом C-Dest2 аналогичны результатам для N-Dest2.

Основываясь на полученных результатах, мы разработали методику проведения рефолдинга Dest2. Очищенный с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии препарат дестабилазы разводили хроматографическим буфером (8М мочевины, 20мМ Na⁺-фосфатный буфер, 10мМ имидазол, 0,5М NaCl, 0,1% β-меркаптоэтанола, рН 7,5) до концентрации не более 0,5мг/мл. Полученный препарат подвергали ступенчатому диализу против 20мМ фосфатного буфера рН 5 сначала с концентрацией мочевины 4М, 2М, 1М и, в конечном итоге, без мочевины. Операции проводили при температуре 4⁰С. Полученный препарат очищали от выпавшего в осадок белка центрифугированием при 20000g 20мин. Раствор, содержащий дестабилазу, хранили в замороженном виде при -20⁰С.

3.10 Выделение и ренатурация рекомбинантной min-Dest2.

Для очистки min-Dest2 невозможно использовать металл-хелатную аффинную хроматографию, так как в молекуле отсутствует 6His мотив. В данном случае мы применили два метода. Во-первых, катионообменную хроматографию, сопряженную с рефолдингом. Во-вторых, ренатурацию неочищенной min-Dest2 с последующей очисткой путем ионообменной хроматографии.

На первом этапе солюбилизированные тельца включения диализовали против фосфатного или TrisCl буфера при различных значениях рН, как это описано для N-Dest2. Однако, в данном случае подход, разработанный для Dest2 с 6His, не привел к положительным результатам. Практически весь

белок выпадал в осадок. Некоторое количество дестабилазы оставалось в растворе лишь при pH 4, при котором растворы фосфата натрия и TrisCl полностью теряют свои буферные свойства. Добавление к образцам β -меркаптоэтанола (0,1%), DTT (15мМ) или PEG4000 (5%) не привело к положительным результатам (рисунок 25).

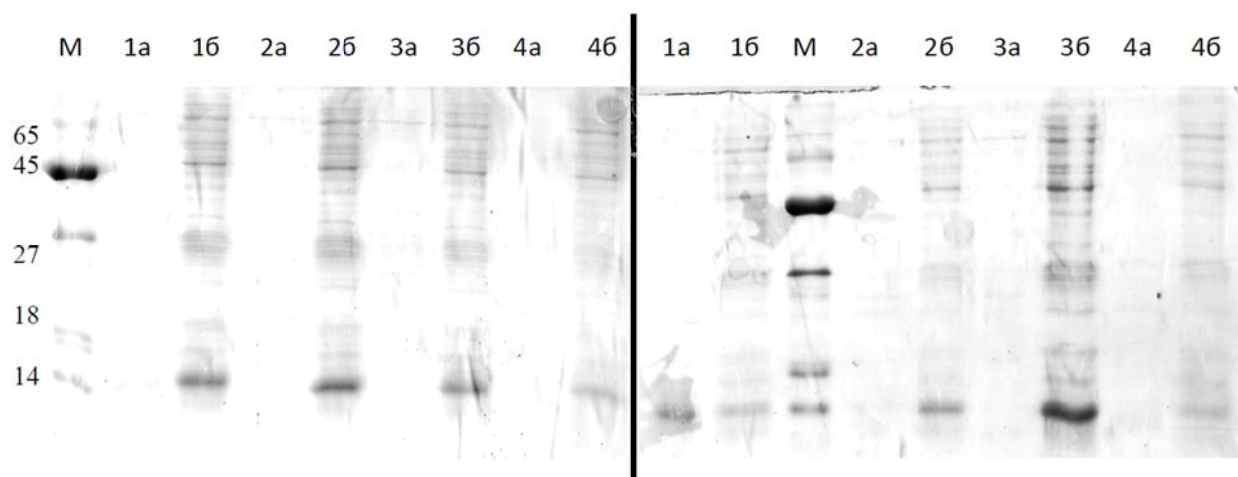


Рисунок 25. Электрофоретический анализ в 15% SDS-PAGE фракций, полученных после проведения одностадийного диализа денатурированного образца min-Dest2 против 20мМ Tris-HCl (слева) и против 20мМ натрий-фосфатного буфера (справа), pH 4. Дорожки 1 – без добавок; дорожки 2 - β -меркаптоэтанол (содержание в образце и буфере 0,1%); дорожки 3 – DTT (концентрация в образце и буфере 15мМ); дорожки 4 – PEG4000 (содержание в образце 5%); а – растворимая фракция; б – осадок; М – маркёр молекулярных масс. Окрашивание Кумасси G-250.

Для решения возникшей проблемы, мы провели эксперимент, используя в качестве буферных растворов 20мМ цитрат натрия и 20мМ ацетат натрия со значением pH, равным 4 и добавки, перечисленные выше. Наилучший результат был достигнут при использовании цитрата натрия без добавок: PEG4000 на результат не влиял, а β -меркаптоэтанол и DTT приводили к полному выпадению белка в осадок (рисунок 26).

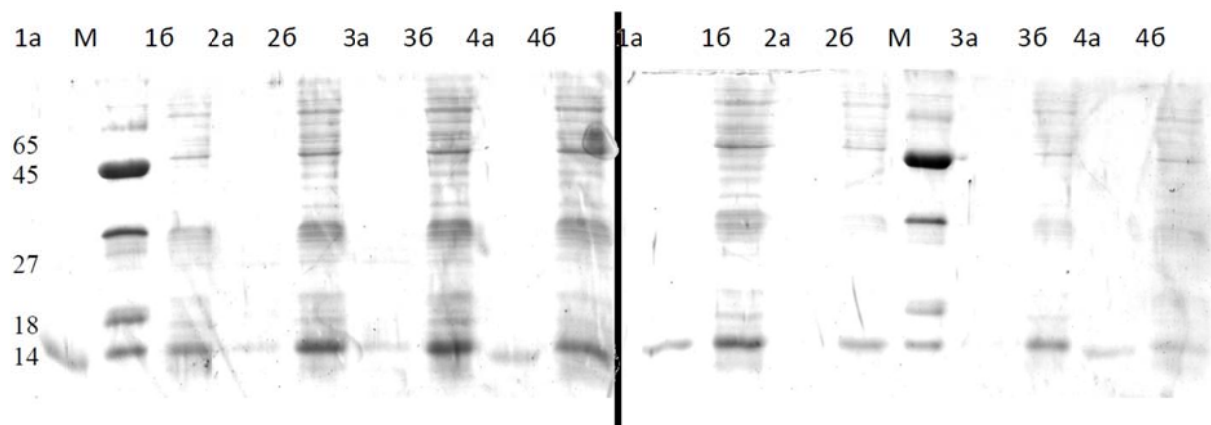


Рисунок 26. Электрофоретический анализ в 15% SDS-PAGE фракций, полученных после проведения одностадийного диализа денатурированного образца min-Dest2 против 20мМ цитрата натрия (слева) и против 20мМ ацетата натрия (справа), рН 4. Дорожки 1 – без добавок; дорожки 2 - β-меркаптоэтанол (содержание в образце и буфере 0,1%); дорожки 3 – DTT (концентрация в образце и буфере 15мМ); дорожки 4 – PEG4000 (содержание в образце 5%); а – растворимая фракция; б – осадок; М – маркёр молекулярных масс. Окрашивание Кумасси G-250.

Далее, мы провели определение оптимального значения рН для проведения диализа min-Dest2 против цитратного буфера: при рН 4 и 5 большинство примесных белков выпадает в осадок, а количество растворимой min-Dest2 начинает падать при рН больше шести (рисунок 27). Начиная с рН 6, значительно увеличивается переход в раствор других белков, в связи с чем оптимальным представляется выбор значения рН, равным пяти.

Мы исследовали влияние температуры при которой происходит диализ, на количество выпадающей в осадок min-Dest2, Зависимость оказалась обратной той, что наблюдалась в случае N-Dest2: при снижении температуры количество белка, выпавшего в осадок, возрастает.

Основываясь на полученных результатах, мы разработали методику проведения рефолдинга min-Dest2. Тельца включения растворяли в цитратном буфере с мочевиной (8М мочевины, 20мМ цитрат натрия, 0,1% β-

меркаптоэтанола, рН 5). Полученный препарат подвергали ступенчатому диализу против 20мМ цитратного буфера рН 5 сначала с концентрацией мочевины 4М, 2М, 1М и, в конечном итоге, без мочевины. Операции проводили при комнатной температуре. Полученный препарат очищали от выпавшего в осадок белка центрифугированием при 20000g в течение 20мин. Раствор, содержащий min-Dest2, хранили в замороженном виде при -20°C или подвергали хроматографической очистке.

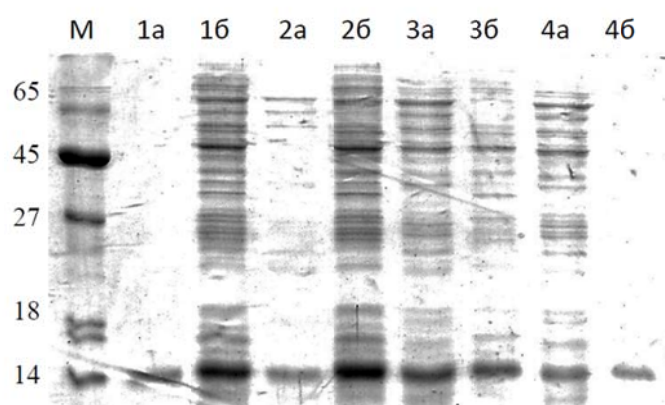


Рисунок 27. Электрофоретический анализ в 15% SDS-PAGE фракций, полученных после проведения одностадийного диализа денатурированного образца min-Dest2 против 20мМ цитрата натрия при различных значениях рН. Дорожки 1 – рН 4; дорожки 2 – рН 5; дорожки 3 – рН 6; дорожки 4 – рН 7; а – растворимая фракция; б – осадок; М – маркёр молекулярных масс. Окрашивание Кумасси G-250.

3.11 Хроматографическая ренатурация и очистка min-Dest2 с помощью катионообменной хроматографии.

Тельца включения подготавливали, как описано в пункте 3.1 с использованием кислого буфера А (8М мочевины, 20мМ цитрат натрия, 0,1% β-меркаптоэтанола, рН 5). Раствор наносили на хроматографическую колонку ХК-26/40 (GE Healthcare, США), наполненную 150 мл сорбента CM Sepharose® Fast Flow (GE Healthcare LS, США) и уравновешенную тем же

буфером. После нанесения, колонку промывали исходным буфером (не менее 2-х объемов сорбента), а затем линейным градиентом объемом 50мл от исходного буфера до 50% буфера В (20мМ цитрат натрия, 4М мочевины, рН 5) со скоростью потока 3 мл/мин. Далее, скорость потока снижали до 1,5мл и промывали линейным градиентом (объем 100мл) от 50% буфера А и 50% буфера В до 100% буфера В. Связавшиеся с сорбентом полипептиды элюировали буфером для элюции С (20мМ карбонат натрия, 250мМ NaCl) с линейным градиентом смены буфера, объем 150мл. Скорость потока буфера составляла 3мл/мин, контроль процесса и сбор фракций осуществлялся на основании проточного измерения оптической плотности элюата при 280нм (рисунок 28). Все операции по хроматографическому разделению выполняли с помощью хроматографа АКТА FPLC (GE Healthcare, США). Полученные фракции анализировали с использованием 15% SDS-PAGE.

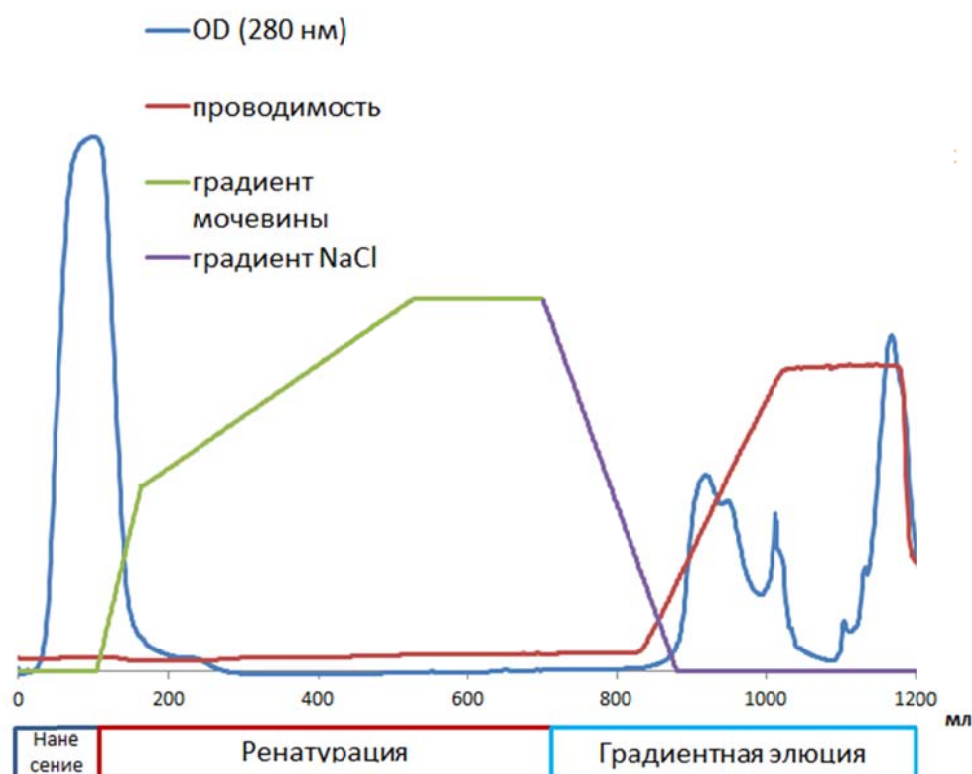


Рисунок 28. Хроматографический профиль рефолдинга и выделения min-Dest2 на колонке с CM-сефарозой.

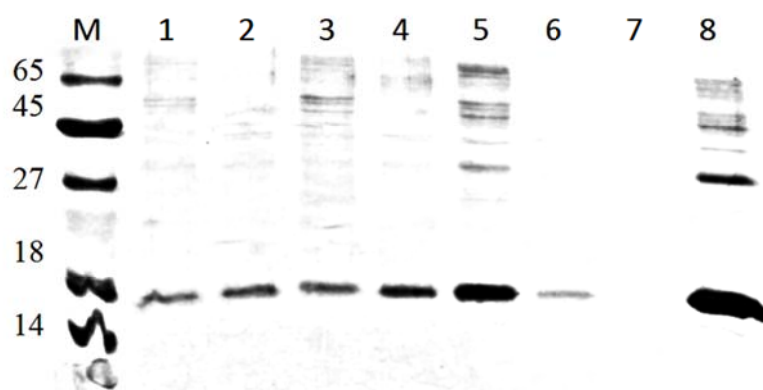


Рисунок 29. Электрофоретический анализ в 15% полиакриламидном геле фракций, полученных в результате рефолдинга на колонке с последующей катионообменной хроматографией на CM-сефарозе раствора телец включения min-Dest. 8 – исходный образец доочистки; 7 – фракция белков, не связавшихся с сорбентом; 1-6 – фракции, собранные в процессе градиентной элюции. М – маркёры молекулярных масс (кДа). Окраска геля Кумасси G-250.

Данный метод рефолдинга позволяет получить растворимый белок min-Dest2 и добиться значительной его очистки (рисунок 29). Кроме того, мурамидазная активность фермента, ренатурированного таким методом, выше, чем min-Dest2, ренатурированной диализом и выделенной методом ионообменной хроматографии.

3.12 Хроматографическая ренатурация N-Dest2.

Мы провели эксперименты по ренатурации N-Dest2 с использованием как CM-сефарозы, так и Ni Sepharose High Performance (GE Healthcare, США).

При использовании CM-сефарозы, очищенную с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии N-Dest2 диализовали против буфера А (8М мочевины, 20мМ цитрат натрия, 0,1% β-меркаптоэтанола, pH 5). Дальнейшие операции полностью соответствовали описанным в пункте 3.11.

При использовании Ni-сефарозы, образец солюбилизированных в буфере 1 (8М мочевины, 20мМ цитрат натрия, 0,1% β-меркаптоэтанола, pH 5) телец включения наносили на хроматографическую колонку XK-16/20 (GE Healthcare, США), наполненную 10 мл сорбента Ni Sepharose High Performance (GE Healthcare, США) и уравновешенную тем же буфером. После нанесения, колонку промывали исходным буфером (не менее 50 мл) и отмывочным буфером (8М мочевины, 20мМ Na⁺-фосфатный буфер, 40мМ имидазол, 0,5М NaCl, pH 7,5). Далее, проводили градиентную смену буфера (50мл) до буфера без содержания мочевины (20мМ Na⁺-фосфатный буфер, 40мМ имидазол, 0,5М NaCl, pH 7,5). Вслед за этим проводили ступенчатую элюцию буфером с высоким содержанием имидазола (0мМ Na⁺-фосфатный буфер, 500мМ имидазол, 0,5М NaCl, pH 7,5).

В обоих случаях, часть белка переходила в растворимую форму.

3.13 Получение рекомбинантных изоформ дестабилазы (Dest1 и Dest3).

Для получения рекомбинантных изоформ дестабилазы Dest1 и Dest3 была использована плазида pET15mcs. Процесс конструирования и получения активных изоформ дестабилазы полностью соответствует аналогичным процессам для N-Dest2. На рисунке 30 показано сравнение аминокислотных последовательностей полученных изоформ дестабилазы.

dest1	TVPSDCLSCICEVEGCDKEIGRCGDDAGSLSCGPYQIKEPYWIDCGSPGAGYQECTKEKA	60
dest2	QFTDSCLCRICKVEGCDSQIGKCGMDVGSLSGCPYQIKKPYWIDCGKPGGGYESCTKNKA	60
dest3	TVPSDCLRCICQVEGCNNEIGRCGMDAGSLSCGPYQIKEPYWIDCGRPGGGYQQCTKEKA	60
...		
dest1	CSETCVHAYMDRYFRRCTRGREPTCQDYAKIHNMGPNNGCRRTS-NTYWKNACLN	115
dest2	CSETCVRAYMKRYGRFCTGGRTPTCQDYARIHNGGPRGCKSSATVGYWNKVQKCLR	116
dest3	CSERCVHAYMDRYARRCTGGROPTCQDYAKIHNMGPNNGCQSSN-NHYWDNVRRLG	115

Рисунок 30. Выравнивание аминокислотных последовательностей полученных изоформ дестабилазы.

3.14 Получение слитого белка Dest2-SlyD и его процессинг.

Для получения слитого белка Dest2-SlyD была использована плаزمида pET-SlyD. В ходе работы, мы получили плазмиду pET- Dest2-SlyD, несущую ген слитого белка Dest2-SlyD с N-концевым 6His мотивом под контролем промотора поздних генов бактериофага T7.

