

На правах рукописи

Калинин Егор Валерьевич

Биомедицинский потенциал фактора патогенности *Listeria monocytogenes*

InIB

1.5.11. Микробиология (биологические науки)

1.5.6. Биотехнология (биологические науки)

Автореферат

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России) и федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (ФГАОУ ВО РУДН).

Научные руководители:

доктор биологических наук Ермолаева Светлана Александровна, зав. лабораторией экологии возбудителей инфекций ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России

доктор химических наук Станишевский Ярослав Михайлович, директор Института биохимической технологии и нанотехнологии РУДН

Официальные оппоненты:

Смирнов Иван Витальевич, член-корреспондент РАН, д.х.н., заместитель директора Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Куликова Нина Георгиевна, к.б.н., руководитель научной группы Антибиотикорезистентности пищевых патогенов Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Ведущая организация: Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН)

Защита диссертации состоится « ____ » _____ 2024 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета 21.1.018.03 при ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России по адресу: 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России и на сайте Центра: <http://www.gamaleya.org/>.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2024 г.

ВрИО ученого секретаря диссертационного совета

д.б.н., профессор

Романова Ю. М.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности

Грамположительная бактерия *L. monocytogenes* относится к числу возбудителей пищевых инфекций. Вызываемое листерией заболевание, листериоз, по частоте встречаемости инфекций, связанных с продуктами питания, уступает таким инфекциям, как сальмонеллез, но значительно превосходит их по тяжести клинического течения и частоте летальных исходов: летальность от листериоза достигает 30% среди госпитализированных пациентов (Radoshevich et al. 2017). В первую очередь листериозу подвержены люди с ослабленным иммунитетом, пожилые люди и беременные женщины. Следует отметить определенную трудность в диагностике заболевания, которое часто протекает как менингит или, реже, энцефалит, или аборт у беременных. В связи с потенциальной опасностью заболевания, доля микробиологических исследований, связанных с выявлением *L. monocytogenes* в продуктах питания, одна из самых высоких (21%) (Gasanov et al., 2005), при этом существует потребность в быстрых и простых технологиях обнаружения этого патогена, что имеет важное значение для охраны здоровья населения.

Род *Listeria* включает 21 вид, 19 из которых являются сапрофитическими, а вид *L. ivanovii* вызывает заболевания животных, но не человека. Вместе с тем виды листерий имеют схожую физиологию, метаболизм и антигенную структуру, что затрудняет разработку тест-систем, специфично выявляющих патогенный для человека вид *L. monocytogenes*. Для дифференциации *L. monocytogenes* от других видов листерий можно использовать факторы патогенности, которые специфичны для этого вида.

Белок InlB (Интерналин Б) является фактором патогенности, опосредующим инвазию *L. monocytogenes* в непрофессиональные фагоциты. Этот белок является специфическим маркером *L. monocytogenes*, так как выявлен только у этой бактерии и отсутствует у сапрофитических видов листерий, а имеющийся у вирулентной для животных *L. ivanovii* одноименный

белок имеет низкую гомологию с InlB *L. monocytogenes*. Гомологичные InlB белки также отсутствуют у других известных видов бактерий. В связи с этим использование антител против InlB позволяет применять их в диагностических целях и исключит кросс-реакции с непатогенными листериями и представителями других бактериальных родов.

С другой стороны, благодаря специфической биологической активности, обеспечивающей уникальные функциональные свойства, биотехнологический потенциал использования белка листерий InlB не ограничивается его специфическими иммунохимическими свойствами. Было установлено, что в ходе процесса инфекции белок *L. monocytogenes* InlB специфически связывается с тирозинкиназным рецептором фактора роста гепатоцитов HGFR (**h**epatocyte **g**rowth **f**actor **r**eceptor, более известным как c-Met), находящимся на поверхности гепатоцитов, эпителиальных клеток и некоторых других клеток человека (Veiga, Cossart, 2007). Сообщалось также об альтернативном рецепторе, с которым взаимодействует InlB – рецепторе белка системы комплемента gC1qR (Braun et al., 1997). Помимо своей основной мишени, белка системы комплемента Gc1q, рецептор gC1q-R распознает и связывает ряд функциональных антигенов вирусного и бактериального происхождения, обеспечивая прикрепление и/или проникновение микроорганизмов. Данные о взаимодействии InlB с белком gC1q-R на момент начала наших работ были противоречивы, также отсутствовали данные о возможных различиях в этих взаимодействиях между природными изоформами InlB.

Взаимодействие InlB с HGFR/c-Met приводит к активации многочисленных внутриклеточных сигнальных путей, ведущих к пролиферации, подвижности и клеточной жизнеспособности. По сути, InlB является функциональным гомологом физиологического лиганда рецептора HGFR – растворимого белка, известного как фактор роста гепатоцитов HGF (**h**epatocyte **g**rowth **f**actor). Фактору роста гепатоцитов HGF принадлежит ключевая роль в процессах регенерации печени, которая связана с ускорением

пролиферации гепатоцитов. Несмотря на очевидный потенциал терапевтического использования рекомбинантного HGF в регенерационной медицине, существуют серьезные затруднения для его продвижения в качестве фармацевтического агента. В первую очередь это связано с необходимостью получения в процессе продукции рекомбинантного HGF специфических гликозилированных форм (Stahl et al., 1997). Человеческие белки часто требуют модификации (например, гликозилирования) для получения активных форм, поэтому на биотехнологических предприятиях такие препараты продуцируются в культивируемых клеточных линиях млекопитающих, таких как клетки CHO, PER.C6, HEK293 (Suzuki et al., 1985 Khelf et al., 2011, Lalonde et al., 2017). Производство в этих хозяевах является дорогостоящим и сложным из-за высокой стоимости питательных сред, низкой толерантности клеток к изменениям условий реакции и медленным темпам роста (Müller et al., 2006). Бактериальные системы для экспрессии белков имеют преимущества в простоте использования, стоимости, коротком времени генерации и масштабируемости. Недостатком бактериальных систем экспрессии при производстве рекомбинантных белков человека является невозможность посттрансляционной модификации. Однако такая модификация в большинстве случаев не нужна, если бактериальные системы

В этой области использование InlB имеет значительные перспективы. Последние исследования, в том числе выполненные в России, продемонстрировали роль InlB как агониста HGFR, влияющего на клеточный гомеостаз, способствующего ускорению заживления ран и поддержали необходимость более глубокого изучения использования потенциала InlB и его производного idInlB не только в диагностических целях, но и как альтернативы для рекомбинантного фактора роста гепатоцитов HGF в терапевтических приложениях (Chalenko et al., 2018).

В связи с вышесказанным нами была сформулирована следующая цель работы.

Цель работы:

Оценить возможность использования фактора патогенности *L. monocytogenes* белка InlB в качестве мишени для выявления и идентификации *L. monocytogenes*, а также потенциал использования рекомбинантного очищенного InlB для регенерации печени.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи:**

1. Получить очищенные препараты различных изоформ рекомбинантного с-Met - связывающего фрагмента белка InlB (idInlB) в бактериальной системе экспрессии *E. coli*.
2. Получить поликлональные кроличьи антитела к очищенному препарату idInlB.
3. Оценить уровень продукции InlB у штаммов *L. monocytogenes*, относящиеся к разным клональным комплексам, с использованием иммуноферментного анализа на основе полученных антител.
4. Разработать способ для обнаружения и идентификации *L. monocytogenes* на основе антител к idInlB и оценить ее специфичность и чувствительность на модели экспериментальной контаминации молока.
5. Сравнить физико-химические и функциональные свойства природных изоформ idInlB, выявленных у филогенетически удаленных штаммов *L. monocytogenes*, в том числе, способность взаимодействовать с рецепторами с-Met и gC1q-R.
6. На модели лабораторных животных оценить эффективность idInlB и физиологического лиганда человеческого рецептора с-Met, белка HGF, при стимуляции регенеративных процессов в печени после частичной гепатэктомии и на фоне химических повреждений.

Научная новизна.

Показано, что несмотря на различия в уровне экспрессии, все штаммы *L. monocytogenes* продуцируют белок InlB на среде ВНИ, содержащий 0,2 % активированного угля. Впервые показана возможность использования антител

к idInlB в методе дот-блота для идентификации *L. monocytogenes*. Впервые экспериментально показаны физико-химические и функциональные различия между природными изоформами рецептор-связывающего домена InlB (idInlB), характерными для штаммов *L. monocytogenes*, относящихся к разным клональным комплексам: показано, что изоформы idInlB отличаются по константам связывания рецепторов c-Met и gC1q-R; установлено, что при применении в отношении клеток человека и млекопитающих, природные изоформы idInlB вызывают различающиеся паттерны развития внутриклеточных сигнальных процессов. Впервые показана возможность использования бактериального белка как средства регенерации печени: продемонстрирован регенеративный эффект, который рекомбинантный очищенный препарат idInlB оказывает на восстановление печени на фоне частичной гепатэктомии или химического повреждения.

Практическая значимость

В рамках работы получены очищенные препараты рекомбинантных изоформ idInlB, что подтверждено патентом РФ на изобретение 2688422 С1 «Рекомбинантный интерналин В 321, полученный с помощью штамма *Escherichia coli*» (дата регистрации 21.05.2019). Разработана схема иммунизации кроликов очищенными препаратами idInlB для получения поликлональных антител, специфичных к idInlB. С использованием полученных антител к idInlB, разработана тест-система для выявления и идентификации *L. monocytogenes* методом дот-блоттинга, для которой доказаны высокая специфичность и чувствительность (1 КОЕ в 1 мл молока). Разработанная тест-система может быть использована для выявления и идентификации *L. monocytogenes* в пищевых продуктах. На тест-систему получен патент РФ на изобретение 2812147 С1 «Способ дифференциации *Listeria monocytogenes* от других видов *Listeria spp.* методом дот-блоттинга с использованием конъюгированных антител против фактора патогенности InlB» (дата регистрации 23.01.2024). В экспериментах на лабораторных животных получены доказательства перспективности дальнейших

исследований возможности использования очищенного препарата idInlB для регенерации печени при ее химическом повреждении и при частичной гепатоэктомии.

Методология и методы исследования

Методологией исследования является экспериментальная работа по гетерологичной экспрессии, очистке и анализу свойств белков *L. monocytogenes* с использованием бактериологических, культуральных, биохимических, молекулярно-генетических, иммуноферментных и биологических методов. Данные обрабатывали с помощью компьютерного и статистического анализа.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Получены в гетерологичной системе экспрессии очищенные препараты (степень чистоты >97%) рекомбинантных белков - изоформ функционального домена фактора патогенности InlB (idInlB) *L. monocytogenes*. На основе антител к idInlB разработана видоспецифичная система выявления и идентификации *L. monocytogenes*, основанная на методе дот-блоттинга и имеющая чувствительность 1 КОЕ/мл при выявлении листерий в сыром молоке.
2. Продемонстрированы различия в физико-химических и функциональных свойствах рекомбинантных изоформ idInlB. В том числе, установлены различия в эффективности связывания изоформами idInlB поверхностных рецепторов клеток человека c-Met и gC1qR и обусловленные ими отличия во внутриклеточных сигнальных процессах.
3. Показана возможность использования очищенного препарата idInlB как средства регенерации печени при частичной гепатоэктомии и химическом повреждении, при этом гепатопротекторная и пролиферативная активность использованного бактериального белка idInlB_{CC1} сравнима с активностью физиологического лиганда рецептора c-Met HGF.

Личный вклад автора

Разделы «получение и очистка рекомбинантного белка idInlB, оценка потенциала InlB как видоспецифического маркера *L. monocytogenes*, различия в свойствах изоформ белка idInlB» выполнены целиком автором лично.

Эксперименты по моделированию повреждений и регенерации печени лабораторных животных, входящие в раздел «Терапевтические применения idInlB_{СС1}», выполнены совместно с научным сотрудником лаборатории экологии возбудителей инфекций к.б.н. Собяниным К. А. Гистологический анализ печени проводили совместно с научными сотрудниками Научно-исследовательский института морфологии человека им. А.П. Авцына член-корр. РАН, проф. Л.М. Михалевой и к.м.н. К. Ю. Мидибером. Термоферез белков проводили совместно с научными сотрудниками Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН член-корр.РАН. д.б.н. Митькевичем В.А., к.б.н. Кечко О. И. и к.б.н. Куликовой А.А.

Степень достоверности результатов и апробация работы

Достоверность результатов исследования подтверждается достаточным количеством наблюдений, современными методами исследования, которые соответствуют поставленным в работе цели и задачам. Примененные статистические методы адекватны поставленным задачам. Проверка статистических гипотез осуществлялась при допустимом в медико-биологических исследованиях 5%-ом уровне значимости (0,05)

Основные материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на российских и международных научных конференциях: Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Conference on Microbiology 2020, 16th Joint Conference of 7th Joint Conference of the German Society for Hygiene and Microbiology (DGHM) 2020, Российский микробиологический конгресс 2021, Ломоносов-2023.