Мы получили растворимую дестабилазу путем наработки в клетках *E.coli* слитого белка Dest2-SlyD с последующим протеолизом TEV-протеиназой и хроматографическим разделением продуктов. Фракционирование клеток *E.coli*, продуцирующих слитой белок Dest2-SlyD, показало, что целевой полипептид накапливался в цитоплазме клеток в растворимом виде с высоким выходом. Слитой белок не проявлял детектируемой ферментативной активности, характерной для дестабилазы.

После первичной очистки с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии уровень накопления составлял более 200мг/л бактериальной культуры. Подбор условий расщепления белка TEV-протеиназой показал, что реакция проходит успешно в широком диапазоне pH (5-9) и концентрации солей. Однако, для эффективного расщепления требуется высокое содержание β-меркаптоэтанола — не менее 0,5%. При концентрации в 0,1% и менее эффективность протеолиза резко падала. Оптимальное соотношение субстрата и протеиназы, подобранное нами путем серийных двукратных разведений TEV протеиназы, составило 100 к 1 по массе. При этом, при комнатной температуре, за три часа происходило расщепление $\frac{3}{4}$ исходного белка, а при инкубации в течение ночи — практически полное расщепление. В процессе расщепления слитого белка наблюдалось интенсивное образование осадка. На этой стадии наблюдались наибольшие потери целевого белка. Электрофоретический анализ по Лэммли показал, что происходит совместное осаждение SlyD и Dest2. SlyD и Dest2 образуют достаточно прочный комплекс даже после расщепления ковалентной связи между ними. При пропускании продуктов протеолиза через колонку с Ni Sepharose High Performance разделения белков не происходило. Dest2

связывалась с сорбентом и элюировалась совместно с шапероном в стандартных условиях (500mM NaCl, 20mM NaH₂PO₄, 10mM имидазол, pH 7.4), несмотря на отсутствие у нее 6His мотива. Добавление к образцу и хроматографическому буферу детергента TritonX-100 (0,1% об.) приводило лишь к частичному высвобождению Dest2. Не изменяло ситуацию и повышение (до 1M) или понижение (до 0,1M) концентрации NaCl. Поэтому мы использовали для разделения ионообменную хроматографию. При закислении образца после обработки TEV-протеиназой, что необходимо для последующей хроматографии на CM-сефарозе, выяснилось, что SlyD выпадает в осадок. Преципитация начиналась при pH ниже 5,5 и продолжалось до достижения pH 5. При этом выпадала в осадок примерно половина оставшейся в растворе Dest2, однако высаживалась большая часть SlyD. В процессе последующей хроматографии на CM-сефарозе происходило разделение SlyD и Dest2. Основная часть SlyD проходила через колонку, не связываясь с сорбентом, в то время, как дестабилаза полностью связывалась и элюировалась при значительном содержании соли в растворе, максимум пика наблюдался при электропроводности 280 mS/cm. Для полного разделения и удаления минорных количеств SlyD мы проводили хроматографию в присутствии 1M мочевины. Мы установили, что при концентрации мочевины в процессе хроматографии 0,5M и 1M, не происходит снижения мурамидазной активности Dest2 относительно образца, полученного при разделении без мочевины. При концентрации 2M мурамидазная активность Dest2 падает до уровня 20% от исходной. Добавление мочевины позволило добиться отсутствия во фракциях Dest2 остаточных количеств шаперона. В целом, разработанный нами технологический процесс имеет весьма низкую эффективность. Конечный выход очищенной Dest2 получался в районе 5мг на 1г исходного слитого белка (рисунок 31).

3.15 Получение Dest2 в дрожжах *P. pastoris* (Dest2-Yeast).

Рекомбинантную Dest2 в дрожжах *P. pastoris* получали с помощью набора PichiaPink Expression System (Life Technologies, USA).

Рекомбинантные штаммы *P. pastoris* получали в соответствии с инструкциями к использованному набору PichiaPink Expression System (Life Technologies, USA). Электрокомпетентные клетки, трансформацию и определение уровня продукции рекомбинантного белка проводили согласно рекомендации производителя набора.

В результате был выбран штамм *P. pastoris* №4 (*ade2, prb1, pep4*) (Life Technologies, USA), несущий в геноме встроенную плазмиду pLC-Kill-Dest6His. Рекомбинантный участок ДНК кодирует зрелую Dest2, имеющую на N-конце сигнальный пептид белка-киллера *S. cerevisiae*) и 6His мотив на C-конце.

Полученный нами штамм-продуцент *P. pastoris* продуцирует активную Dest2-Yeast в культуральную жидкость. Проведение металл-хелатной аффинной хроматографии позволяет простым образом сконцентрировать и очистить целевой белок. Выход продукта составил 1,5мг на литр дрожжевой культуры (рисунок 31).

3.16 Получение Dest2 в линии клеток Expi293F (Dest2-Expi).

Нами была получена плазмида pcDNA3.4-Dest2, кодирующая Dest2 с собственным сигнальным пептидом и имеющую C-концевой 6His мотив.

Клетки почки эмбриона человека линии Expi293F, трансфицированные плазмидой pcDNA3.4-Dest2, секретируют Dest2 в культуральную жидкость. Наличие C-концевого 6His мотива позволяет с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии сконцентрировать и очистить целевой белок. Выход Dest2 составил 20мг/л суспензионной культуры Expi293F (рисунок 31).

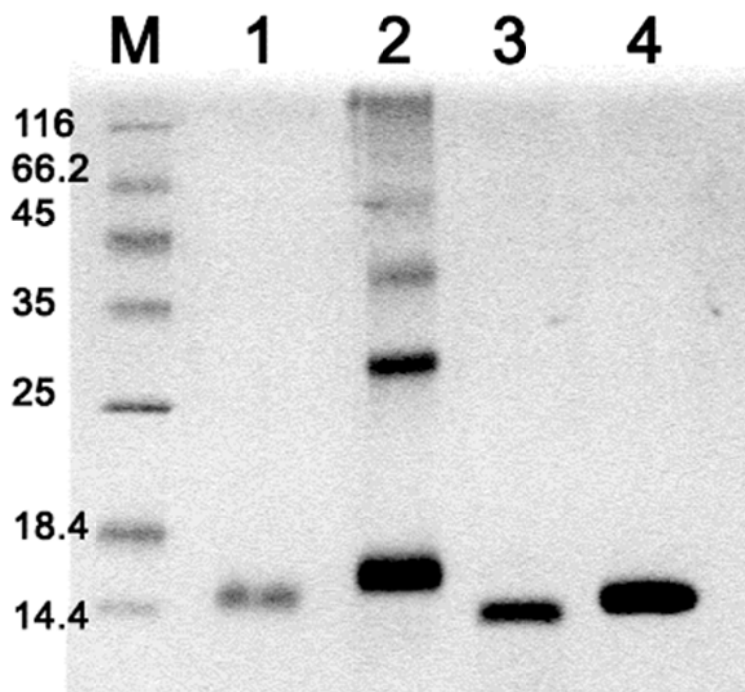


Рисунок 31. Электрофоретический анализ в SDS-PAGE по Лэммли образцов рекомбинантной Dest2, выделенной из разных источников: культуральной жидкости дрожжей *P. pastoris* (Dest2-Yeast) (1), рефолдированной из телец включения *E. coli* (Dest2-IB) (2), процессированной из слитого белка SlyD-Dest2 (Dest2-SlyD) в *E.coli* (3), культуральной жидкости линии клеток человека Expi293F (Dest2-Expi) (4). М – маркеры молекулярной массы, слева указаны соответствующие значения в кДа.

Таким образом, в клетках *E. coli* были получены все известные изоформы дестабилазы, ренатурированные из телец включения. Нам удалось получить Dest2 в растворимой форме: в виде слитого белка с шапероном SlyD. Получена рекомбинантная Dest2 в эукариотических системах экспрессии: в дрожжах *P. pastoris* и культуре клеток человека Expi293F.

3.17 Определение литической активности полученных рекомбинантных дестабилаз.

Известно, что дестабилаза является полифункциональным ферментом, обладающим мурамидазной, изопептидазной и антибактериальной активностями (Баскова и др., 2008; Завалова и др., 2010).

На первом этапе мы исследовали мурамидазную активность полученных ферментов. Мы использовали два метода определения этой активности. Один из них является классическим методом определения мурамидазной активности лизоцимов и основан на гидролизе очищенных клеточных стенок *M. lysodeikticus* (Zavalova et al., 2000). Однако, дестабилаза, помимо мурамидазной активности, обладает и антибактериальными свойствами, с ней не связанными (Zavalova et al., 2006). Поэтому мы решили исследовать суммарное действие дестабилазы на лизис бактериальных клеток. Данную активность мы называли литической.

Метод определения литической активности основан на измерении концентрации белка методом Брэдфорд, выделившегося из клеток *E.coli*, обработанных ферментом. Данный метод позволяет определить суммарную лизоцимную и антибактериальную активность фермента: после обработки клеток дестабилазой происходит как специфичное разрушение внешней клеточной стенки (фермент проявляет непосредственно мурамидазную функцию), так и неспецифичное (для инактивированной дестабилазы показано наличие ярко выраженной антимикробной активности, механизм которой до конца не ясен). Для отработки метода были взяты клетки *E.coli* штамма Top 10. Клетки ресуспендировали и инкубировали в буфере TE (20мМ Tris-HCl, 10мМ ЭДТА) с 20% сахарозой и добавляли 7 объёмов воды. Определяли зависимость литической активности от концентрации дестабилазы. Результаты приведены на рисунке 32. В диапазоне концентраций N-Dest2 от 5 до 15 мкг/мл зависимость линейная, при больших концентрациях наступает насыщение.

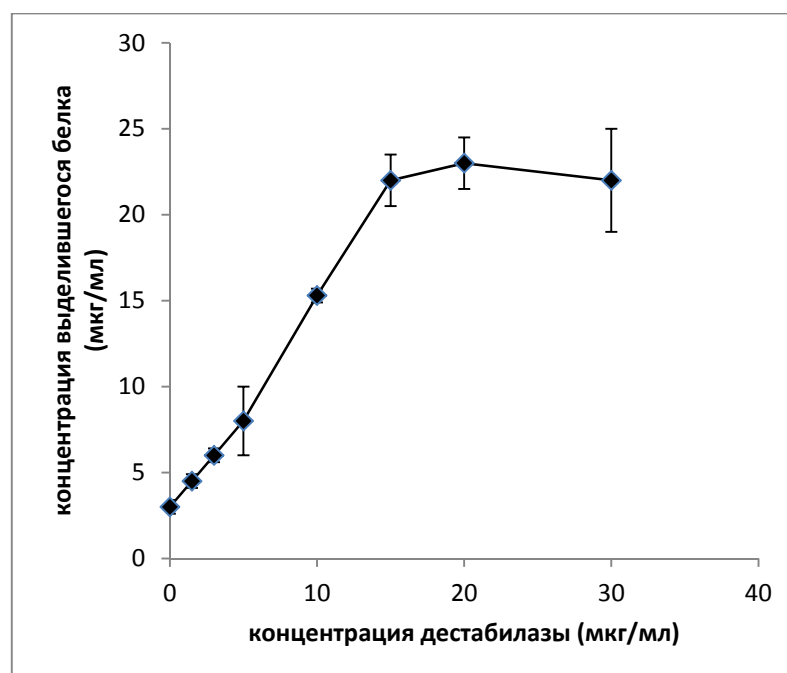


Рисунок 32. Зависимость количества суммарного белка в пробе после обработки клеток *E.coli* штамма Top 10 от концентрации N-Dest2 в растворе. (n=5, p<0.05).

Были определены оптимальные для работы N-Dest2 pH и ионная сила буфера. На рисунке 33 показана зависимость активности N-Dest2 от pH буфера. Оптимальный диапазон значения pH составил 8,8-9,0. На рисунке 33 показана зависимость литической активности дестабилазы от ионной силы гипертонического буфера (pH 9), которая изменялась путем добавления хлорида натрия. Максимальное значение активности получено при концентрации 0,3-0,4М NaCl.

Мы провели сравнение литической активности N-Dest2, C-Dest2 и min-Dest2, ренатурированных путем диализа, с активностью HEWL при оптимальных определенных значениях pH (9,0) и ионной силы (0,3М NaCl). Результаты представлены на рисунке 34. N-Dest2 и min-Dest2 при данном способе измерения, обладают активностью, сопоставимой (60-70%) с активностью HEWL. У C-Dest2 литическая активность практически не выражена и в дальнейших экспериментах не использовалась.

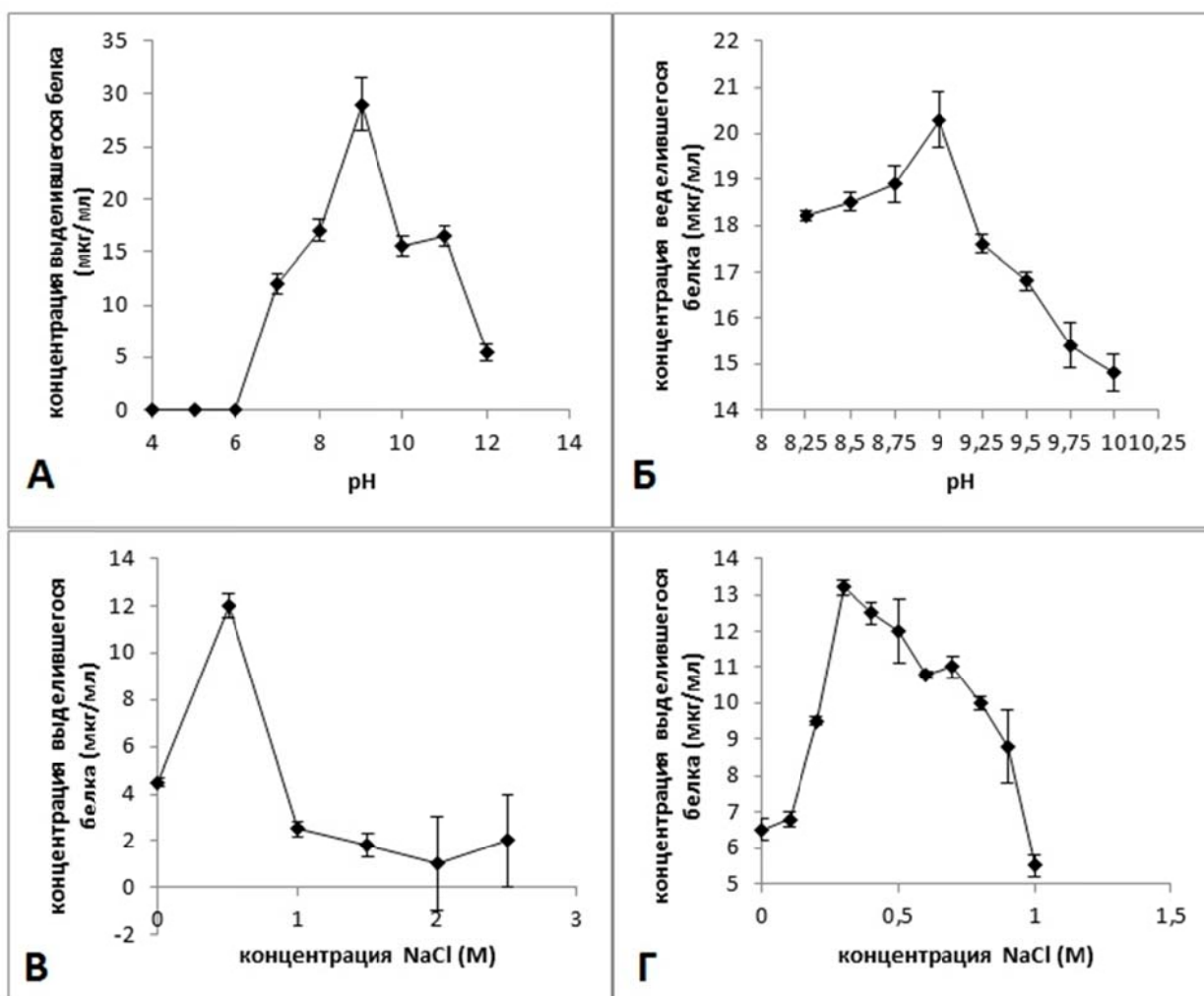


Рисунок 33. Концентрация суммарного белка в пробе после обработки клеток *E.coli* ферментом N-Dest2 в зависимости от pH буфера (А, Б) и концентрации NaCl в буфере (pH 9) (В, Г).

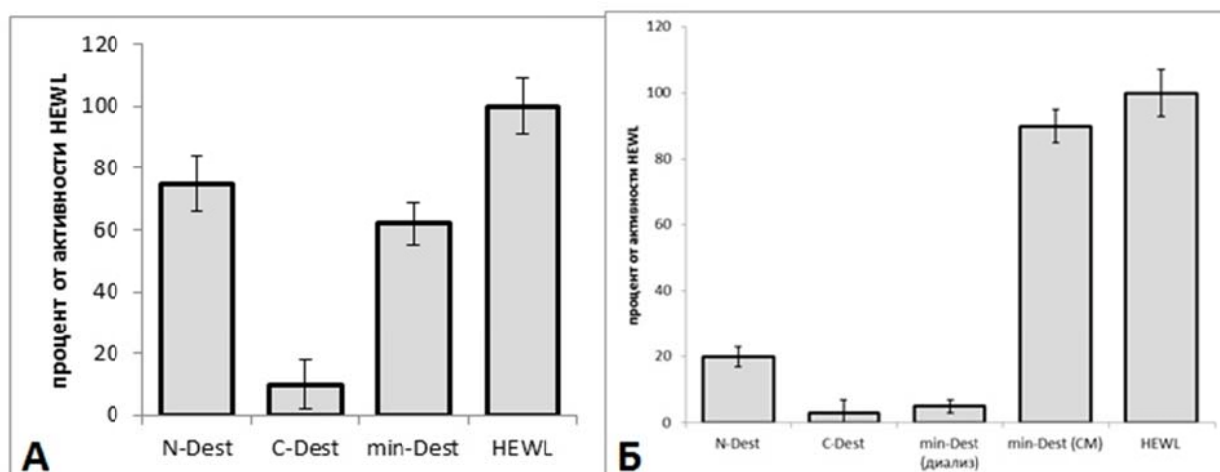


Рисунок 34. Сравнительная лизоцимная активность N-Dest2, C-Dest2, min-Dest2 (min-Dest2 (диализ) – дестабилаза рефолдированная диализом, min-Dest2 (CM) – дестабилаза рефолдированная CM-сефарозе) и HEWL, определенная по высвобождению белка из клеток *E.coli* (А) и определенная по методу просветления суспензии клеточных стенок *M. lysodeikticus* (Б). Активность ферментов выражена в процентах от активности HEWL ($n=6$, $p<0.05$). Все дестабилазы рефолдированы методом диализа.