В завершеном виде работа была апробирована и рекомендована к защите на заседании ученого совета Института биохимической технологии и нанотехнологии РУДН, протокол №37 от 19.09.2022; на совместной научной

конференции отделов Медицинской микробиологии и Природноочаговых инфекций ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства Здравоохранения Российской Федерации «14» февраля 2024 года.

Публикации

Основные положения диссертации изложены автором в 5 статьях, напечатанных в рецензируемых журналах Scopus/WoS и рекомендованных ВАК для публикации к защите, все - по результатам экспериментальных исследований, 4 тезиса в сборнике трудов конференций, из них 2 в международных. По результатам исследования получено 2 патента на изобретение.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 133 страницах машинописного текста, включает разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов, заключение, выводы, список литературы (166 источников, из которых отечественных публикаций – 1, иностранных публикаций – 165). Работа содержит 7 таблиц и 38 рисунков.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные штаммы и культуры клеток. Объектами исследований служили штаммы из коллекции лаборатории экологии возбудителей инфекции ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. В том числе, штаммы-продуценты рекомбинантных белков *E. coli* BL21::pET28b(+)::InlBallele9/InlBallele13/InlBallele14 (Chalenko et al., 2019). Штаммы *Listeria monocytogenes*: типовой EGDe (серовар 1/2a) и его изогенный вариант с делецией гена *inlB* *L. monocytogenes* EGDe Δ inlB, типовые штаммы *L. innocua* SLCC 3379, *L. welshimeri* ATCC 35897, *L. seeligeri* SLCC 5921, *L. ivanovii* ATCC 19119, любезно предоставленные Dr. J.Vazquez-Boland, Univ.

Bristol, UK. Объектами исследования эукариотических клеток послужили перевиваемая линия эпителиальных клеток человека HEp-2.

Условия культивирования. Стандартно *L. monocytogenes* культивировали на сердечно-мозговом агаре (ВНІ, BD), при 37°C. В опытах по выявлению *L. monocytogenes* в молоке проводили высевы культуры на среду ВНС (ВНІ с добавлением 0,2 % угля) (Ermolaeva et al., 1997) и селективную среду PALCAM. Культивирование *E. coli* проводили на жидкой и твердой питательных средах Лурия-Бертани (LB)(Amresco, США). Культивирование штаммов *E. coli* BL21, содержащих плазмиды, проводили на среде LB с добавлением канамицина (100мкг/мл). Эукариотические клетки выращивали в среде DMEM с добавлением 2% сыворотки при 37°C в 5% CO₂ атмосфере.

Очистка рекомбинантного белка, несущего метку His-tag. Для очистки гистидин-меченных белков использовали колонку Ni-NTA (Invitrogen, США) согласно инструкции производителя.

Электрофорез белков в полиакриламидном геле и иммуноблотинг. Разделение белков в ДСН-ПААГ, перенос на нитроцеллюлозную мембрану и иммуноблотинг проводили стандартными методами.

Получение моноспецифических поликлональных антител к InlB, конъюгированных с пероксидазой хрена. Поликлональные антитела, специфичные к InlB, получали иммунизацией кролика очищенным препаратом рекомбинантного белка idInlB_{CC1}. Очистку антител проводили хроматографией с использованием очищенного idInlB, иммобилизованного на BrCN-сефарозе. Антитела анти-InlB IgG конъюгировали с пероксидазой хрена с использованием двухстадийного метода и глутарового альдегида в качестве сшивающего агента.

Идентификация листерий методом дот-блотинга. Культуру бактерий высевали на неселективную среду ВНС, колонии переносили на нитроцеллюлозную мембрану, отпечатки колоний окрашивали с использованием конъюгата a-InlB-IgG-HRP и субстрата HRP.

Испытание на острую токсичность CCl₄. Внутривенную инъекцию проводили животным, которые голодали в течение 12 ч и анестезировали внутрибрюшинной инъекцией пентобарбитала натрия (40 мкг/г). Через 48 ч после инъекции CCl₄ мышам были обескровлены и вскрыты под наркозом. Их печень удаляли, взвешивали и фиксировали для последующего гистологического исследования.

Морфометрическое исследование срезов печени Зафиксированную в формалине печень измельчали на блоки толщиной примерно 1 мм³ и готовили парафиновые срезы. Всего из пяти блоков для каждой печени были приготовлены срезы толщиной 1 мкм. Для морфологического исследования и морфометрического анализа срезы были окрашены с гематоксилином и эозином с использованием набора для окрашивания H&E (Abcam).

Статистика. Все эксперименты повторялись не менее трех раз. Использовался непарный t-критерий Стьюдента, включенный в программный пакет Excel (Microsoft, Редмонд, Вашингтон, США), и р-значения менее 0,05 считались статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

I часть. Очистка и характеристика рекомбинантных белков idInlB

1.1. Очистка рекомбинантных белков idInlB.

Нашей целью было исследовать биомедицинский потенциал фактора патогенности *L. monocytogenes* белка InlB. Поскольку этот потенциал в значительной мере определяется способностью InlB взаимодействовать с эукариотическими рецепторами c-Met и gC1q-R, мы сосредоточились на изучении свойств интерналинового домена InlB (idInlB; аминокислоты 36-321), который непосредственно взаимодействует с целевыми рецепторами. Учитывая ранее установленную природную вариабельность idInlB (Adgamov et al., 2012), в работу были включены три изоформы idInlB, специфичные для штаммов филогенетически удаленных клональных комплексов: idInlB_{CC1}, специфичная для штаммов клонального комплекса CC1, ответственных за ряд крупных вспышек листериоза (серовар 4b, I филогенетическая линия);

idInlB_{CC9} специфичная для клонального комплекса CC9, часто встречающегося среди изолятов, выделенных из продуктов питания (серовар 1/2a, II филогенетическая линия); и idInlB_{CC7}, выявленная у штаммов, относящихся к широкому кругу клональных комплексов, доминирующих в природных очагах России, включая CC7, CC20, CC121 и др. (серовар 1/2a, II филогенетическая линия).

Рекомбинантные изоформы idInlB были очищены из ранее полученных штаммов-продуцентов (Chalenko et al., 2019) с использованием аффинной хроматографии на Ni-NTA-сефарозе. Результаты очистки для изоформы idInlB_{CC1} показаны на рисунке 1. Все стадии очистки были проведены по аналогии для все трех выбранных изоформ белков

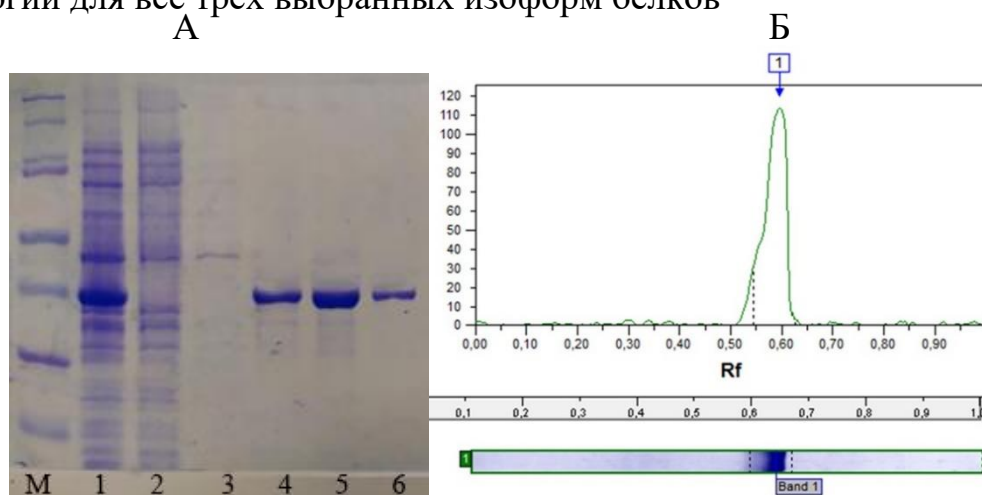


Рисунок 1. А Электрофореграмма лизата рекомбинантного штамма *E. coli* BL21 и очищенных белковых препаратов. М – маркер (BioRad); 1 – лизат рекомбинантного штамма *E. coli* pET28b-idInlB, 2 – «проскок», 3 – фракция промывки, 4 – 300 мМ имидазола (фракция 1), 5 - 300 мМ (фракция 2), 6 – 500 мМ (фракция 3). Б Денситограмма результатов анализа электрофореграммы очищенного препарата белка idInlB_{CC1}.

1.2. Физико-химические свойства изоформ idInlB.

После получения очищенных препаратов были исследованы физико-химические свойства изоформ idInlB при помощи гель-проникающей хроматографии (ГПХ) и собственной флуоресценции для определения олигомерного состояния белков и оценки конформации белков соответственно (Рисунок 2).

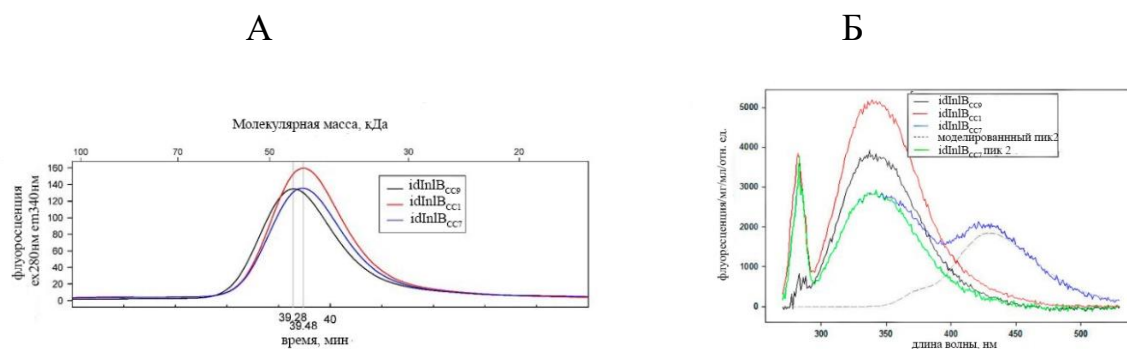


Рисунок 2. Характеристика изоформ idInlB при помощи ГПХ (А) и собственной флуоресценции (Б)

Результаты исследований показали, что изоформы не отличаются по способности образовывать димеры, при этом спектры флуоресценции отличались, но незначительно.

II часть. Получение антител против очищенного препарата idInlB.

Для того чтобы разработать метод детекции для обнаружения *L. monocytogenes* необходимо было получить антитела к idInlB. Для выработки специфичной кроличьей антисыворотки к InlB в качестве антигена использовали изоформу белка, характерную для типового штамма EGDe (idInlB_{CC9}), так как этот штамм используется в большинстве исследований. В ходе многоступенчатой очистки, включающей в себя осаждение, ионообменную и аффинную хроматографию, из сыворотки иммунизированных кроликов были получены фракции IgG к idInlB. К антителам присоединили пероксидазу хрена и специфичность полученного конъюгата α-InlB-IgG-HRP была проверена в прямом иммуноферментном анализе на 4 штаммах рода *Listeria* и методе иммуноблота. Конъюгат реагировал только с *L. monocytogenes*, экспрессирующей InlB и не реагировал с делеционным штаммом *L. monocytogenes* ΔinlB и непатогенными для человека штаммами, что доказывает высокую специфичность полученных антител.

III часть. Оценка продукции InlB у изолятов *L. monocytogenes*, относящихся к разным клональным группам

На основе очищенных антител в иммуноферментном анализе, были оценены уровни InlB в штаммах, относящиеся к разным клональным комплексам. Ранее было показано, что клинические и пищевые изоляты отличаются уровнем экспрессии генов *inlB* (Lathrop et al., 2008).

Полученные данные (рисунок 3) показывают, что для штаммов, относящихся к более вирулентным клональным комплексам (CC1, CC2) характерен более высокий уровень InlB без активации PrfA регулона в сравнении с гиповирулентными CC7 и CC9. Однако при активации PrfA регулона продукция InlB ожидаемо повышалась для всех штаммов, поэтому при создании системы для обнаружения *L. monocytogenes* на основе антител к InlB в среду для выращивания бактерий добавлялся гидрофобный адсорбент. Для жидких питательных сред – Amberlite XAD4, для твердых – активированный уголь (ВНІС-агар).