Литическую активность изоформ Dest определяли на *B. subtilis* и *E.coli*. Нами была проанализирована зависимость литической активности от pH и ионной силы буфера. На рисунке 35 приведены графики зависимостей только для Dest3 (для Dest1 и N-Dest2 зависимости аналогичные).

Зависимость литической активности по отношению к *B.subtilis* в зависимости от pH показана на рисунке 34а. Зависимость литической активности по отношению к *B.subtilis* от ионной силы буфера определяли при pH 6,3 (максимум литической активности) (рисунок 34б).

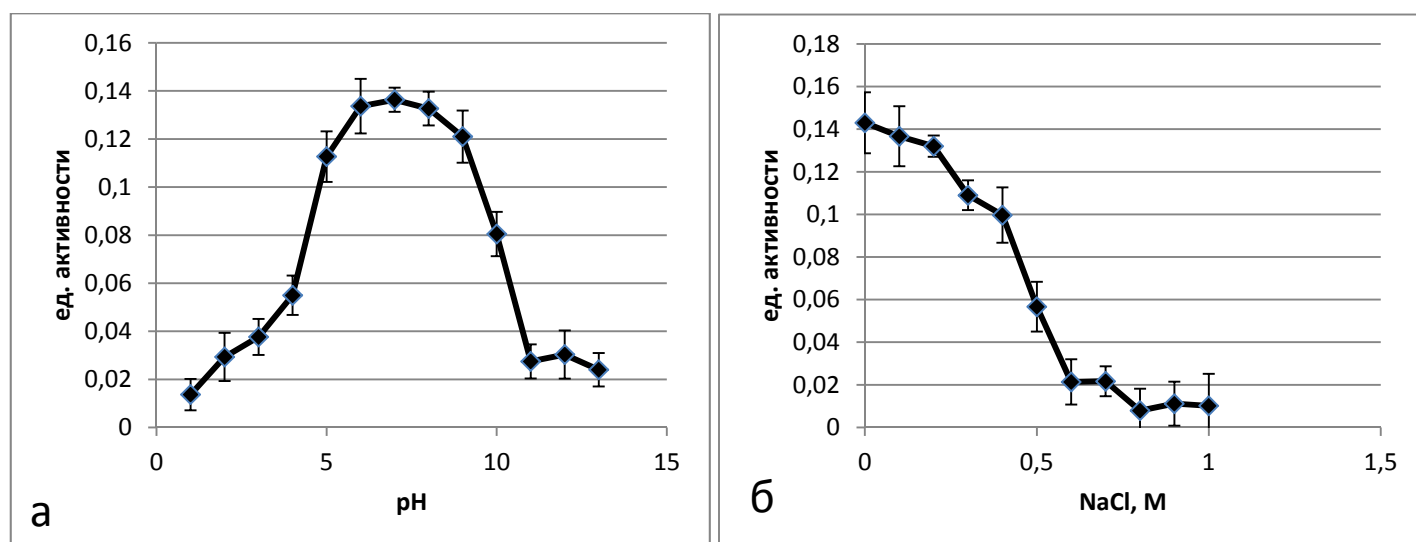


Рисунок 35. Зависимость литической активности рекомбинантной Dest3 от pH буфера и его ионной силы. Активность измерялась по уровню выделившегося белка из клеток *B.subtilis*, обработанных Dest3: а) зависимость литической активности от pH буфера; б) зависимость литической активности от ионной силы буфера, выраженной в концентрации NaCl при pH 6,3.

Все изоформы Dest имеют схожие профили pH и ионной силы буфера. Дестабилаза проявляет литическую активность в довольно широком диапазоне pH: от 5 до 10. Максимум активности приходится на диапазон pH 6-8. В этом диапазоне (при pH 6,3) литическая активность падает с увеличением ионной силы буфера, и при концентрации NaCl более 0,6 М дестабилаза не проявляет литической активности.

Определена зависимость литической активности дестабилазы от pH и соли в буферах без ЭДТА и в присутствии ЭДТА по отношению к *E.coli*. Дестабилаза проявляет максимальную литическую активность в буферах без ЭДТА также при широком диапазоне pH 5-9, причём активность обратно пропорциональна содержанию солей в буфере. В буфере с ЭДТА кривая литической зависимости сдвигается к щелочным показателям (pH 6-10) по сравнению с буфером без ЭДТА, но наблюдается пик активности при 0,3М NaCl (рисунок 36).

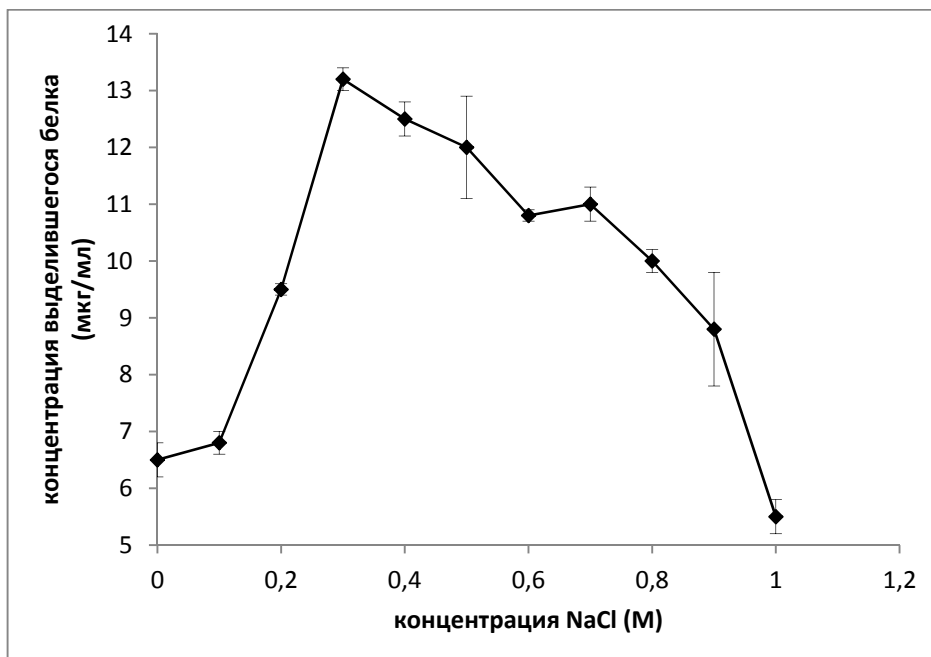


Рисунок 36. Зависимость литической активности рекомбинантной Dest3 от ионной силы буфера при pH 6,3 в присутствии ЭДТА. Активность измерялась по уровню выделившегося белка из клеток *E.coli*, обработанных Dest3.

3.18 Определение мурамидазной активности полученных рекомбинантных дестабилаз.

Общепринятый метод определения мурамидазной активности ферментов базируется на определении уровня просветления суспензии клеточных стенок *M. lysodeikticus* (Zavalova et al. 2000). Мурамидазная активность фермента измерялась в процентах от активности HEWL.

Клеточные стенки *M. lysodeikticus* суспендировали в 20 мМ цитрате натрия до концентрации 0,5 мг/мл. Оптимальный диапазон pH работы N-Dest2, полученный методом просветления клеточных стенок (pH 7-10) совпадает с диапазоном, полученным методом определения концентрации выделившегося из бактериальных клеток белка, но максимальная активность сохраняется в более широких пределах. Определён оптимальный pH для min-Dest, который составляет 6 (рисунке 37). Определена сравнительная

мурамидазная активность полученных дестабилаз и HEWL. На рисунке 34 показана динамика просветления клеточных стенок *M. lysodeikticus*, обработанных HEWL, N-Dest2, C-Dest2, min-Dest2, рефолдированной диализом и рефолдированной на сорбенте CM. Наибольшей активностью обладает min-Dest2, рефолдированная на CM-сефарозе.

Приведённые данные показывают, что C-Dest2 заметной мурамидазной активностью не обладает, что согласуется с результатами, полученными предыдущим методом. Активность min-Dest2, рефолдированной на CM-сефарозе, определенная методом просветления клеточных стенок, многократно превосходит активность других образцов. Следует отметить, что при использовании метода определения концентрации выделившегося из бактериальных клеток белка, описанного выше, такой разницы не наблюдалось. Общая мурамидазная активность, измеренная таким методом относительно активности HEWL, выше, чем относительная активность, измеренная на специфическом субстрате.

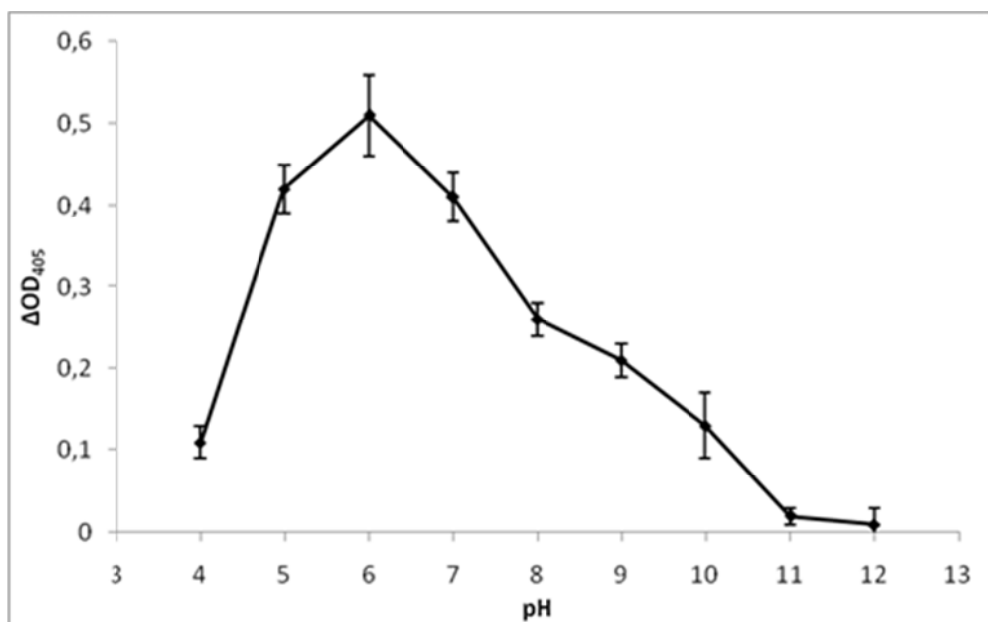


Рисунок 37. Динамика просветления суспензии клеточных стенок *M. lysodeikticus* после обработки min-Dest2, рефолдированной на CM-сефарозе от pH буфера.

Нами была проанализирована зависимость мурамидазной активности изоформ дестабилаз от pH и ионной силы раствора. На рисунке 38 приведены графики зависимостей только для Dest3 (для Dest1 и Dest2 зависимости аналогичные).

У полученных рекомбинантных дестабилаз наблюдается 2 пика активности: при pH 2,2 и 6,3, причём на pH 2,2 фермент максимально проявляет свою активность при 150мМ NaCl, а на pH 6,3 – при 0мМ NaCl (рисунок 38). Причём диапазон pH мурамидазной активности изоформ дестабилазы широкий: дестабилаза проявляет свою активность при pH 2-12.

Далее определяли мурамидазную активность Dest2, полученных в разных системах экспрессии. Результаты измерений представлены на рисунке 39.

Наибольшей активностью обладает Dest2, полученная из слитого белка SlyD-Dest2: она в 5 раз превосходит активность контрольного лизоцима HEWL. Dest2, полученная из клеток человека и из дрожжей проявила схожую активность: она в 3 раза больше активности HEWL. Мурамидазная активность Dest2, полученной из телец включения *E.coli*, составила около 20% от активности HEWL.

Таким образом, разница в мурамидазной активности у полученных нами Dest2, составляет более 10 раз. Однако, зависимость мурамидазной активности Dest2, полученной в клетках человека от pH и ионной силы буфера полностью аналогична этим зависимостям для Dest3 (рисунок 38).

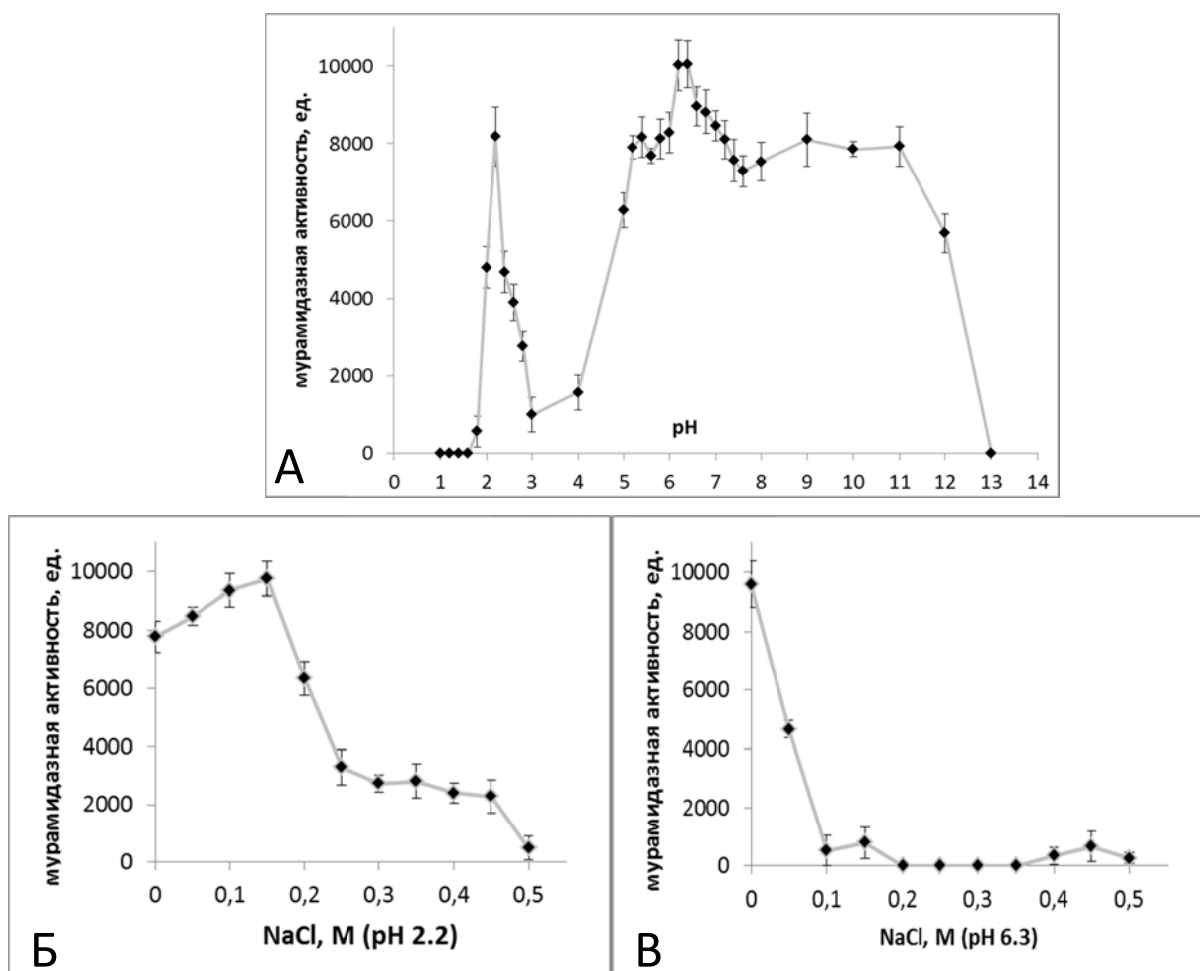


Рисунок 38. Зависимость мурамидазной активности рекомбинантной Dest3 от pH буфера и его ионной силы. Активность измерялась по уровню просветления суспензии клеточных стенок *M. luteus*: а) зависимость мурамидазной активности от pH буфера; б) зависимость мурамидазной активности от ионной силы буфера, выраженной в концентрации NaCl при pH 2,2; в) зависимость мурамидазной активности от ионной силы буфера, выраженной в концентрации NaCl при pH 6,3.

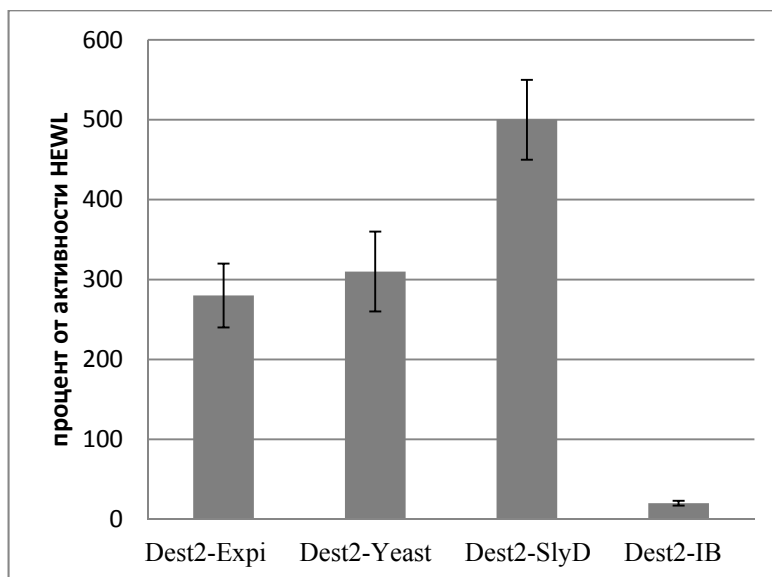


Рисунок 39. Мурамидазная активность рекомбинантной Dest2, полученной из различных источников: линии клеток человека Expi293F (Dest2-Expi), дрожжей (Dest2-Yeast), из слитого белка SlyD-Dest2 в *E.coli* (Dest2-SlyD) и рефолдированной из телец включения *E.coli* (Dest2-IB). Активность выражена в процентах от активности HEWL (лизозим белка куриного яйца), принятой за 100% и определённая в этих же условиях.

3.19 Изопептидазная активность дестабилазы.

Изопептидазная активность определялась с помощью хромогенного субстрата L- γ -Glu-pNA (Баскова и др., 1990). Нами была проанализирована зависимость изопептидазной активности от времени инкубации, концентрации фермента, pH и ионной силы буфера. Далее приведены графики зависимостей только для Dest3 (для Dest1 и Dest2 зависимости аналогичные).

Нами была показана зависимость активности от pH и от ионной силы буфера при pH 5,5 (рисунок 40)

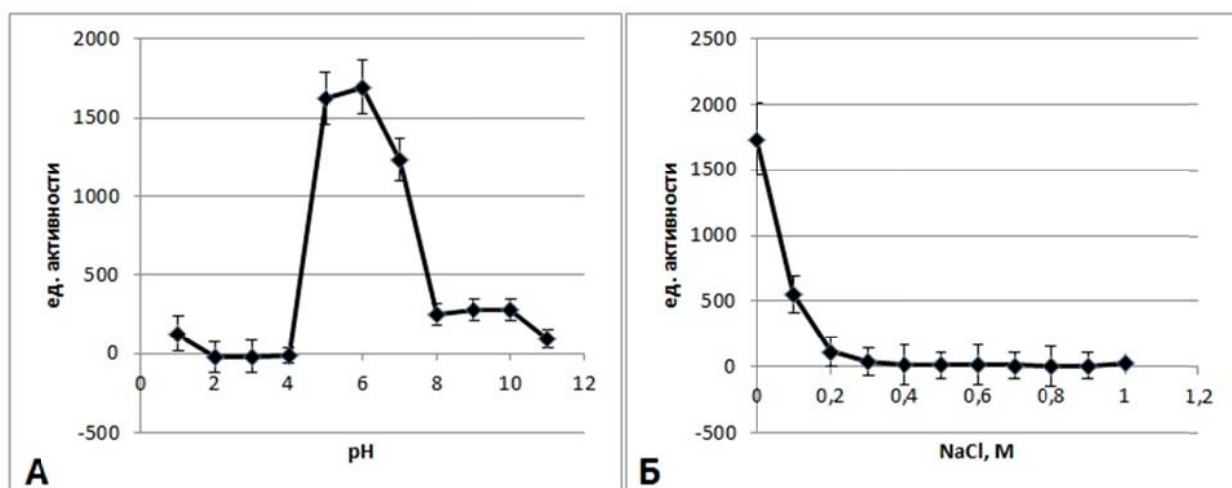


Рисунок 40. Зависимость изопептидазной активности рекомбинантной Dest3 от pH и ионной силы буфера. Изопептидазная активность определялась с помощью хромогенного субстрата L-g-Glu-pNA: А) зависимость изопептидазной активности от pH буфера; Б) зависимость изопептидазной активности от ионной силы буфера, выраженной в концентрации NaCl, при pH 5,5

Dest3 проявляет изопептидазную активность в довольно узком диапазоне pH: от 4,5 до 7. Максимум изопептидазной активности приходится на pH 5,5, причём зависимость активности Dest3 от ионной силы буфера обратно пропорциональна: чем больше концентрация соли, тем меньше активность белка. Dest не проявляет изопептидазной активности, если содержание NaCl больше 0,2 М. Стоит заметить, что при инкубации с хромогенным субстратом дестабилаза выпадает в осадок при концентрации выше 500 мкг/мл.

Результаты измерений изопептидазной активности Dest2, полученных в разных системах экспрессии, представлены на рисунке 41. По вертикальной оси отложено значение активности, рассчитанное исходя из изменения оптической плотности образцов при длине волны 405нм.

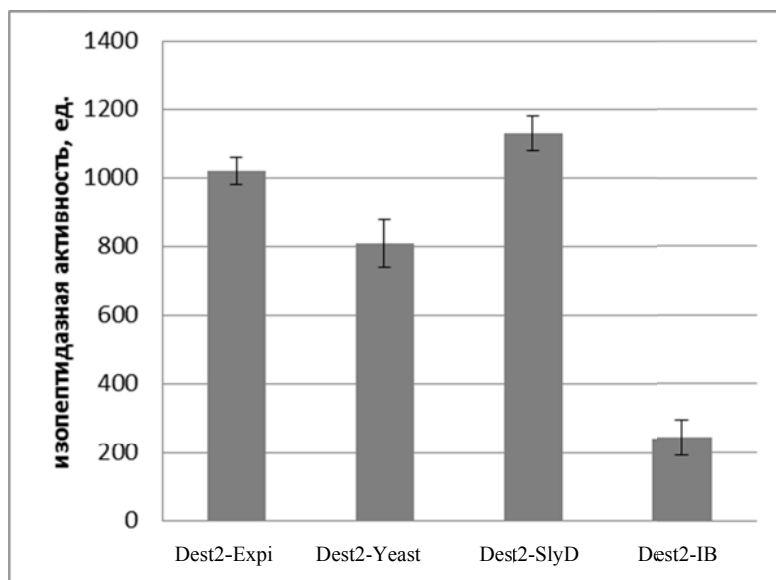


Рисунок 41. Изопептидазная активность рекомбинантной Dest2, полученной из различных источников: линии клеток человека Expi293F (Dest2-Expi), дрожжей (Dest2-Yeast), из слитого белка SlyD-Dest2 в *E.coli* (Dest2-SlyD) и рефолдированной из телец включения *E.coli* (Dest2-IB).

Изопептидазная активность ренатурированного фермента до пяти раз ниже активности продуцируемых в растворимой форме Dest2. Мы провели сравнение профилей изопептидазной активности при разных pH и ионной силе буфера между ренатурированной Dest3 и высокоактивной Dest2 из клеток человека. Высокоактивная Dest2 из культуры клеток человека имеет такие же зависимости изопептидазной активности от pH и ионной силы буфера, как и Dest3 (рисунок 39).

В таблице 7 для сравнения приведены характеристики изоформ дестабилаз, полученных в клетках *E.coli* и ренатурированных из телец включения. Dest2 проявляет наименьшую активность среди всех изоформ: в среднем её общая активность в 2 раза меньше, чем активность Dest1 и в 4 раза меньше, чем Dest3. Методом двойных обратных координат были определены константа Михаэлиса и скорости изопептидазной активности для изоформ дестабилазы: константа Михаэлиса лежит в диапазоне 20-50 мкМ, а константа скорости $5-8 \times 10^{-2} \text{с}^{-1}$. Для Dest2, полученной из клеток человека

Exp1293F, константа Михаэлиса меньше в 5 раз, а скорость реакции – в 25 по сравнению с константами для ренатурированной Dest2.

Таблица 7.

Сравнение ферментативных активностей изоформ дестабилазы, полученных в клетках *E.coli* из телец включения и в клетках человека линии Exp1293F.

	Мурамидазная активность (в лизоцимных единицах)	Литическая активность	Изопептидазная активность			Условия действия фермента		
			ед. активности	K_m , μM	k_{cat} , $\times 10^{-2} c^{-1}$	Мурамидазная активность	Литическая активность	Изопептидазная активность
Dest1	5200 $\pm$ 450	0,079 $\pm$ 0,005	450 $\pm$ 70	40	7	pH 2.5-3, I = 0-0.25 M; pH 4.5-12, I = 0-0.05 M	pH 4.5-10, I = 0-0.4M	pH 4.5-7.5, I = 0-0.1 M
Dest2	2450 $\pm$ 250	0,035 $\pm$ 0,003	260 $\pm$ 60	50	8			
Dest3	10000 $\pm$ 600	0,136 $\pm$ 0,005	780 $\pm$ 160	20	5			
Dest2-Exp1	33000 $\pm$ 800	Не определялась	1050 $\pm$ 50	10	0,3			

3.20 Фибринолитическая активность дестабилазы.

Фибринолитическая активность Dest2, полученных в разных системах экспрессии, определялась по диаметру области разжижения фибриновой пластины (Kim et al., 1998). Результаты представлены на рисунке 42.

Фибринолитическая активность продуцируемых в растворимой форме Dest2 примерно одинакова между собой и в 2 раза больше активности ренатурированной Dest2.

Мы исследовали инактивированную нагревом дестабилазу и триптические фрагменты, чтобы исключить неферментативную природу фибринолитической активности. Мы показали, что только целая (необработанная трипсином) дестабилаза обладает этой активностью. Все изоформы лизировали фибриновый гель и диаметр этих зон составлял 6 $\pm$ 1мм.

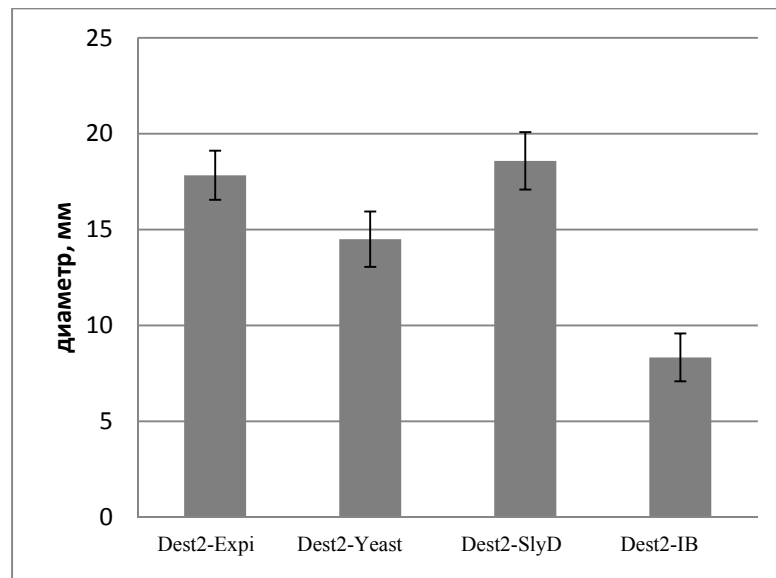


Рисунок 42. Диаметр зон лизиса (в миллиметрах) в фибриновой пластине под воздействием рекомбинантной Dest2, полученной из различных источников: линии клеток человека Expi293F (Dest2-Expi), дрожжей (Dest2-Yeast), из слитого белка SlyD-Dest2 в *E.coli* (Dest2-SlyD) и рефолдированной из телец включения *E.coli* (Dest2-IB).

Как было сказано ранее, действие Dest направлено на разрушение изопептидных связей, которыми прошиты γ - γ цепи стабилизированного фибрина (рисунок 1). Известно, что стабилизированный фибрин устойчив к 2% уксусной кислоте, в то время как нестабилизированный фибрин в таких условиях растворяется (Стуров, 2008). Мы провели электрофоретический анализ лизированных зон (рисунок 11 полоса 2) фибриновых пластин. Твёрдую область геля (необработанная Dest3) растворяли в 2% уксусной кислоте. Стабилизация фибринового геля составила 70% (30% белка растворилось в кислоте, концентрацию белка определяли методом Бредфорд). Растворённую фракцию (полоса 2) и осадок, растворённый в 5% SDS (полоса 3) исследовали электрофоретически. γ - γ цепи стабилизированного фибрина обнаруживались только в нерастворимой (твёрдой) зоне фибринового геля.

Затем выделенный стабилизированный фибрин инкубировали с Dest3 на протяжении 96 часов при 37°C. γ - γ цепи стабилизированного фибрина обнаруживались и в образце после инкубации с буфером (полоса 4). Таким образом, мы показали, что Dest разрушает γ - γ цепи стабилизированного фибрина, превращая его в нестабилизированный.

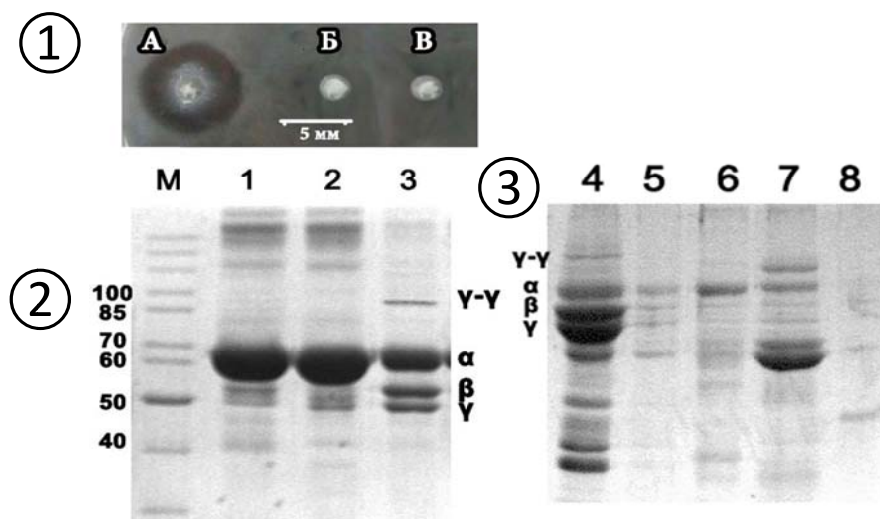


Рисунок 43. Фибринолитическая активность Dest3. ① Лизированные зоны фибринового геля под действием дестабилазы: А – нативная дестабилаза, Б – триптические фрагменты дестабилазы, В – дестабилаза, инактивированная нагревом. Инкубация происходила в течение 48 ч при 37°C ② электрофореграмма фибринового геля, лизированного дестабилазой: 1 – образец лизированного геля, 2 – растворимая фракция необработанного дестабилазой геля после воздействия 2% уксусной кислотой, 3 – нерастворимая фракция стабилизированного фибрина. ③ электрофореграмма стабилизированного фибрина после инкубации с дестабилазой в течение 96 часов при 37°C: 4 – нерастворимая фракция стабилизированного фибрина после инкубации с контрольным буфером, 5 – нерастворимая фракция стабилизированного фибрина после инкубации с дестабилазой, 6 – растворимая фракция стабилизированного фибрина после инкубации с контрольным буфером, 7 – растворимая фракция стабилизированного фибрина после инкубации с дестабилазой. М – маркер молекулярных масс (кДа). Электрофорез проходил в 12% акриламидном

геле. Гель окрашен Кумасси 250G. α , β , γ – α , β , γ -цепи человеческого фибриногена (63.5 kDa, 56 kDa, 47 kDa соответственно).

3.21 Определение общей антибактериальной активности рекомбинантной дестабилазы по отношению к *E.coli*.

Для определения уровня жизнеспособности клеток после обработки дестабилазой был выбран метод подсчёта колоний, выросших на твёрдой питательной среде, как описано в пункте 2.29. Результаты представлены на рисунке 44.

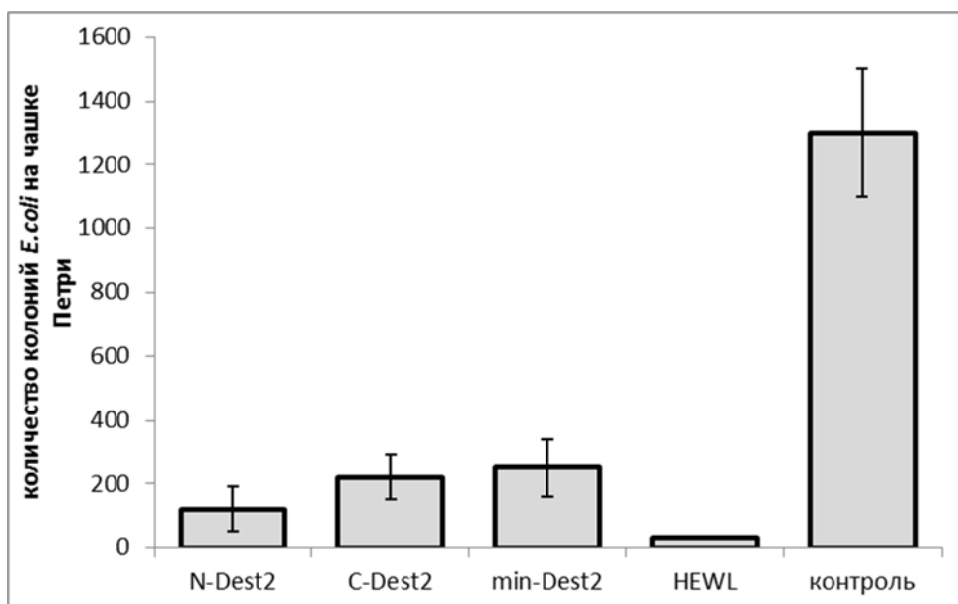


Рисунок 44. Количество колоний, полученных после посева на чашки Петри клеток *E.coli*, обработанных N-Dest2, C-Dest2, min-Dest2 и HEWL и необработанных ферментом. К клеточной суспензии ($OD_{600}=1-1,5$) добавляли исследуемый фермент или его пептиды до концентрации 30 мкг/мл. Инкубировали 60 мин при 37°C. Высевали серийные разведения полученной суспензии на твёрдую питательную среду на чашки Петри. Чашки инкубировали 18 часов при 37°C. Все дестабилазы рефолдированы методом диализа.

Все проверенные формы дестабилазы обладают ярко выраженной антибактериальной активностью, в том числе C-Dest2, которая не обнаруживала мурамидазной активности: количество колоний на чашке, по сравнению с контролем, уменьшилось в семь раз.

Определялись кривые роста *E. coli* (штамм Top10) и *B. subtilis*, инкубированных с ферментами при разной концентрации и без них. На рисунке 45 показаны кривые роста этих бактерий при обработке Dest3. Показано ингибирование роста бактерий в присутствии дестабилазы, ренатурированной диализом, и её триптических пептидов, причём триптические пептиды сильнее ингибируют рост бактерий по сравнению с целым ферментом.

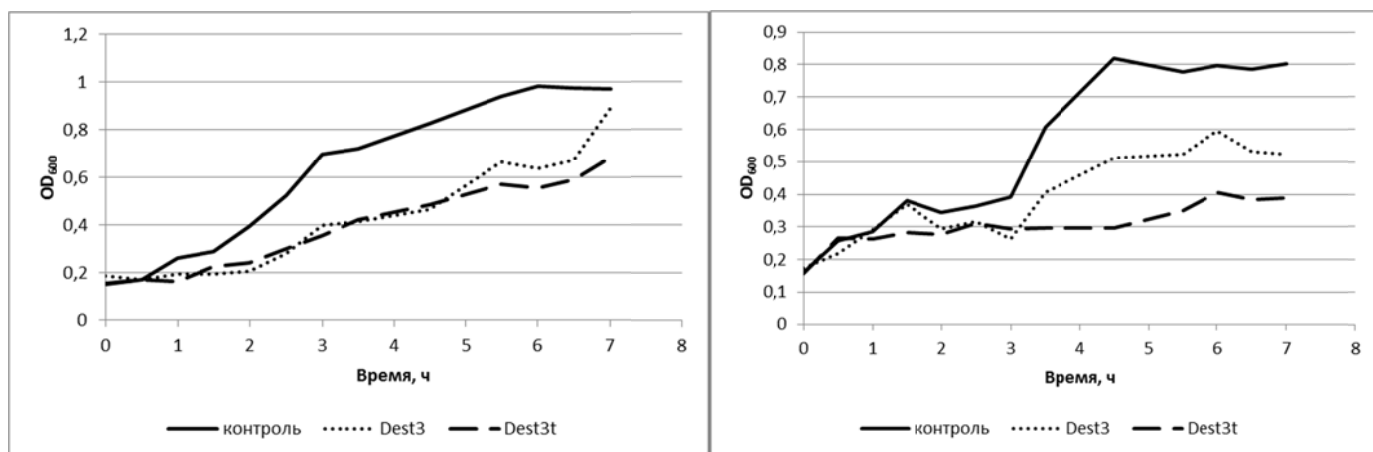


Рисунок 45. Ингибирование роста *E.coli* под действием Dest3 и её триптических пептидов (Dest3t). Кривые роста бактерий *E. coli* штамм Top10 (слева) и *B. subtilis* (справа). cont – клетки, инкубированные без Dest3; Dest3 и Dest3t – клетки инкубированные в присутствии Dest3 и её триптических пептидов соответственно, в концентрации 5 мкг/мл.