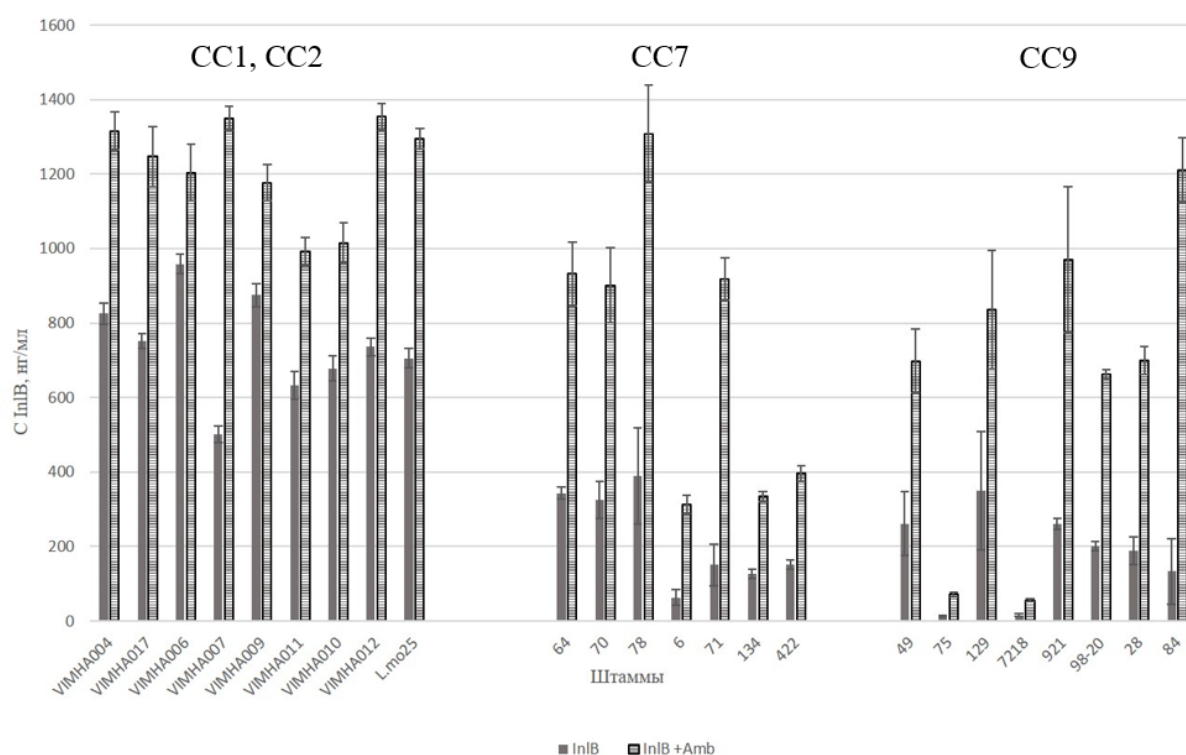


Рисунок 3. Уровень экспрессии InlB на поверхности клеток у штаммов, относящихся к разным клональным комплексам. Концентрацию InlB измеряли при помощи ИФА. Бактерии выращивали в среде ВНІ без и с добавлением 1% Amberlite XAD4.

IV часть. Потенциал InlB как видоспецифического маркера *L. monocytogenes*

Мы использовали уникальность фактора патогенности InlB для разработки видоспецифической системы выявления колоний *L. monocytogenes* на основе метода дот-иммуноанализа, распознающего отпечатки колоний на нитроцеллюлозной мембране с помощью конъюгата антител, развитых против очищенного препарата рекомбинантного idInlB_{CC1}, с HRP (α-InlB-IgG-HRP). При выращивании тестируемых бактерий использовали ВНС-агар (Ermolaeva et al., 1997).

Специфичность метода проверили с использованием 9 штаммов *L. monocytogenes*, принадлежащих к различным клональным комплексам и сероварам других видов *Listeria spp.* и видов патогенных бактерий, не относящихся к *Listeria* (в совокупности 9 штаммов). Все протестированные штаммы *L. monocytogenes* дали положительный сигнал, в то время как другие непатогенные листериальные и нелистериальные бактерии – нет (рисунок 4).

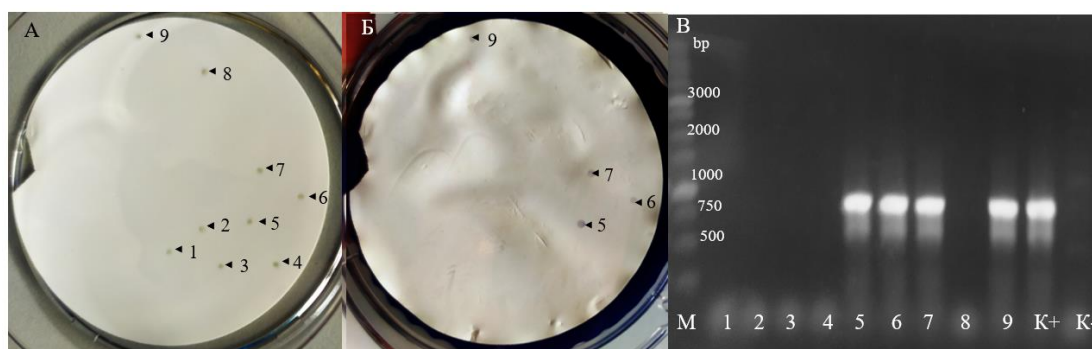


Рисунок 4. Результаты дот-блоттинга. *L. monocytogenes* EGDe и *L. innocua* SLCC 3379 взяты в соотношении 1:1 и выращены на агаре ВНС в течение 24 ч. Отпечатанные колонии отбирали перед отмывкой, затем мембрану обрабатывали конъюгатом α-InlB-IgG-HRP, как описано выше. Для идентификации *L. monocytogenes* была проведена ПЦР с использованием праймеров, специфичных к гену *inlB*. А – отпечатки колоний, выращенных на ВНС-агаре; В – результаты дот-иммуноанализа после отпечатывания на мембране; С – продукты ПЦР были разделены на 1 % агарозном геле, фрагмент гена *inlB* имеет размер 872 п.н. Цифрами обозначены отдельные колонии.

Разработанный метод был использован для выявления *L. monocytogenes* в посевах молока, экспериментально инокулированном 1, 10, 10² или 10³ КОЕ/мл штаммом *L. monocytogenes* EGDe. Инокулированные образцы молока высевали на ВНС-агар для выявления *L. monocytogenes* разработанным методом дом-иммуноанализа и параллельно на селективный PALCAM-агар для анализа выращенных колоний методом ПЦР.

Обнаружение *L. monocytogenes* в концентрации 1 КОЕ/мл было успешным в одном из трех экспериментах с использованием дот-иммуноанализа и в двух из трех экспериментах с использованием PALCAM-агара. Когда использовались более высокие концентрации бактерий, начиная с 10 КОЕ/мл, результаты всех трех независимых экспериментов были успешными при использовании обоих методов (Рисунок 5). Таким образом, полученные результаты показали, что чувствительность разработанного дот-иммуноанализа достигала 1 КОЕ/мл.