3.22 Определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) дестабилазы и её триптических пептидов.

МИК определяли как у целого белка (необработанная трипсином дестабилаза) так и у триптических пептидов (таблица 8).

МИК для *B.subtilis* меньше, чем для *E.coli*, причём МИК триптических пептидов меньше, чем у целого фермента.

Таблица 8.

МИК рекомбинантных изоформ дестабилаз и их триптических пептидов (Dest-t) по отношению к *E.coli* и *B.subtilis*.

	Dest1	Dest2	Dest3	Dest1t	Dest2t	Dest3t
МИК (мкг/мл), <i>E.coli</i>	2,5	2,5	2,5	1,3	1,3	1,3
МИК (мкг/мл), <i>B. subtilis</i>	1,3	1,3	1,3	0,6	0,6	0,6

В ходе работы мы сравнивали МИК Dest2, полученной из разных источников. Результаты приведены в таблице 9.

Таблица 9.

МИК Dest2 для *E.coli* и *B.subtilis*. Приведены данные для рекомбинантной Dest2, полученной из различных источников: линии клеток человека Expi293F, дрожжей, из слитого белка SlyD-Dest2 в *E.coli* и рефолдированной из телец включения *E.coli* (Dest2-IB).

	Dest2-Expi293	Dest2-Yeast	Dest2-SlyD	Dest2-IB
МИК для <i>E.coli</i>	0,6	0,6	0,6	2,5
МИК для <i>B. subtilis</i>	0,3	0,3	0,3	2,5

Продуцируемая в растворимой форме Dest2 проявляет наибольшую антимикробную активность как против *E.coli* так и против *B.subtilis*. Ренатурированная из телец включения дестабилаза проявляет меньшую активность. Антибактериальная активность изоформ дестабилазы не различается между собой.

3.23 Расщепление диизопептида γ -Glu- ϵ -Lys дестабилазой.

Расщепление изопептида γ -Glu- ϵ -Lys под воздействием дестабилазы детектировали методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) (рисунок 46). Dest2, рефолдированная из телец включения, не расщепляет изопептид (рисунок 46А, 2), а Dest2, полученные в растворимом виде, гидролизуют его до Glu и Lys (рисунок 46А, 3-5). В то же время, ни один из образцов дестабилазы не расщепляет димера Gly-Gly, в котором мономеры связаны обычной альфа-пептидной связью (рисунок 46Б, 2-5).

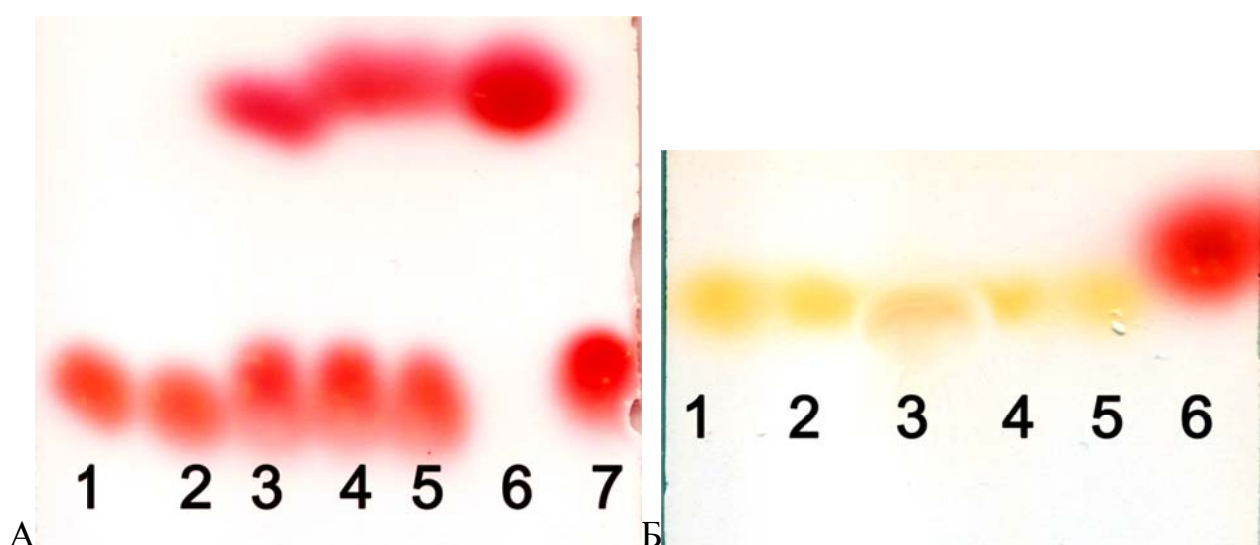


Рисунок 46. Разделение при помощи тонкослойной хроматографии продуктов гидролиза дипептидов γ -Glu- ϵ -Lys (А) и Gly-Gly (Б) под действием дестабилазы.

А: 1 – изопептид γ -Glu- ϵ -Lys, 2-5 – изопептид γ -Glu- ϵ -Lys после инкубации с рекомбинантной дестабилазой, полученной из различных источников: телец включения *E.coli* (2), *P.pastoris* (3), слитого белка SlyD-Dest2 в *E.coli*(4), линии клеток человека Expi293F (5), 6 – Glu, 7 – Lys.

Б: 1 – пептид Gly-Gly, 2-5 – пептид Gly-Gly после инкубации с рекомбинантной дестабилазой, полученной из различных источников: телец включения *E.coli* (2), *P.pastoris* (3), слитого белка SlyD-Dest2 в *E.coli* (4), линии клеток человека Expi293F (5), 6 – Gly.

3.24 Спектр кругового дихроизма (КД) дестабилазы.

Образцы Dest2, полученные из телец включения *E. coli*, *P. pastoris*, слитого белка SlyD-Dest2 в *E. coli* и линии клеток человека Expi293F, имеют одинаковый спектр КД. Спектр раствора Dest2, полученной из телец включения *E. coli*, сильно отличается и характерен для денатурированного белка (рисунок 47).

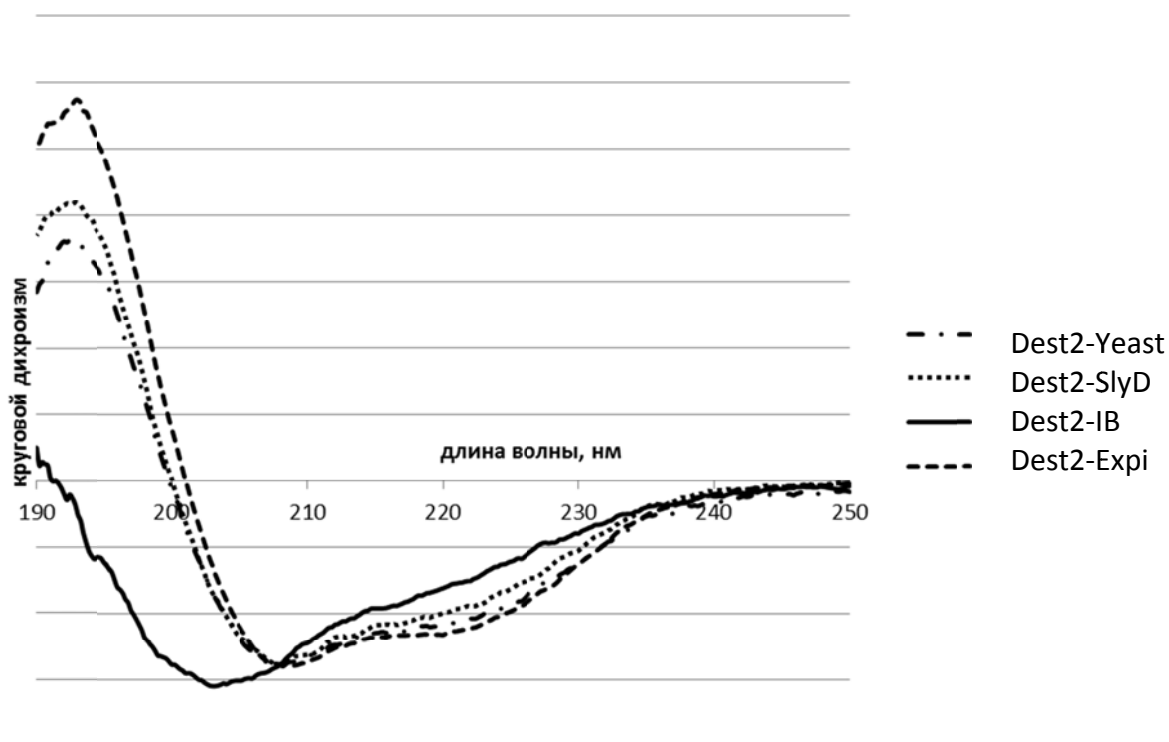


Рисунок 47. Спектры кругового дихроизма растворов рекомбинантной дестабилазы 2, полученной в различных системах экспрессии: линии клеток человека Expi293F (Dest2-Expi), дрожжей (Dest2-Yeast), из слитого белка SlyD-Dest2 в *E. coli* (Dest2-SlyD) и рефолдированной из телец включения *E. coli* (Dest2-IB).

Нами были проанализированы спектры КД Dest3 при разных pH (2.2, 3.2, 6.5) для выявления структурных особенностей фермента (рисунок 48), так как при pH равным 2.2 и 6.5 наблюдается два пика мурамидазной активности. Полученные спектры отличаются друг от друга: при увеличении pH минимум кривой спектра сдвигается в длинноволновую область.

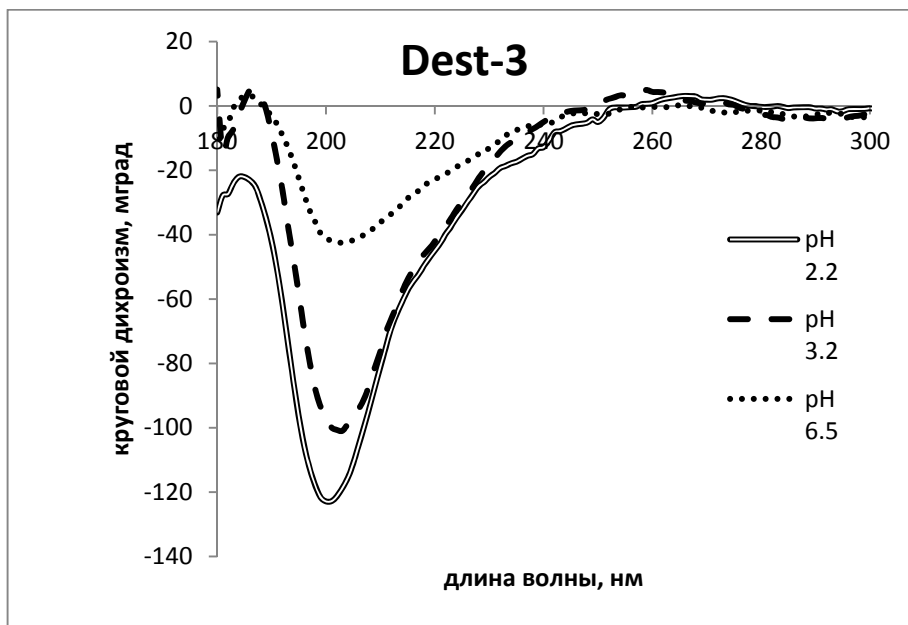


Рисунок 48. Спектр КД Dest3 при различных pH (2.2, 3.2, 6.5)

3.25 Гель-фильтрация изоформ дестабилазы.

Мы показали, что выделенная из телец включения дестабилаза образует олигомеры, что было подтверждено MALDI-TOF анализом. Для изучения олигомеризации дестабилазы в растворе мы провели гель-фильтрацию образцов изоформ ренатурированной дестабилазы (рисунок 49).

Таким образом, в растворе большая часть дестабилазы находится в мономерной форме, так как белок с хроматографической колонки выходит одним пиком.

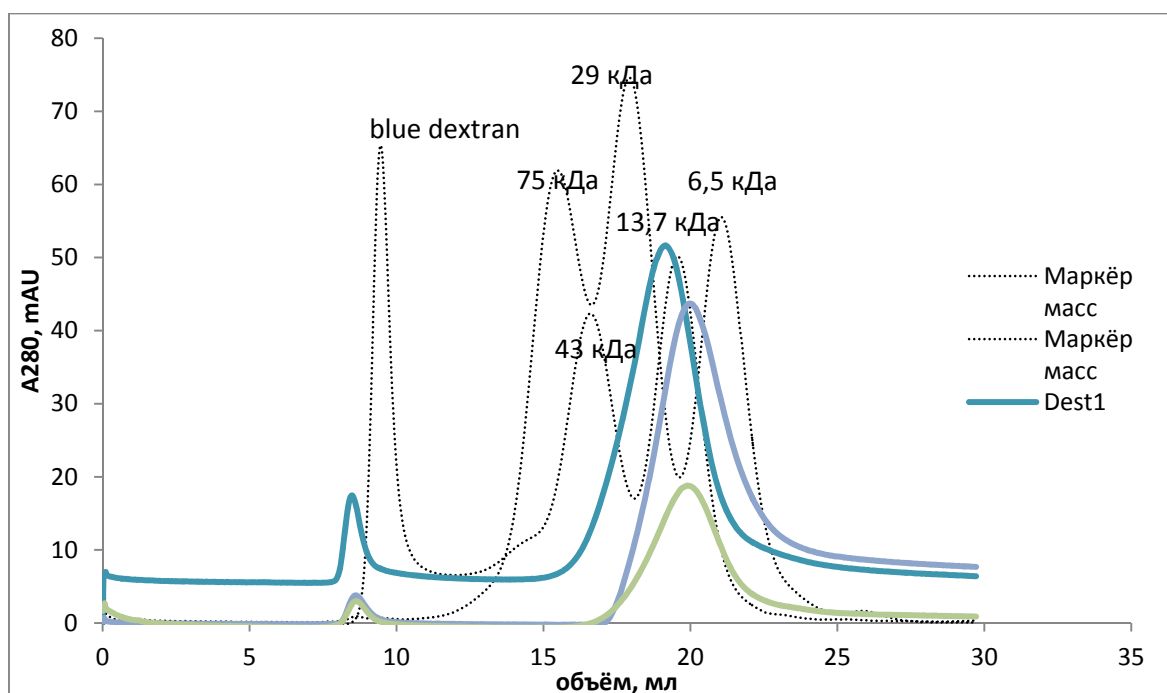


Рисунок 49. Профиль гель-фильтрации изоформ дестабилаз. Superdex 200, набор маркеров Gel Filtration Calibration Kit (GE Healthcare, США).

Таким образом, нами был разработан эффективный способ получения рекомбинантной дестабилазы-2 в клетках бактерий *E. coli*. В результате работы мы добились увеличения более чем в пять раз (по сравнению с ранее имеющимся методом) уровня выделения очищенной ренатурированной дестабилазы-2, что составило не менее 30 мг/л исходной бактериальной культуры. В системе *E. coli* нам удалось получить дестабилазу-2 в растворимой форме: в виде слитого белка с шапероном SlyD. В клетках *E. coli* были получены и другие известные изоформы дестабилазы. Эти ферменты полностью охарактеризованы и активности всех трёх изоформ сравнены между собой. Получена рекомбинантная дестабилаза-2 в эукариотических системах экспрессии: в дрожжах *P. pastoris* и культуре клеток человека Expi293.

Мы исследовали лизоцимную (мурамидазную и литическую), изопептидазную, фибринолитическую и антимикробную активности полученных дестабилаз. Показана антимикробная активность триптических пептидов дестабилазы по отношению к бактериям *B. subtilis* и *E. coli*.

4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Дестабилаза медицинской пиявки впервые выделена из секрета слюнных желёз и была описана как изопептидаза в 1985г. Басковой и Никоновым (Баскова и др., 1985). Ими было показано, что данный фермент разрушает изопептидные связи в Д-димере (продукт конечной протеолитической деградации стабилизированного фибрина), что приводит к медленному разрушению тромбов (Baskova and Nikonov 1991, Завалова и др., 1991).

Получение активной рекомбинантной дестабилазы представляет интерес по двум причинам. Во-первых, это первый открытый полифункциональный лизоцим беспозвоночных, обладающий изопептидазной активностью (Zavalova et al., 2000). Молекулярные механизмы расщепления дестабилазой изопептидной связи в настоящий момент не раскрыты. Для полноценного изучения ферментативных свойств дестабилазы требуется методика получения данного белка путем гетерологичной экспрессии с возможностью проведения направленного мутагенеза. Во-вторых, свойства дестабилазы и секрета слюнных желез медицинской пиявки дают основание для будущего применения дестабилазы в качестве тромболитического агента, который будет иметь ряд преимуществ по сравнению с уже имеющимися препаратами.

В настоящее время, в литературе описано два способа получения дестабилазы – из секрета слюнных желез (Баскова и др., 1985) и путем ренатурации рекомбинантного полипептида, накапливающегося в тельцах включения в клетках *E.coli* (Завалова и др., 2010). Оба способа имеют существенные недостатки. Получение дестабилазы из природного материала ведет к выделению её в комплексе с другими веществами - простагландинами, гирудином и ингибиторами калликреина (Nikonov and Titova, 1999). При ренатурации белка из телец включения всегда остаются сомнения относительно корректности его фолдинга. Известно, что при

ионообменной хроматографии на СМ-сефарозе происходит разделение ренатурированной дестабилазы на фракции, причем одна из минорных фракций имеет активность гораздо больше, чем мажорная (Фадеева и др., 2014).

Ранее, рекомбинантную Dest2 в культуре клеток *E.coli* удалось получить только в нерастворимой форме и с низким выходом, который составлял не более 5 мг/л бактериальной культуры (Завалова и др., 2010). Кроме того, дестабилазу получали только в форме, несущей 6His последовательность, которая может мешать правильной ренатурации белка или влиять на конечные свойства фермента. Исходя из этого, сначала мы получили 3 варианта белка: с N-концевой 6His последовательностью (N-Dest2), C-концевой 6His последовательностью (C-Dest2), и без таковой (min-Dest2).

В своей работе мы использовали коммерческие плазмиды разных серий, каждая из которых имеет свои преимущества. Система экспрессии на основе плазмид серии pET (Novagen, США) широко используется для получения рекомбинантных белков в *E.coli*. Использование промотора поздних генов бактериофага T7 для контроля экспрессии рекомбинантного гена часто позволяет получить высокий выход целевого продукта. В то же время, из-за репрессии транскрипции в отсутствии индуктора (лактозы и IPTG), данная система пригодна для получения белков, токсичных для *E.coli*. Такие же преимущества имеются и у промотора арабинозного оперона *E.coli*, используемого в плазмидах серии pBAD (LifeTechnologies, США). Кроме того, более плавная регуляция экспрессии при добавлении индуктора позволяет надеяться на получение растворимой формы белка за счет снижения уровня его синтеза и последующей агрегации. Промоторно-операторная область гена уридинфосфорилазы обеспечивает «мягкую» конститутивную транскрипцию дистальных районов ДНК, уровень которой зависит от общего метаболического статуса клетки (Вейко и др., 1994). В ряде случаев это позволяет получать рекомбинантные белки в растворимой

форме. Наличие сигнального пептида Sec-транслоказы в ряде случаев обеспечивает транспорт рекомбинантных полипептидов в периплазматическое пространство *E.coli*, что создает лучшие условия для формирования корректной пространственной структуры и значительно облегчает очистку белка. С целью повышения растворимости рекомбинантных белков достаточно часто используется их синтез в виде слитых белков, например, с тиоредоксином или мальтозосвязывающим белком *E.coli*. Мы использовали плазмиду pET-32a(+) (Novagen, США) для получения слитого полипептида тиоредоксин-Dest2.