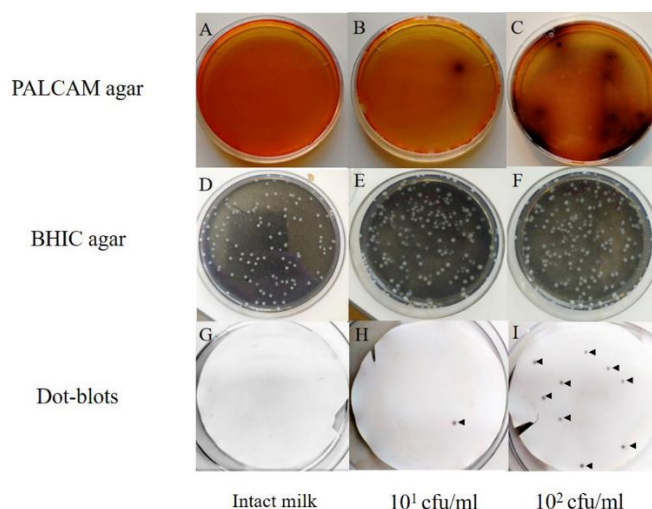


Рисунок 5. Определение чувствительности метода дот-иммуноанализа по сравнению с выявлением *L. monocytogenes* на среде PALCAM, подтвержденным ПЦР.

V часть. Свойства idInlB как лиганда человеческих рецепторов.

5.1. Константы связывания фактора патогенности *L. monocytogenes* интерналинового домена InlB (idInlB).

Константы диссоциации взаимодействия изоформ idInlB с рецепторами c-Met и gC1q-R были определены методом микротермофореза. Константа

диссоциации с рецептором c-Met для idInlB_{CC1} (7.4 ± 1.3 нМ) была значительно меньше, чем для idInlB_{CC9} и idInlB_{CC7} (58.7 ± 18.5 нМ и 93.6 ± 11.5 нМ, соответственно). При взаимодействии с gC1q-R константы диссоциации для idInlB_{CC1}, idInlB_{CC7} и idInlB_{CC9} составляли $7,4 \pm 0,8$ нМ, $10,2 \pm 0,9$ нМ и $21,5 \pm 1,0$ нМ, соответственно. Таким образом, константы диссоциации увеличивались в ряду для взаимодействий с c-Met idInlB_{CC1} \ll idInlB_{CC7} $<$ idInlB_{CC9}, и для взаимодействий с gC1q-R idInlB_{CC1} \approx idInlB_{CC7} $<$ idInlB_{CC9}. Изоформа idInlB_{CC1} характеризовалась наибольшим сродством к c-Met и сродством, сопоставимым с idInlB_{CC7}, к gC1q-R.

5.2. Особенности взаимодействия фактора патогенности *L. monocytogenes* интерналинового домена InlB (idInlB) с gCq1-R

Для уточнения потенциальных различий во взаимодействия различных изоформ idInlB с gC1q-R, мы провели иммуноферментный и конкурентный анализ. Иммуноферментный анализ подтвердил, что различия в связывании gC1q-R между изоформами невелики. Только при концентрации 0,4 мкг/мл idInlB_{CC1} связывал белок gC1q-R лучше, чем idInlB_{CC7} и idInlB_{CC9}. Конкурентный анализ, в котором сравнивали idInlB_{CC1} и idInlB_{CC7}, имеющие сравнимые константы диссоциации, показал, что idInlB_{CC1} связывается преимущественно с N-концевым доменом gC1q-R, в то время как связывание idInlB_{CC7} имеет неспецифический характер.

Таким образом, изоформа idInlB_{CC1}, полученная из штамма, относящегося к высоковирулентному клональному комплексу CC1, показывала наибольшую эффективность связывания с таргетными рецепторами.

Различия в физико-химических свойствах и, в частности, в константах диссоциации с таргетными рецепторами, могут приводить к различиям в динамике внутриклеточных процессов в клетке-хозяине. Для оценки динамики сигнальных процессов в клетках человека, на которых воздействуют разные изоформы InlB, мы определили динамику фосфорилирования киназ Erk1/2 и Akt, представляющих два важнейших сигнальных пути,

контролируемых с-Met, MAPK (mitogen-activated protein kinase) сигнальный путь и PI3K/АКТ/mTOR сигнальный путь, соответственно. После внесения очищенных препаратов idInlB в среду культивирования клеток HEp-2 idInlB_{CC9} и idInlB_{CC7} вызывали сходную кинетику появления фосфорилированных форм киназ фосфо-Erk1/2 и фосфо-Akt. Напротив, idInlB_{CC1} обеспечивал иную кинетику фосфорилирования Erk1/2 и Akt (Рисунок 6). Влияние idInlB_{CC9} и idInlB_{CC7} на фосфорилирование Akt было менее выраженным как по интенсивности, так и по продолжительности. В течение первых минут после добавления idInlB_{CC7} вызывал различную эффективность фосфорилирования Erk1/2 и Akt по сравнению с обоими другими вариантами.

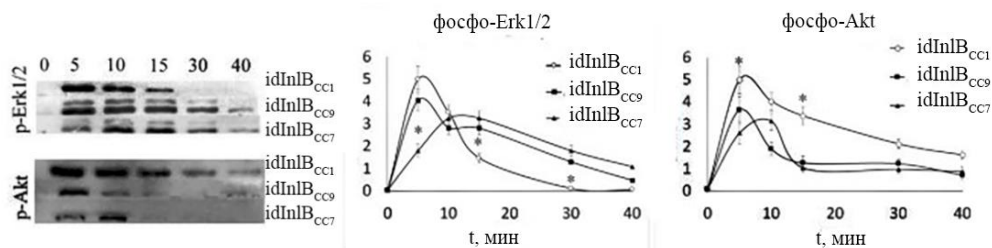


Рисунок 6. Кинетика Erk1/2 и Akt фосфорилирования в присутствии idInlBs. Кривые показывают оцифрованные данные из трех независимых экспериментов. * $p < 0,05$.

Таким образом, изоформа idInlB_{CC1}, демонстрирующая максимальную эффективность связывания с таргетными рецепторами, показывала специфическую активацию сигнальных путей в клетках человека. Эта изоформа была выбрана нами для использования в терапевтических приложениях.

VI часть. Терапевтические применения idInlB_{CC1}

6.1. Оценка токсичности idInlB_{CC1} у мышей

Определение терапевтического потенциала idInlB_{CC1}, было начато с определения токсичности препарата для оценки диапазона рабочих концентраций. Токсичность проводили путем введения в хвостовую вену мышам очищенного препарата idInlB_{CC1} в концентрациях от 2 нг/г до 2000 нг/г. Гистологический анализ и визуальный осмотр не выявили изменений в печени при дозе 2 нг/г, в то время как более высокие дозы вызывали легкие изменения

цвета печени и изменения в ткани печени (Рисунок 7). Для подтверждения безопасности idInlB_{CC1} в концентрации 2 нг/г определяли динамику массы тела и уровни аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ) в сыворотке крови на 21-й день, которые не выявили патологических изменений, связанных с применением idInlB_{CC1} при концентрации 2 нг/г. Таким образом, концентрация 2 нг/г являлась безопасной для мышей.