В ходе выполнения работы мы подобрали оптимальные условия получения Dest2. После подбора штамма, среды и схемы культивации нам удалось повысить уровень выхода белка до шести раз (до 30 мг белка на литр бактериальной культуры).

Затем мы подбирали условия ренатурации Dest2. Несмотря на небольшую молекулярную массу (14кДа), дестабилаза в своей третичной структуре предположительно образует семь дисульфидных связей (Завалова и др., 2012). Ранее задача ренатурации дестабилазы решалась методом быстрого разведения (Завалова и др., 2010). Используя данный метод, авторам удалось провести эксперименты по исследованию ферментативной активности, но для получения белка в достаточно больших количествах (например, для проведения экспериментов на животных), данный метод трудно применим из-за больших потерь и низкой концентрации конечного образца. В своей работе мы применили метод диализа. В ходе подбора условий ренатурации нам удалось достичь 70%-ого выхода растворимого белка.

Далее, подобрав оптимальные условия получения активной Dest2 в клетках *E. coli*, мы таким же образом получили и другие изоформы дестабилазы (Dest1 и Dest3).

Нами было показано, что рекомбинантная дестабилаза образует олигомерные структуры (рисунок 31). Нам удалось идентифицировать

наличие дестабилазы в полосах, соответствующих димеру и тримеру белка, с помощью метода MALDI-TOF анализа. Эти олигомерные структуры крайне устойчивы – они не разрушаются под действием различных денатурирующих агентов (SDS, 8М мочевины) и в присутствии 2-меркаптоэтанола.

Согласно гель-фильтрационному хроматографическому разделению дестабилазы (рисунок 49), данный белок формирует только один пик, соответствующий мономерной форме. Мы считаем, что рекомбинантная дестабилаза состоит преимущественно из мономерной формы, и олигомеры составляют лишь малую часть от всего белка. Однако известно, что некоторые лизоцимы беспозвоночных обладают олигомерными свойствами, но эти комплексы разрушаются в растворе с высокой ионной силой, чего не наблюдается у дестабилазы (Callewaert and Michiels, 2010).

Для получения продуцируемых в растворимой форме рекомбинантной Dest2 мы использовали эукариотические системы экспрессии (дрожжи и клетки человека). Нам удалось получить растворимую форму дестабилазы слитую с белком теплового шока SlyD в клетках *E. coli*.

Для всех полученных белков мы определяли и сравнивали ферментативные и антибактериальные активности.

Мурамидазную активность определяли классическим методом по уровню просветления суспензии клеточных стенок бактерий *M. luteus* (Zavalova et al., 2000).

Для изоформ дестабилазы мурамидазная активность исследовалась в зависимости от pH и ионной силы буфера. Наибольшая активность наблюдалась в диапазоне pH 5-12. Мы обнаружили, что имеется два пика активности – pH 2,2 и 6,5 (рисунок 38). Причём при каждом из этих pH зависимость активности от ионной силы буфера разная. Так при pH 2,2 дестабилаза проявляет максимальную активность при 150 мМ NaCl, а на pH 6,5 – без NaCl. Большинство известных лизоцимов проявляют свою активность в диапазоне pH 6-8, и не активны при экстремально низких pH. Мы проанализировали спектр КД при различных pH: 2,2 и 6,5 –

максимальная активность, 3,2 - минимальная активность (между двумя пиками). У всех образцов похожие спектры КД (рисунок 48), однако они смещаются в область длинных волн при увеличении рН. Мы полагаем, что конформация структуры белка при различных рН не вносит значительный вклад в изменение активности.

Повышение ионной силы буфера при рН 6,5 приводит к сильному ингибированию мурамидазной активности, что полностью соответствует результатам, полученным для нативной дестабилазы.

Среди Dest2, полученных в разных системах экспрессии, наибольшей активностью обладают продуцируемые в растворимой форме дестабилазы (как в эукариотических системах, так и в прокариотических). Активность ренатурированной дестабилазы ниже в десять раз (рисунок 39). Мы проанализировали спектры КД полученных дестабилаз. Спектры всех растворимых форм имеют одинаковый профиль, в то время как спектр рефолдированной дестабилазы значительно отличается и имеет вид, более характерный для денатурированных белков (рисунок 47). Это может быть связано с тем, что не весь растворимый белок является активным и правильно свёрнутым. Таким образом, спектр кругового дихроизма полученных дестабилаз подтверждает наше предположение о проблемах с образованием корректной пространственной структуры исследуемым белком при ренатурации. По некоторым данным, этот небольшой белок массой 14кДа имеет в своем составе семь дисульфидных связей, что негативно сказывается на процессе ренатурации. Несмотря на низкую ферментативную активность, рефолдированная дестабилаза оказывается достаточно стабильной и не отличается по этому параметру от других форм. Она не образует осадка в растворе с концентрацией до 10 мг/мл, выдерживает замораживание и лиофилизацию без изменения активности и потери белка.

Не ясной остается причина полуторакратного превышения мурамидазной активности дестабилазы, полученной из слитого белка SlyD-Dest2, над таковой у дестабилазы из дрожжей и клеток Expi293F. Мы

предполагаем, что причина такого различия заключается в наличии у последних двух форм С-концевого 6His участка. Схожая ситуация оказалась и для дестабилаз, полученных в системе *E. coli*: min-Dest2 проявляет наибольшую активность, С-Dest2 не проявила никакой активности совсем, поэтому дальнейших работ с ней не проводили. min-Dest2 проходила дополнительную стадию хроматографической очистки на СМ-сефарозе (рисунок 34). Согласно ранее полученным данным, при таком виде хроматографии чётко разделяется активная дестабилаза от неактивной, правильно фолдированная от неправильно (Фадеева и др., 2014). Таким образом, дополнительная стадия очистки позволяет чётко отделить высокоактивную часть белка.

Литическую активность определяли по уровню выделившегося белка из клеток после обработки дестабилазой. Для исследования были взяты грам(+) *B. subtilis* и грам(-) *E. coli*. Зависимость литической активности от pH и ионной силы буфера у изоформ дестабилазы аналогична зависимости для мурамидазной активности, за исключение того, что при pH меньше четырёх литическая активность не проявляется (рисунок 35). Фермент активен в широком диапазоне pH (5-10).

Известно, что присутствие хелатирующего агента, такого как ЭДТА, способствует изменению структуры клеточной стенки грам(-) бактерий (Blobel and Dobberstein, 1975). Поэтому мы проанализировали литическую активность дестабилазы в присутствии ЭДТА. Наличие ЭДТА сдвигает диапазон действия фермента в сторону щелочных значений pH (рисунок 35) и возникает пик литической активности при 0,3M NaCl.

Результаты по определению литической активности не отличаются от результатов мурамидазной активности. По всей видимости, это объясняется тем, что в одном случае измеряется специфическая мурамидазная активность, а в другом – результат комплексного воздействия на бактериальную клетку фермента. К тому же состав клеточной стенки

используемых бактерий сильно различается, в том числе и процентным содержанием пептидогликана.

Изопептидазная активность определялась по отношению к хромогенному субстрату L-g-Glu-pNA (Баскова и др., 1990). Данный хромогенный субстрат в основном используется для изучения гамма-глутамилтранспептидаз и является низкоспецифичным для изопептидаз. Поэтому определение оптимальных условий работы фермента требует высоких концентраций (300-500 мкг/мл) и длительного времени инкубации (около 48 часов). Дестабилаза проявляет изопептидазную активность в довольно узком диапазоне pH 5-6,5 и очень чувствительна к ионной силе буфера (выше 0,3М NaCl данная активность уже не проявляется) (рисунок 40). Для изопептидазной активности мы измеряли K_m и k_{kat} (таблица 7). Для всех изоформ дестабилазы $K_m = 20-50 \mu M$ и $k_{kat} = 5-8 \times 10^{-2} c^{-1}$. Насколько высокое значение K_m и низкое для k_{kat} может быть объяснено низкой специфичностью для субстрата. Хотя эти значения сравнимы со значениями, полученными для нативной дестабилазы ($K_m = 50 \mu M$, $k_{kat} = 0.1 \times 10^{-2} c^{-1}$) и TJL ($K_m = 20 \mu M$, $k_{kat} = 0.2 \times 10^{-4} c^{-1}$) (Soria et al., 1975). Однако значения констант, полученные для дестабилазы-2 из клеток человека ($K_m = 10 \mu M$, $k_{kat} = 0.3 \times 10^{-2} c^{-1}$), практически совпадают со значениями для нативной дестабилазы, что может говорить об идентичности свойств рекомбинантного фермента и природного.

Наличие изопептидазной активности определяли по расщеплению изопептида γ -Glu- ϵ -Lys методом ТСХ. Рефолдированная дестабилаза не расщепляет изопептид γ -Glu- ϵ -Lys, в отличие от других форм фермента (рисунок 46). Хотя данный субстрат является специфичным для изопептидаз, однако с помощью него невозможно определить количественно активность фермента, так как с помощью ТСХ можно определить только факт расщепления изопептида.

Фибринолитическую активность определяли по уровню лизиса фибринового геля. Мы показали, что все ферменты в той или иной степени

обладают общей фибринолитической активностью. Мы исследовали действие дестабилазы на полностью стабилизированный фибрин. Стабилизированный фибрин мы отделяли с помощью 2% уксусной кислоты, инкубировали вместе с дестабилазой и анализировали электрофоретически различные фракции стабилизированного фибрина. После инкубации стабилизированного фибрина с дестабилазой на электрофореграмме отсутствует полоса, соответствующая гамма-гамма цепи фибрина (рисунок 43).

Антимикробную активность дестабилазы мы исследовали на грам(+) *B.subtilis* и грам(-) *E.coli*.

В ранних работах было показано антимикробное действие дестабилазы с инактивированной мурамидазной активностью (Zavalova et al., 2006; Баскова и др., 2008; Завалова и др., 2010). Эту активность инактивировали продолжительным нагревом при 90⁰С. Показано антимикробное действие некоторых синтезированных амфипатических фрагментов дестабилазы (Завалова и др., 2010). Для исследования антимикробной активности рекомбинантных изоформ дестабилазы мы использовали фрагменты данного фермента, полученные путём трипсинолиза. Антибактериальные свойства мы определяли на *B.subtilis* и *E.coli* тремя разными методами. Нами показано уменьшение титра клеток до пяти раз после инкубации с триптическими пептидами и целыми ферментами. Мы показали ингибирование роста бактерий в присутствии дестабилазы и её фрагментов, причём ингибирование триптическими фрагментами происходит сильнее, чем целым белком (рисунок 44). Данный факт подтверждается более низкой МИК для триптических фрагментов, чем для целой дестабилазы (таблица 8 и 9). Эта антимикробная активность, не зависящая от мурамидазной, была показана и у других лизоцимов беспозвоночных, но механизм её действия остаётся не ясен (Callewaert and Michiels, 2010).

Полученный результат подтверждает ранее известный факт, что антибактериальная активность дестабилазы не ограничивается её действием,

как лизоцима и проявляется даже у белка, который не обладает ферментативной активностью. Например, в работе Заваловой и соавторов (Завалова и др., 2010) описаны эксперименты по изучению антимикробного действия дестабилазы на клетки археи *M. barkeri*, клеточные стенки которой состоят преимущественно из белков и из гетерополисахаридов, но не содержат ни муреина, ни псевдомуреина, гидролизующихся мурамидазами. Дестабилаза вызывает практически полный лизис клеток *M. barkeri*. При этом наблюдается образование характерного осадка – флоков, что свидетельствует о нарушении нормального физиологического состояния культуры.

В ходе работы, нами были получены все известные на сегодняшний день изоформы дестабилазы медицинской пиявки. Показана ферментативная активность всех полученных белков: все они обладают сравнимой активностью с одинаковыми условиями действия фермента (рН, ионная сила буфера). Dest2, которая накапливается в растворимой форме (из дрожжей, культуры клеток человека и полученная в виде слитого белка с шапероном SlyD в *E.coli*), имеет ферментативные активности одного порядка и одинаковую МИК. Биологическая активность ренатурированной дестабилазы оказалась значительно ниже по всем измеренным параметрам. Уровень продукции дестабилазы дрожжами на порядок меньше (1,5 мг/л против 30 мг/л). Разработанный нами процесс получения растворимой дестабилазы в *E.coli* оказался крайне малоэффективным, давая конечный выход менее 1% от начального количества слитого белка.

Показана выраженная антимикробная активность самих ферментов и их триптических пептидов, причём МИК для пептидов сравнима с МИК целого белка.

В перспективе полученные данные могут способствовать исследованию взаимосвязи между мурамидазной и изопептидазной активностями дестабилазы и пониманию механизма антибактериальной активности мультифункционального фермента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дестабилаза медицинской пиявки – полифункциональный лизоцим беспозвоночных, обладающий мурамидазной, изопептидазной и антимикробной активностью. Показано, что дестабилаза разрушает изопептидные связи в стабилизированном фибрине, что приводит к разрушению тромбов. Таким образом, дестабилаза может быть использована в качестве тромболитического агента с принципиально новым механизмом действия. К тому же до сих пор остаются не ясными механизмы расщепления дестабилазой изопептидных связей и её неферментативной антибактериальной активности.

Ранее велись работы по получению рекомбинантной дестабилазы в разных системах экспрессии. Наиболее успешными оказались эксперименты по получении Dest2 в клетках *E. coli*, однако выход целевого продукта был недостаточным для проведения полноценных доклинических исследований. В ходе данной работы, путём подбора плазмиды, штамма-продуцента, условий культивирования, метода выделения и ренатурации, нам удалось увеличить выход до 30 мг/л.

Мы впервые получили все три известные изоформы дестабилазы и охарактеризовали их свойства: все они обладают сравнимой активностью и условиями работы, причём оптимальные условия работы ферментов совпадают (мурамидазная активность проявляется при pH 2.5-3, $I = 0-0.25$ М и pH 4.5-12, $I = 0-0.05$ М, изопептидазная активность при pH 4.5-7.5 и $I = 0-0.1$ М).

Мурамидазная активность дестабилазы проявляется в широких диапазонах pH (от 2 до 11), нехарактерных для других лизоцимов. К тому же наблюдается пик активности при экстремально кислом pH 2,2. Изопептидазная активность дестабилазы проявляется в более узком диапазоне pH: от 5,5 до 7 и резко падает при увеличении концентрации соли (выше 0,2 М активность не проявляется). Для изопептидазной активности мы

измерили K_m и k_{kat} . Для всех изоформ дестабилазы $K_m = 20-50 \mu M$ и $k_{kat} = 5-8 \times 10^{-2} c^{-1}$. Показана выраженная антимикробная активность самих ферментов и их триптических пептидов, причём МИК для пептидов ниже, чем для целого белка: МИК дестабилазы для *E.coli* составил 2,5 мкг/мл, для *B. subtilis* – 1,3 мкг/мл, МИК триптических пептидов дестабилазы составил 1,3 мкг/мл и 0,6 мкг/мл соответственно.

Мы получили рекомбинантную Dest2 в различных системах экспрессии: бактерии *E. coli*, дрожжи *P. pastoris* (выход 1,5 мг/л) и клеток почки эмбриона человека линии Expi293F (до 50мг/л). В случае *E. coli* мы получили дестабилазу как в тельцах включения (выход около 30 мг/л), так и растворимую, слитую с шапероном SlyD (конечный выход выделенной и очищенной дестабилазы 0,5 мг/л). Рекомбинантная дестабилаза, секретируемая дрожжами *P. pastoris* и культурой клеток человека Expi293F, а также полученная в *E.coli* в виде слитого белка с шапероном SlyD, обладает на порядок большей мурамидазной активностью, примерно в пять раз большей изопептидазной активностью, на порядок меньшей МИК для *B. subtilis* и четыре раза - для *E.coli*, имеет более выраженную фибринолитическую активность и способна расщеплять изопептид γ -Glu- ϵ -Lys. Для Dest2, полученной из клеток человека, определены зависимости изопептидазной и мурамидазной активностей от pH и ионной силы буфера: профили этих зависимостей не отличаются от аналогичных для ренатурированной Dest2. Для изопептидазной активности Dest2, полученной из клеток человека, K_m составила 10 μM , а $k_{kat} = 0,3 \times 10^{-2} c^{-1}$. Таким образом, активности полученных ферментов схожи между собой.

Получение значительных количеств активной рекомбинантной дестабилазы открывает широкие возможности по изучению потенциала данного белка для медицинского применения в качестве нового тромболитического агента.