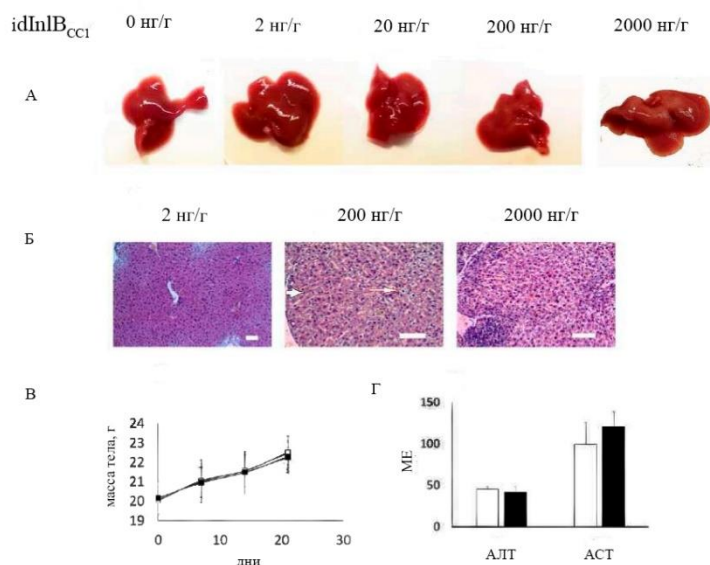


Рисунок 7. Оценка токсичности различных концентраций idInlB_{CC1} для мышей BALB/c.

6.2. Гепатопротективный эффект idInlB_{CC1}

Мы использовали концентрацию 2 нг/г для оценки гепатопротективного эффекта idInlB_{CC1} при остром повреждении печени мышей, вызванном внутрижелудочной инъекцией CCl₄. idInlB_{CC1} или рекомбинантный человеческий фактор роста гепатоцитов (рчHGF) в той же концентрации вводили внутривенно за 2 ч до повреждения печени. Визуальное наблюдение и патогистологический анализ показали, что InlB_{CC1} снижает характеристики деструкции острого повреждения печени CCl₄ (Рисунок 8) Визуальные данные подтверждались относительным уменьшением массы печени по сравнению с животными, получавшими плацебо. Средняя масса печени составляла 1,51, 1,27 и 1,15 г для животных, которые получали растворитель, InlB_{CC1} и рчHGF, соответственно.

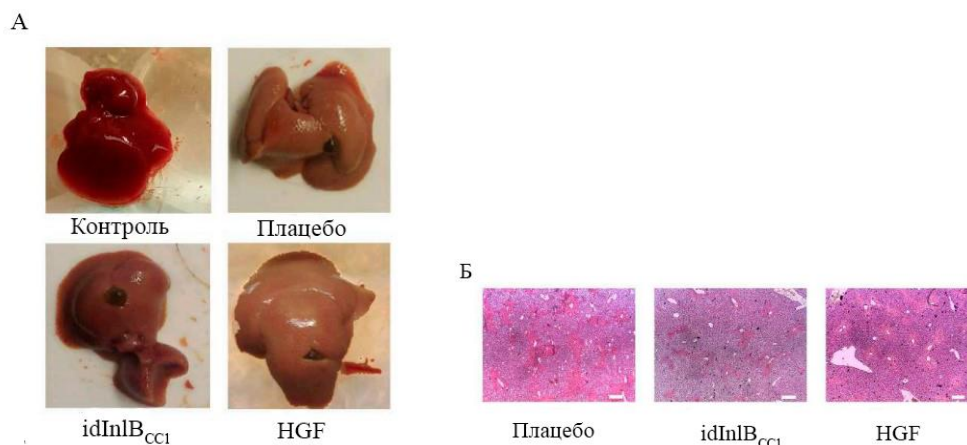


Рисунок 8. Гепатопротекторное действие IdInlB_{CC1} у мышей, получивших внутрижелудочную инъекцию CCl₄. (А) Макроскопические изменения в печени; (Б) гистопатологические изменения в печени; шкала 250 мкм

6.3. Регенеративный потенциал idInlB_{CC1}

Регенеративный потенциал idInlB_{CC1} оценивали на модели 70% частичной гепатэктомии печени крыс. idInlB_{CC1} вводили внутривенно в концентрации 2 нг/г на второй, четвертый и шестой день после резекции. Животных умерщвляли через 7 дней, печень взвешивали и получали гистологический доступ. У животных, получавших idInlB_{CC1}, и контрольных животных, получавших плацебо, индекс массы печени (ИМП) соответственно составил $2,9 \pm 0,12\%$ и $2,0 \pm 0,47\%$ ($p < 0,05$). ИМП животных, получавших IdInlB_{CC1}, достиг 88% относительно ИМП животных, которым не проводили резекцию, в то время как у контрольных животных он составлял 62%. Эти данные продемонстрировали, что idInlB_{CC1} ускоряет восстановление массы печени.

Чтобы более детально оценить потенциал idInlB_{CC1} для стимуляции пролиферации гепатоцитов, на гистологических препаратах печени провели анализ процента двуядерных клеток и диаметр ядра. У животных, получавших idInlB_{CC1}, наблюдалось увеличение процента двуядерных гепатоцитов в 1,7 раза по сравнению с контрольной группой ($6,7 \pm 2,62\%$ против $4,0 \pm 1,8\%$, соответственно, $p < 0,05$). Автоматический подсчет распределения диаметра ядер показал явное увеличение процентного возраста ядер с большим диаметром у животных, получавших idInlB_{CC1}, по сравнению с контролем.

Для дальнейшей оценки пролиферирующей активности гепатоцитов использовали окрашивание Ki67 на гистологических срезах печени. Ki67 экспрессируется в фазах G1-M клеточного цикла, но не в фазе G0. Машинная оценка продемонстрировала различное распределение интенсивности окраски с явным преобладанием более высокого накопления красителя у животных, получавших idInlB_{CC1} (Рисунок 9). Таким образом, полученные результаты продемонстрировали, что InlB_{CC1} стимулировал вступление гепатоцитов в клеточный цикл после 70% гепатоэктомии.

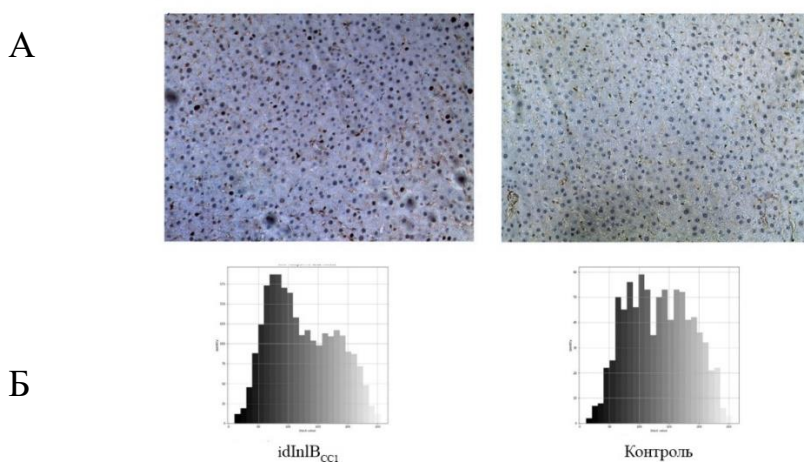


Рисунок 9. Иммуногистохимический анализ срезов печени. (А) Репрезентативные окрашенные Ki67 срезы регенерированной печени обработанных idInlB_{CC1} и контрольных животных. (Б) Соответствующая машинная оценка распределения цвета ядра

Полученные данные свидетельствуют о том, что увеличение массы печени у животных, получавших idInlB_{CC1}, было связано с улучшением пролиферации гепатоцитов. Это предположение согласуется с данными *in vitro*, демонстрирующими митогенную активность idInlB_{CC1}.

В целом, представленные данные показывают, что фактор патогенности *L. monocytogenes* idInlB_{CC1} является первым примером бактериального белка, который потенциально возможно применять в целях регенеративной медицины в качестве альтернативы рекомбинантным факторам роста человека.

ВЫВОДЫ

1. Получены и охарактеризованы очищенные препараты рекомбинантных белков трех изоформ с-Met-связывающего домена idInlB фактора патогенности *L. monocytogenes* InlB, характерных для разных филогенетических групп *L. monocytogenes*: idInlB_{CC1}, idInlB_{CC7} и idInlB_{CC9} типичных для клональных комплексов CC1 (I филогенетическая линия), CC7 и CC9 (II филогенетическая линия), соответственно.
2. Получены моноспецифические поликлональные антитела к idInlB.
3. При использовании антител в ИФА-анализе показано, что все исследованные штаммы *L. monocytogenes* продуцируют InlB, а также выявлены филогенетически-детерминированные различия в уровнях продукциях InlB у штаммов, относящихся к разным клональным комплексам.
4. На основе полученных антител к idInlB разработана метод колониального дот-блоттинга для выявления и идентификация *L. monocytogenes*, выращиваемых на неселективной среде, содержащей активированный уголь; с использованием разработанного способа удается дифференцировать *L. monocytogenes* от *Listeria spp.* и других патогенных бактерий; при выявлении контаминации сырого молока живыми *L. monocytogenes* чувствительность системы составила 1 КОЕ /мл.
5. Впервые показано, что изоформы idInlB характеризуются разными константами диссоциации (K_d) при взаимодействии с основными мишенями InlB на поверхности клеток млекопитающих: тирозинкиназным рецептором с-Met (idInlB_{CC1} < idInlB_{CC7} << idInlB_{CC9}) и рецептором системы комплемента gC1q-R (idInlB_{CC1} ≈ idInlB_{CC7} < idInlB_{CC9}). Различия в константах связывания коррелируют с различными паттернами развития внутриклеточных сигнальных процессов, при обработке клеток, несущих с-Met и gC1q-R, очищенными препаратами изоформ idInlB.
6. На моделях частичной гепатэктомии и химического повреждения печени лабораторных животных CCl₄ с использованием очищенного препарата рекомбинантного белка *L. monocytogenes* idInlB_{CC1} впервые показан потенциал

бактериального белка как гепатопротективного и терапевтического средства для регенерации печени.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Chalenko Y., **Kalinin E.**, Marchenkov V., Sysolyatina E., Surin A., Sobyenin and Ermolaeva S.. Phylogenetically Defined Isoforms of *Listeria monocytogenes* Invasion Factor InlB Differently Activate Intracellular Signaling Pathways and Interact with the Receptor gC1q-R// International journal of molecular sciences. 2019. – V. 20. - № 17, doi: 10.3390/ijms20174138
2. Chalenko Y., Sobyenin K., Sysolyatina E., Midiber K., **Kalinin E.**, Lavrikova A., Mikhaleva L. and Ermolaeva S. Hepatoprotective activity of InlB321/15, the HGFR ligand of bacterial origin, in CCl4-induced acute liver injury mice Biomedicines – 2019. – V. 7. – №. 2. – p. 29. doi: 10.3390/biomedicines7020029
3. **Kalinin, E. V.**, Chalenko, Y. M., Sysolyatina, E. V., Midiber, K. Y., Gusarov, A. M., Kechko, O. I., Kulikova, A. A., Mikhaleva, L. M., Mukhachev, A. Y., Stanishevskiy, Y. M., Mitkevich, V. A., Sobyenin, K. A., & Ermolaeva, S. A. Bacterial hepatocyte growth factor receptor agonist stimulates hepatocyte proliferation and accelerates liver regeneration in a partial hepatectomy rat model. Drug Development Research. – 2021. – V. 82. – №. 1. – pp. 123-132.
4. **Kalinin E.**, Chalenko Y., Kezimana P., Stanishevskiy Y., Ermolaeva S. Combination of growth conditions and InlB-specific dot-immunoassay for rapid detection of *Listeria monocytogenes* in raw milk //Journal of Dairy Science. – 2023. – V. 106. – №. 3. – pp. 1638-1649.
5. **Калинин Е.В.**, Чаленко Я.М., Сафарова П.В., Федорова В.А., Ермолаева С.А. Анализ уровня продукции факторов инвазии InlA и InlB у изолятов *Listeria monocytogenes*, выделенных на территории Российской Федерации//Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2023. – Т. 100. – №. 5. – С. 276-286.
6. Патент: Рекомбинантный интерналин в 321, полученный с помощью штамма *Escherichia coli* Ермолаева С.А., Сысолятина Е.В., Чаленко Я.М., **Калинин Е.В.**, Собынин К.А. RU 2688422 С1, 21.05.2019. Заявка № 2018121083 от 07.06.2018.
7. Патент: «Способ дифференциации *Listeria monocytogenes* от других видов *Listeria spp.* методом дот-блоттинга с использованием конъюгированных антител против фактора патогенности InlB» **Калинин Е. В.**, Чаленко Я. М. Ермолаева С. А. RU 2812147 С1, 23.01.2024 Заявка № 2023109311/10 от 12.04.2023