ВЫВОДЫ

1. Разработан способ получения в клетках *E.coli*, очистки и ренатурации трех рекомбинантных изоформ (Dest1, Dest2 и Dest3) дестабилазы медицинской пиявки, обладающих мурамидазной, изопептидазной, фибринолитической и антибактериальной активностями.
2. Зависимости мурамидазной и изопептидазной активностей от pH и ионной силы буфера одинаковы для всех изоформ дестабилазы, полученных в клетках *E.coli*. Мурамидазная и изопептидазная активность Dest2 в 2 раза ниже, чем активность Dest1 и в 4 раза ниже, чем Dest3. Все изоформы обладают одинаковой фибринолитической и антибактериальной активностями.
3. Разработан способ получения и очистки Dest2 в клетках почки эмбриона человека линии Expi293F (Dest2-Expi), в дрожжах *P.pastoris* (Dest2-Yeast) и из слитого белка SlyD-Dest2 в *E.coli* (Dest2-SlyD), обладающих мурамидазной, изопептидазной, фибринолитической и антибактериальной активностями.
4. Зависимости мурамидазной и изопептидазной активностей от pH и ионной силы буфера одинаковы для всех Dest2, однако мурамидазная активность Dest2-Expi и Dest2-Yeast в семь раз, Dest2-SlyD в десять раз выше, а изопептидазная и фибринолитическая – в пять раз выше, чем у ренатурированной Dest2.
5. По результатам определения удельной активности рекомбинантного белка, уровня его накопления и простоты последующей очистки наиболее оптимальным является получение рекомбинантной дестабилазы медицинской пиявки с использованием клеток почки эмбриона человека линии Expi293F.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДФ – аденозиндифосфат

ССЖМП – секрет слюнных желёз медицинской пиявки

ФАТ – 1-О-алкил-2-ацетил-sn-3-глицерофосфорилохолин

АТФ – аденозинтрифосфат

БСА – бычий сывороточный альбумин

SDS-PAGE – электрофорез в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях

ТСХ – тонкослойная хроматография

dNTP – дезоксинуклеотидтрифосфат

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

OD₆₀₀ – оптическая плотность на длине волны 600 нм

КОЕ – колониеобразующие единицы

КД – круговой дихроизм

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

PMSF – фенилметилсульфонилфторид

ТФУ – трифторуксусная кислота

TJL – лизоцим из *Tapes japonica*

IPITG – изопропилтиогалактозид

DTT – дитиотреитол

TEV – протеиназа вируса табачной мозаики

HEWL – лизоцим белка куриного яйца

МИК – минимальная ингибирующая активность

КД – круговой дихроизм

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баскова И.П., Завалова Л.Л. Медицинская пиявка и некоторые механизмы регуляции микроциркуляции // Тромбоз, гемостаз и реология. 2005. Т. 1. № 21. — С. 26-30.
2. Баскова И.П., Завалова Л. Л. Полифункциональность дестабилазы-лизозима из медицинской пиявки // Биоорганическая химия. 2008. Т. 34. № 3. — С. 337-43.
3. Баскова И.П., Завалова Л.Л., Басанова А.В., Мошковский С.А., Згода В.Г. Профилирование белков секрета слюнных желез медицинской пиявки. // Биохимия. 2004. Т. 69. № 7. — С. 770-5.
4. Баскова, И.П.; Завалова, Л.Л.; Басанова, А.В.; Сасс, А.В. Разобщение мономеризующей и лизоцимной активностей дестабилазы секрета слюнных желез медицинской пиявки // Биохимия. 2001. Т. 66. № 12. — С. 1368-73.
5. Баскова И.П., Никонов Г.И. Антитромботическое действие секрета слюнных желез и других препаратов из пиявок *Hirudo medicinalis* при внутривенном и пероральном введении крысам. // Вопросы медицинской химии. 1986. Т. 32. № 6. — С. 90-3.
6. Баскова И.П., Никонов Г.И. Дестабилаза — фермент секрета слюнных желез медицинских пиявок гидролизует изопептидные связи в стабилизированном фибрине. // Биохимия. 1985. Т. 50. № 3. — С. 424-31.
7. Баскова И.П., Никонов Г.И., Завалова Л.Л., Ларионова Н.И. Кинетика гидролиза L-g-Glu-pNA дестабилазой, ферментом из пиявки *Hirudo medicinalis*. // Биохимия. 1990. Т. 55. № 4. — С. 674-9.
8. Баскова И.П., Тимохина Е.А., Никонов Г.И., Степанов В.М. Гидролиз изопептида ϵ -(γ -глутамил)-лизина дестабилазой из медицинской пиявки *Hirudo medicinalis*. // Биохимия. 1990. Т. 55. № 5. — С. 771-5.
9. Баскова И.П., Фернер З., Балкина А.С., Козин С., Харитонов О.В., Завалова Л.Л., Згода В.Г. Стероиды, гистамин и серотонин в составе секрета

слюнных желез медицинской пиявки // Биомедицинская химия. 2008. Т. 54. № 2. — С. 127-39.

10. Баскова И.П., Халиль С., Никонов Г.И. Влияние секрета слюнных желез медицинских пиявок *Hirudo medicinalis* на внешний и внутренний механизмы свертывания крови. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1984. Т. 98. № 8. — С. 142-3.

11. Баскова И.П., Юсупова Г.И., Никонов Г.И. Липазная и холестерин-эстеразная активности секрета слюнных желез медицинских пиявок *Hirudo medicinalis*. // Биохимия. 1984. Т. 49. № 4. — С. 676-8.

12. Вейко В.П., Сипрашвили З.З., Ратманова К.И., Гулько Л.Б., Андрюхина Р.В., Дебабов В.Г. Клонирование и экспрессия в *Escherichia coli* тимидинфосфорилазы под контролем промотора уридинфосфорилазы // Биотехнология. — 1994. — № 4. — С. 2–4.

13. Завалова Л. Л., Антипова Н. В., Фадеева Ю. И., Павлюков М. С., Плетнева Н. В., Плетнев В. З., Баскова И. П. Каталитические центры фермента дестабилазы-лизоцима медицинской пиявки (mlDL). Структурно-функциональная взаимосвязь. // Биоорганическая химия. 2012. Т. 38. № 2. — С. 229-33.

14. Завалова Л.Л., Баскова И.П., Барсова Е.В., Снежков Е.В., Акопов С.Б., Лопатин С.А. Рекомбинантный дестабилаза-лизоцим: синтез de novo в *Escherichia coli* и механизм действия фермента, экспрессированного в *Spodoptera frugiperda* // Биохимия. 2004. Т. 69. № 7. — С. 776-81.

15. Завалова Л.Л., Кузина Е.В., Баскова И.П. Появление неспецифической протеолитической активности у дестабилазы, эндо-е-(у-глутамил)-лизил-изопептидазы в присутствии SDS // Биохимия. 1994. Т. 59. № 6. — С. 905-10.

16. Завалова Л.Л., Лазарев В.Н., Левицкий С.А., Юдина Т.Г., Баскова И.П. Дестабилаза-лизоцим из медицинской пиявки. Полифункциональность рекомбинантного белка // Биохимия. 2010. Т. 75. № 9. — С. 1173-81.

17. Завалова Л.Л., Никонов Г.И., Кузина Е.В., Попова Г.Ю., Баскова И.П. Димер фрагмента D стабилизированного фибрина - субстрат фермента

- дестабилазы (у-глутамил-е-лизин-изопептидазы) // Биохимия. 1991. Т. 56. № 1. — С. 115-24.
18. Крылов В.В., Буров С.А., Дашьян В.Г., Галанкина И.Е. Метод локального фибринолиза в хирургии нетравматических внутричерепных кровоизлияний. // Вестник РАМН. 2013. №7. — С. 24-31.
19. Момот А.П. Исследование системы гемостаза у лиц пожилого возраста: основные цели и методы // Клиническая геронтология. 2007. Т. 4. — С. 44-49.
20. Манувера В.А., Гулько Л.Б., Огорокова Н.А., Вейко В.П., Дебабов В.Г. Исследование роли сигнальных пептидов в транслокации рекомбинантных белков в периплазматическое пространство *Escherichia coli* на модели энтеротоксинов из *Staphylococcus aureus* // Биотехнология. 2008. Т. 6. — С. 3-14.
21. Стуров В.Г., Анмут С.Я., Шорина Г.Н., Плюшкин В.А. Современная клиничко-лабораторная диагностика нарушений конечного этапа свертывания крови. // Бюллетень сибирской медицины. 2008. Приложение 2. — С. 165-173.
22. Фадеева Ю.И., Антипова Н.В., Баскова И.П., Завалова Л.Л. Высокоактивные фракции рекомбинантного дестабилазы-лизоцима медицинской пиявки // Биомедицинская химия. 2014. Т. 60. № 3. — С. 332-7.
23. Шальнова С.А., Карпов Ю.А., Концевая А.В., Деев А.Д., Капустина А.В. и др. Анализ смертности от сердечно-сосудистых заболеваний в 12 регионах Российской Федерации, участвующих в исследовании «Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний в различных регионах России» // Российский кардиологический журнал. 2012. Т. 5. — С. 6-11.
24. Abdualkader A.M., Ghawi A.M., Alaama M., Awang M., Merzouk A. Leech therapeutic applications // Indian J Pharm Sci. 2013. Т. 75. № 2. — С. 127-37.
25. Abe Y., Ueda T. [Structure and function of Tapes japonica lysozyme] // Seikagaku. 2009. Т. 81. № 4. — С. 314-9.

26. Ahmad I., Yeddula K., Wicky S., Kalva S.P. Clinical sequelae of thrombus in an inferior vena cava filter // *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2010. T. 33. № 2. — C. 285-9.
27. Al-Shwafi K.A., de Meester A., Pirenne B., Col J.J. Comparative fibrinolytic activity of front-loaded alteplase and the single-bolus mutants tenecteplase and lanoteplase during treatment of acute myocardial infarction // *Am Heart J*. 2003. T. 145. № 2. — C. 217-25.
28. Andreoli J.M., Thornburg B.G., Hickey R.M. Inferior Vena Cava Filter-Related Thrombus/Deep Vein Thrombosis: Data and Management // *Semin Intervent Radiol*. 2016. T. 33. № 2. — C. 101-4.
29. Ansell J., Hirsh J., Hylek E., Jacobson A., Crowther M., Palareti G., American College of Chest P. Pharmacology and management of the vitamin K antagonists: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition) // *Chest*. 2008. T. 133. № 6 Suppl. — C. 160S-198S.
30. Ascenzi P., Amiconi G., Menegatti E., Guarneri M., Bolognesi M., Schnebli H.P. Binding of the recombinant proteinase inhibitor eglin c from leech *Hirudo medicinalis* to human leukocyte elastase, bovine alpha-chymotrypsin and subtilisin Carlsberg: thermodynamic study // *J Enzyme Inhib*. 1988. T. 2. № 3. — C. 167-72.
31. Baici A., Seemuller U. Kinetics of the inhibition of human leukocyte elastase by eglin from the leech *Hirudo medicinalis* // *Biochem J*. 1984. T. 218. № 3. — C. 829-33.
32. Baskova I., Zavalova L., Berezhnoy S., Avdonin P., Afanasjeva G., Popov E., Gabbasov Z. Inhibition of induced and spontaneous platelet aggregation by destabilase from medicinal leech // *Platelets*. 2000. T. 11. № 2. — C. 83-6.
33. Baskova I.P., Nikonov G.I. Destabilase, the novel epsilon-(gamma-Glu)-Lys isopeptidase with thrombolytic activity // *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1991. T. 2. № 1. — C. 167-72.
34. Bathige S.D., Umasuthan N., Kasthuri S.R., Whang I., Lim B.S., Nam B.H., Lee J. A bifunctional invertebrate-type lysozyme from the disk abalone, *Haliotis*

discus discus: genome organization, transcriptional profiling and biological activities of recombinant protein // *Dev Comp Immunol*. 2013. T. 41. № 2. — C. 282-94.

35. Baxter-Jones C.S., White H.D., Anderson J.L. An overview of the patency and stroke rates following thrombolysis with streptokinase, alteplase, and anistreplase used to treat an acute myocardial infarction // *J Interv Cardiol*. 1993. T. 6. № 1. — C. 15-23.

36. Berry R.E., George J.E., Shaver W.A. Free-floating deep venous thrombosis. A retrospective analysis // *Ann Surg*. 1990. T. 211. № 6. — C. 719-2; discussion 722-3.

37. Bhatt A.D. Hirudin: long live the leech! // *J Assoc Physicians India*. 1994. T. 42. № 3. — C. 195-6.

38. Birckbichler P.J., Carter H.A., Orr G.R., Conway E., Patterson M.K., Jr. epsilon-(gamma-Glutamyl)lysine isopeptide bonds in normal and virus transformed human fibroblasts // *Biochem Biophys Res Commun*. 1978. T. 84. № 1. — C. 232-7.

39. Birckbichler P.J., Dowben R.M., Matacic S., Loewy A.G. Isopeptide bonds in membrane proteins from eukaryotic cells // *Biochim Biophys Acta*. 1973. T. 291. № 1. — C. 149-55.

40. Blobel G., Dobberstein B. Transfer of proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components // *J Cell Biol*. 1975. T. 67. № 3. — C. 852-62.

41. Boon G.D. An overview of hemostasis // *Toxicol Pathol*. 1993. T. 21. № 2. — C. 170-9.

42. Callewaert L., Michiels C.W. Lysozymes in the animal kingdom // *J Biosci*. 2010. T. 35. № 1. — C. 127-60.

43. Castaneda F., Swischuk J.L., Li R., Young K., Smouse B., Brady T. Declining-dose study of reteplase treatment for lower extremity arterial occlusions // *J Vasc Interv Radiol*. 2002. T. 13. № 11. — C. 1093-8.

44. Chudzinski-Tavassi A.M., Kelen E.M., de Paula Rosa A.P., Loyau S., Sampaio C.A., Bon C., Angles-Cano E. Fibrinolytic properties of purified hementerin, a metalloproteinase from the leech *Haementeria depressa* // *Thromb Haemost.* 1998. T. 80. № 1. — C. 155-60.
45. Condra C., Nutt E., Petroski C.J., Simpson E., Friedman P.A., Jacobs J.W. Isolation and structural characterization of a potent inhibitor of coagulation factor Xa from the leech *Haementeria ghilianii* // *Thromb Haemost.* 1989. T. 61. № 3. — C. 437-41.
46. Cong L., Yang X., Wang X., Tada M., Lu M., Liu H., Zhu B. Characterization of an i-type lysozyme gene from the sea cucumber *Stichopus japonicus*, and enzymatic and nonenzymatic antimicrobial activities of its recombinant protein // *J Biosci Bioeng.* 2009. T. 107. № 6. — C. 583-8.
47. Corral-Rodriguez M.A., Macedo-Ribeiro S., Pereira P.J., Fuentes-Prior P. Leech-derived thrombin inhibitors: from structures to mechanisms to clinical applications // *J Med Chem.* 2010. T. 53. № 10. — C. 3847-61.
48. Cosentino C., Labella C., Elshafie H.S., Camele I., Musto M., Paolino R., D'Adamo C., Freschi P. Effects of different heat treatments on lysozyme quantity and antimicrobial activity of jenny milk // *J Dairy Sci.* 2016. T. 99. № 7. — C. 5173-9.
49. Cruz C.P., Eidt J., Drouilhet J., Brown A.T., Wang Y., Barnes C.S., Moursi M.M. Saratin, an inhibitor of von Willebrand factor-dependent platelet adhesion, decreases platelet aggregation and intimal hyperplasia in a rat carotid endarterectomy model // *J Vasc Surg.* 2001. T. 34. № 4. — C. 724-9.
50. Dai W., Wu D., Zhang M., Wen C., Xie Y., Hu B., Jian S., Zeng M., Tao Z. Molecular cloning and functional characterization of a novel i-type lysozyme in the freshwater mussel *Cristaria plicata* // *Microbiol Immunol.* 2015. T. 59. № 12. — C. 744-55.
51. Davie E.W., Kulman J.D. An overview of the structure and function of thrombin // *Semin Thromb Hemost.* 2006. T. 32 Suppl 1. — C. 3-15.

52. Day I.S.C.f.W.T. Thrombosis: a major contributor to global disease burden // *Thromb Res.* 2014. T. 134. № 5. — C. 931-8.
53. Depraetere H., Kerekes A., Deckmyn H. The collagen-binding leech products rLAPP and calin prevent both von Willebrand factor and alpha2beta1(GPIIb/IIIa)-I-domain binding to collagen in a different manner // *Thromb Haemost.* 1999. T. 82. № 3. — C. 1160-3.
54. Diquelou A., Dupouy D., Cariou R., Sakariassen K.S., Boneu B., Cadroy Y. A comparative study of the anticoagulant and anti-thrombotic effects of unfractionated heparin and a low molecular weight heparin (Fraxiparine) in an experimental model of human venous thrombosis // *Thromb Haemost.* 1995. T. 74. № 5. — C. 1286-92.
55. Dong H., Ren J.X., Wang J.J., Ding L.S., Zhao J.J., Liu S.Y., Gao H.M. Chinese Medicinal Leech: Ethnopharmacology, Phytochemistry, and Pharmacological Activities // *Evid Based Complement Alternat Med.* 2016. T. 2016. — C. 7895935.
56. Dunwiddie C., Thornberry N.A., Bull H.G., Sardana M., Friedman P.A., Jacobs J.W., Simpson E. Antistasin, a leech-derived inhibitor of factor Xa. Kinetic analysis of enzyme inhibition and identification of the reactive site // *J Biol Chem.* 1989. T. 264. № 28. — C. 16694-9.
57. Eldor A., Orevi M., Rigbi M. The role of the leech in medical therapeutics // *Blood Rev.* 1996. T. 10. № 4. — C. 201-9.
58. Fath-Ordoubadi F., Beatt K.J. A comparison of thrombolytic therapy with primary coronary angioplasty for acute myocardial infarction // *N Engl J Med.* 1997. T. 336. № 15. — C. 1103-4; author reply 1104.
59. Fink E., Rehm H., Gippner C., Bode W., Eulitz M., Machleidt W., Fritz H. The primary structure of bdellin B-3 from the leech *Hirudo medicinalis*. Bdelein B-3 is a compact proteinase inhibitor of a "non-classical" Kazal type. It is present in the leech in a high molecular mass form // *Biol Chem Hoppe Seyler.* 1986. T. 367. № 12. — C. 1235-42.

60. Fradkov A., Berezhnoy S., Barsova E., Zavalova L., Lukyanov S., Baskova I., Sverdlov E.D. Enzyme from the medicinal leech (*Hirudo medicinalis*) that specifically splits endo-epsilon(-gamma-Glu)-Lys isopeptide bonds: cDNA cloning and protein primary structure // *FEBS Lett.* 1996. T. 390. № 2. — C. 145-8.
61. Furie B., Furie B.C. In vivo thrombus formation // *J Thromb Haemost.* 2007. T. 5 Suppl 1. — C. 12-7.
62. Gaffney P.J., Lane D.A., Kakkar V.V., Brasher M. Characterisation of a soluble D dimer-E complex in crosslinked fibrin digests // *Thromb Res.* 1975. T. 7. № 1. — C. 89-99.
63. Geerts W.H., Pineo G.F., Heit J.A., Bergqvist D., Lassen M.R., Colwell C.W., Ray J.G. Prevention of venous thromboembolism: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy // *Chest.* 2004. T. 126. № 3 Suppl. — C. 338S-400S.
64. Giacometti L. Leeching in the twentieth century // *Am J Cardiol.* 1987. T. 60. № 13. — C. 1128-31.
65. Goldberg R.E., Cohen A.M., Bryan P.J., Olsen M., Martin R.J. Neonatal aortic thrombosis treated with intra-arterial urokinase therapy // *Can Assoc Radiol J.* 1989. T. 40. № 1. — C. 55-6.
66. Greenberg C.S., Birckbichler P.J., Rice R.H. Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues // *FASEB J.* 1991. T. 5. № 15. — C. 3071-7.
67. Hayashi S., Yamada K. [A case of arterial thrombosis successfully treated with a large dosage of urokinase--study on urokinase administration with special reference to alpha2-plasmin inhibitor (author's transl)] // *Rinsho Ketsueki.* 1979. T. 20. № 4. — C. 400-9.
68. Hildebrandt J.P., Lemke S. Small bite, large impact-saliva and salivary molecules in the medicinal leech, *Hirudo medicinalis* // *Naturwissenschaften.* 2011. T. 98. № 12. — C. 995-1008.

69. Hirsh J., Raschke R. Heparin and low-molecular-weight heparin: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy // *Chest*. 2004. T. 126. № 3 Suppl. — C. 188S-203S.
70. Hoffman M., Monroe D.M. Coagulation 2006: a modern view of hemostasis // *Hematol Oncol Clin North Am*. 2007. T. 21. № 1. — C. 1-11.
71. Horne M. Overview of hemostasis and thrombosis; current status of antithrombotic therapies // *Thromb Res*. 2005. T. 117. № 1-2. — C. 15-7; discussion 39-42.
72. Houschyar K.S., Momeni A., Maan Z.N., Pyles M.N., Jew O.S., Strathe M., Michalsen A. Medical leech therapy in plastic reconstructive surgery // *Wien Med Wochenschr*. 2015. T. 165. № 19-20. — C. 419-25.
73. Huicochea-Bartelt J.L., Palacios E., Zapata L., Herran S. Budget Impact Analysis of The Use of Tenecteplase In The Treatment of Acute Myocardial Infarction In Mexico // *Value Health*. 2015. T. 18. № 7. — C. A828.
74. Inniss L. Venous thromboembolism: reducing the risk // *Emerg Nurse*. 2011. T. 19. № 5. — C. 20-3.
75. Jargin S.V. Cardiovascular mortality trends in Russia: possible mechanisms // *Nat Rev Cardiol*. 2015. T. 12. № 12. — C. 740.
76. Jha K., Garg A., Narang R., Das S. Hirudotherapy in Medicine and Dentistry // *J Clin Diagn Res*. 2015. T. 9. № 12. — C. ZE05-7.
77. Joffe H.V., Goldhaber S.Z. Upper-extremity deep vein thrombosis // *Circulation*. 2002. T. 106. № 14. — C. 1874-80.
78. Joskova R., Silerova M., Prochazkova P., Bilej M. Identification and cloning of an invertebrate-type lysozyme from *Eisenia andrei* // *Dev Comp Immunol*. 2009. T. 33. № 8. — C. 932-8.
79. Kagansky N., Knobler H., Rimon E., Ozer Z., Levy S. Safety of anticoagulation therapy in well-informed older patients // *Arch Intern Med*. 2004. T. 164. № 18. — C. 2044-50.
80. Kanaide H., Shainoff J.R. Cross-linking of fibrinogen and fibrin by fibrin-stabilizing factor (factor XIIIa) // *J Lab Clin Med*. 1975. T. 85. № 4. — C. 574-97.

81. Kang H.J., Baker E.N. Intramolecular isopeptide bonds: protein crosslinks built for stress? // Trends Biochem Sci. 2011. T. 36. № 4. — C. 229-37.
82. Kelen E.M., Rosenfeld G. Fibrinogenolytic substance (hementerin) of Brazilian blood-sucking leeches (*Haementeria lutzi* Pinto 1920) // Haemostasis. 1975. T. 4. № 1. — C. 51-64.
83. Keller P.M., Schultz L.D., Condra C., Karczewski J., Connolly T.M. An inhibitor of collagen-stimulated platelet activation from the salivary glands of the *Haementeria officinalis* leech. II. Cloning of the cDNA and expression // J Biol Chem. 1992. T. 267. № 10. — C. 6899-904.
84. Kermode A.G., Ives F.J., Taylor B., Davis S.J., Carroll W.M. Progressive dural venous sinus thrombosis treated with local streptokinase infusion // J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1995. T. 58. № 1. — C. 107-8.
85. Kim S.H., Choi N.S., Lee W.Y. Fibrin zymography: a direct analysis of fibrinolytic enzymes on gels // Anal Biochem. 1998. T. 263. № 1. — C. 115-6.
86. Kluter T., Fitschen-Oestern S., Lippross S., Weuster M., Mentlein R., Steubesand N., Neunaber C., Hildebrand F., Pufe T., Tohidnezhad M., Beyer A., Seekamp A., Varoga D. The antimicrobial peptide lysozyme is induced after multiple trauma // Mediators Inflamm. 2014. T. 2014. — C. 303106.
87. Lemke S., Muller C., Hildebrandt J.P. Be ready at any time: postprandial synthesis of salivary proteins in salivary gland cells of the haematophagous leech *Hirudo verbana* // J Exp Biol. 2016. T. 219. № Pt 8. — C. 1139-45.
88. Li Z., Delaney M.K., O'Brien K.A., Du X. Signaling during platelet adhesion and activation // Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010. T. 30. № 12. — C. 2341-9.
89. Linker A., Meyer K., Hoffman P. The production of hyaluronate oligosaccharides by leech hyaluronidase and alkali // J Biol Chem. 1960. T. 235. — C. 924-7.
90. Macfarlane R.G. An Enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism, and Its Function as a Biochemical Amplifier // Nature. 1964. T. 202. — C. 498-9.

91. Maksimenko A.V. Cardiological biopharmaceuticals in the conception of drug targeting delivery: practical results and research perspectives // *Acta Naturae*. 2012. T. 4. № 3. — C. 72-81.
92. Malinconico S.M., Katz J.B., Budzynski A.Z. Hementin: anticoagulant protease from the salivary gland of the leech *Haementeria ghilianii* // *J Lab Clin Med*. 1984. T. 103. № 1. — C. 44-58.
93. Mann K.G., Krishnaswamy S., Lawson J.H. Surface-dependent hemostasis // *Semin Hematol*. 1992. T. 29. № 3. — C. 213-26.
94. Markwardt F., Schafer G., Topfer H., Walsmann P. [Isolation of hirudin from medicinal leech] // *Pharmazie*. 1967. T. 22. № 5. — C. 239-41.
95. Maticic S., Loewy A.G. The identification of isopeptide crosslinks in insoluble fibrin // *Biochem Biophys Res Commun*. 1968. T. 30. № 4. — C. 356-62.
96. Meissner A.J., Misiak A., Huszcza S., Ziemiński J.M. [Analysis of general and hemorrhagic complications after treatment of acute proximal deep venous thrombosis of the legs treated with anticoagulants, streptokinase and thrombectomy] // *Pol Merkur Lekarski*. 2000. T. 9. № 53. — C. 767-71.
97. Moser K.M. Thrombolysis with fibrinolysin (plasmin)-new therapeutic approach to thromboembolism // *J Am Med Assoc*. 1958. T. 167. № 14. — C. 1695-704.
98. Munro R., Jones C.P., Sawyer R.T. Calin--a platelet adhesion inhibitor from the saliva of the medicinal leech // *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1991. T. 2. № 1. — C. 179-84.
99. Nawa Y., Hatanaka O., Hara Y., Ishizaka S. A case of conjunctival leech infestation // *Jpn J Ophthalmol*. 2006. T. 50. № 1. — C. 64-5.
100. Neuhaus K.L., von Essen R., Tebbe U., Vogt A., Roth M., Riess M., Niederer W., Forycki F., Wirtzfeld A., Maeurer W., et al. Improved thrombolysis in acute myocardial infarction with front-loaded administration of alteplase: results of the rt-PA-APSAC patency study (TAPS) // *J Am Coll Cardiol*. 1992. T. 19. № 5. — C. 885-91.

101. Nikonov G.I., Titova E.A. Destabilase complexes--natural liposome produced by medicinal leeches *Hirudo medicinalis* // *Fundam Clin Pharmacol.* 1999. T. 13. № 1. — C. 102-6.
102. Olow B., Johanson C., Andersson J., Eklof B. Deep venous thrombosis treated with a standard dosage of streptokinase // *Acta Chir Scand.* 1970. T. 136. № 3. — C. 181-9.
103. Pager C.K. Streptokinase versus alteplase and other treatments for acute and delayed thrombolysis of blood stains in clothing // *BMJ.* 2000. T. 321. № 7276. — C. 1554-6.
104. Park H.J., Ahn J.M., Park R.M., Lee S.H., Sekhon S.S., Kim S.Y., Wee J.H., Kim Y.H., Min J. Effects of Alginate Oligosaccharide Mixture on the Bioavailability of Lysozyme as an Antimicrobial Agent // *J Nanosci Nanotechnol.* 2016. T. 16. № 2. — C. 1445-9.
105. Patra S., Nagesh C.M., Reddy B., Srinivas B.C., Agrawal N., Manjunath C.N., Hegde M. Thrombolysis With Single Bolus Tenecteplase Compared With Streptokinase Infusion in the Treatment of Acute Pulmonary Embolism: A Pilot Study // *Clin Appl Thromb Hemost.* 2015. T. 21. № 6. — C. 550-7.
106. Paul M.A., Patka P., van Heuzen E.P., Koomen A.R., Rauwerda J. Vascular injury from external fixation: case reports // *J Trauma.* 1992. T. 33. № 6. — C. 917-20.
107. Perin J.P., Jolles P. Enzymatic properties of a new type of lysozyme isolated from *Asterias rubens* : comparison with the *Nephtys hombergii* (annelid) and hen lysozymes // *Biochimie.* 1976. T. 58. № 6. — C. 657-62.
108. Pilcher H. Medicinal leeches: stuck on you // *Nature.* 2004. T. 432. № 7013. — C. 10-1.
109. Popova L.M., Pirogov V.N. [Thrombolytic therapy with streptodekase in ischemic strokes] // *Zh Nevropatol Psikhiatr Im S S Korsakova.* 1986. T. 86. № 12. — C. 1777-81.
110. Porter J.M., Cutler B.S., Lee B.Y., Reich T., Reichle F.A., Scogin J.T., Strandness D.E. Pentoxifylline efficacy in the treatment of intermittent

claudication: multicenter controlled double-blind trial with objective assessment of chronic occlusive arterial disease patients // *Am Heart J*. 1982. T. 104. № 1. — C. 66-72.

111. Rabasseda X. Tenecteplase (TNK tissue plasminogen activator): A new fibrinolytic for the acute treatment of myocardial infarction // *Drugs Today (Barc)*. 2001. T. 37. № 11. — C. 749-760.

112. Raynaud P., Desveaux B. [Reocclusion after treatment with actilyse] // *Arch Mal Coeur Vaiss*. 1988. T. 81 Spec No. — C. 25-32.

113. Rigbi M., Levy H., Iraqi F., Teitelbaum M., Orevi M., Alajoutsijarvi A., Horovitz A., Galun R. The saliva of the medicinal leech *Hirudo medicinalis*--I. Biochemical characterization of the high molecular weight fraction // *Comp Biochem Physiol B*. 1987. T. 87. № 3. — C. 567-73.

114. Sadler J.E. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor // *Annu Rev Biochem*. 1998. T. 67. — C. 395-424.

115. Salzet M., Chopin V., Baert J., Matias I., Malecha J. Theromin, a novel leech thrombin inhibitor // *J Biol Chem*. 2000. T. 275. № 40. — C. 30774-80.

116. Sawyer R.T., Jones C.P., Munro R. The biological function of hementin in the proboscis of the leech *Haementeria ghilianii* // *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1991. T. 2. № 1. — C. 153-9.

117. Schwartz M.L., Pizzo S.V., Hill R.L., McKee P.A. The effect of fibrin-stabilizing factor on the subunit structure of human fibrin // *J Clin Invest*. 1971. T. 50. № 7. — C. 1506-13.

118. Seemuller U., Eulitz M., Fritz H., Strobl A. Structure of the elastase-cathepsin G inhibitor of the leech *Hirudo medicinalis* // *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*. 1980. T. 361. № 12. — C. 1841-6.

119. Singh A.P. Medicinal leech therapy (hirudotherapy): a brief overview // *Complement Ther Clin Pract*. 2010. T. 16. № 4. — C. 213-5.

120. Snider G.L., Stone P.J., Lucey E.C., Breuer R., Calore J.D., Seshadri T., Catanese A., Maschler R., Schnebli H.P. Eglin-c, a polypeptide derived from the medicinal leech, prevents human neutrophil elastase-induced emphysema and

- bronchial secretory cell metaplasia in the hamster // *Am Rev Respir Dis*. 1985. T. 132. № 6. — C. 1155-61.
121. Sollner C., Mentele R., Eckerskorn C., Fritz H., Sommerhoff C.P. Isolation and characterization of hirustasin, an antistasin-type serine-proteinase inhibitor from the medical leech *Hirudo medicinalis* // *Eur J Biochem*. 1994. T. 219. № 3. — C. 937-43.
122. Soria A., Soria C., Boulard C. Fibrin stabilizing factor (F XIII) and collagen polymerization // *Experientia*. 1975. T. 31. № 11. — C. 1355-7.
123. Sosnovskii V.V., Sdobnikova S.V., Revishchin A.V., Surguch V.K., Troitskaia N.A., Sidamonidze A.L., Belogurov A.A., Del'ver E.P., Gurskii Ia G. [Surgical treatment policy using recombinant prourokinase for submacular hemorrhages] // *Vestn Oftalmol*. 2009. T. 125. № 4. — C. 3-8.
124. Speight J.G. Lange's handbook of chemistry. — Wyoming : McGRAW-HILL, 2005.
125. Speiser W., Mallek R., Koppensteiner R., Stumpflen A., Kapiotis S., Minar E., Ehringer H., Lechner K. D-dimer and TAT measurement in patients with deep venous thrombosis: utility in diagnosis and judgement of anticoagulant treatment effectiveness // *Thromb Haemost*. 1990. T. 64. № 2. — C. 196-201.
126. Takeshita K., Hashimoto Y., Ueda T., Imoto T. A small chimerically bifunctional monomeric protein: Tapes japonica lysozyme // *Cell Mol Life Sci*. 2003. T. 60. № 9. — C. 1944-51.
127. Vaitkus P.T., Barnathan E.S. Embolic potential, prevention and management of mural thrombus complicating anterior myocardial infarction: a meta-analysis // *J Am Coll Cardiol*. 1993. T. 22. № 4. — C. 1004-9.
128. Van Heijenoort J. Peptidoglycan hydrolases of *Escherichia coli* // *Microbiol Mol Biol Rev*. 2011. T. 75. № 4. — C. 636-63.
129. Van Wingerden J.J., Oosthuizen J.H. Use of the local leech *Hirudo michaelsoni* in reconstructive plastic and hand surgery // *S Afr J Surg*. 1997. T. 35. № 1. — C. 29-31.

130. Wakefield T.W., Myers D.D., Henke P.K. Mechanisms of venous thrombosis and resolution // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008. T. 28. № 3. — C. 387-91.
131. Watson L., Broderick C., Armon M.P. Thrombolysis for acute deep vein thrombosis // *Cochrane Database Syst Rev.* 2014. № 1. — C. CD002783.
132. Weaver W.D., Hartmann J.R., Anderson J.L., Reddy P.S., Sobolski J.C., Sasahara A.A. New recombinant glycosylated prourokinase for treatment of patients with acute myocardial infarction. Prourokinase Study Group // *J Am Coll Cardiol.* 1994. T. 24. № 5. — C. 1242-8.
133. White T.C., Berny M.A., Robinson D.K., Yin H., DeGrado W.F., Hanson S.R., McCarty O.J. The leech product saratin is a potent inhibitor of platelet integrin $\alpha_2\beta_1$ and von Willebrand factor binding to collagen // *FEBS J.* 2007. T. 274. № 6. — C. 1481-91.
134. Wiegand I., Hilpert K., Hancock R.E. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances // *Nat Protoc.* 2008. T. 3. № 2. — C. 163-75.
135. Williams R.D., Karaffa F. Comparison of a Fibrinolysin and Heparin on Induced Venous Thrombosis and Thrombolysis // *Surg Gynecol Obstet.* 1965. T. 121. — C. 309-12.
136. Wooster M.B., Luzier A.B. Reteplase: a new thrombolytic for the treatment of acute myocardial infarction // *Ann Pharmacother.* 1999. T. 33. № 3. — C. 318-24.
137. Xia Z.K., He X., Fan Z.M., Liu G.L., Gao Y.F., Fu J., Ren X.G., Mao S., Huang Q. [Nephrotic syndrome complicated with intracranial venous thrombosis treated with urokinase: report of 5 cases] // *Zhonghua Er Ke Za Zhi.* 2010. T. 48. № 5. — C. 338-41.
138. Yuceer M., Caner C. Antimicrobial lysozyme-chitosan coatings affect functional properties and shelf life of chicken eggs during storage // *J Sci Food Agric.* 2014. T. 94. № 1. — C. 153-62.

139. Yue X., Liu B., Xue Q. An i-type lysozyme from the Asiatic hard clam *Meretrix meretrix* potentially functioning in host immunity // *Fish Shellfish Immunol.* 2011. T. 30. № 2. — C. 550-8.
140. Yusuf S., Wood D., Ralston J., Reddy K.S. The World Heart Federation's vision for worldwide cardiovascular disease prevention // *Lancet.* 2015. T. 386. № 9991. — C. 399-402.
141. Zaidi S.M., Jameel S.S., Zaman F., Jilani S., Sultana A., Khan S.A. A systematic overview of the medicinal importance of sanguivorous leeches // *Altern Med Rev.* 2011. T. 16. № 1. — C. 59-65.
142. Zavalova L., Lukyanov S., Baskova I., Snezhkov E., Akopov S., Berezhnoy S., Bogdanova E., Barsova E., Sverdlov E.D. Genes from the medicinal leech (*Hirudo medicinalis*) coding for unusual enzymes that specifically cleave endo-epsilon (gamma-Glu)-Lys isopeptide bonds and help to dissolve blood clots // *Mol Gen Genet.* 1996. T. 253. № 1-2. — C. 20-5.
143. Zavalova L.L., Artamonova, II, Berezhnoy S.N., Tagaev A.A., Baskova I.P., Andersen J., Roepstorff P., Egorov Ts A. Multiple forms of medicinal leech destabilase-lysozyme // *Biochem Biophys Res Commun.* 2003. T. 306. № 1. — C. 318-23.
144. Zavalova L.L., Baskova I.P., Lukyanov S.A., Sass A.V., Snezhkov E.V., Akopov S.B., Artamonova, II, Archipova V.S., Nesmeyanov V.A., Kozlov D.G., Benevolensky S.V., Kiseleva V.I., Poverenny A.M., Sverdlov E.D. Destabilase from the medicinal leech is a representative of a novel family of lysozymes // *Biochim Biophys Acta.* 2000. T. 1478. № 1. — C. 69-77.
145. Zavalova L.L., Kuzina E.V., Levina N.B., Baskova I.P. Monomerization of fragment DD by destabilase from the medicinal leech does not alter the N-terminal sequence of the gamma-chain // *Thromb Res.* 1993. T. 71. № 3. — C. 241-4.
146. Zavalova L.L., Yudina T.G., Artamonova, II, Baskova I.P. Antibacterial non-glycosidase activity of invertebrate destabilase-lysozyme and of its helical amphipathic peptides // *Chemotherapy.* 2006. T. 52. № 3. — C. 158-60.

147. Zhang H.W., Sun C., Sun S.S., Zhao X.F., Wang J.X. Functional analysis of two invertebrate-type lysozymes from red swamp crayfish, *Procambarus clarkii* // Fish Shellfish Immunol. 2010. T. 29. № 6. — C. 1066-72.