

**федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный исследовательский центр эпидемиологии и
микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России)**

На правах рукописи

Калинин Егор Валерьевич

**БИОМЕДИЦИНСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ФАКТОРА ПАТОГЕННОСТИ
LISTERIA MONOCYTOGENES INLB**

1.5.11. Микробиология (биологические науки)

1.5.6. Биотехнология (биологические науки)

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук.

Научные руководители: д.б.н. Ермолаева С.А.

д.х.н. Станишевский Я. М.

Москва 2024

Оглавление

Введение.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1. <i>Listeria monocytogenes</i> как пищевой патоген: свойства, распространение и способы идентификации	13
1.2. Методы детекции и идентификации <i>L. monocytogenes</i>	17
1.3 Обнаружение <i>L. monocytogenes</i> с использованием антител.	23
1.4. Биология <i>L. monocytogenes</i> и факторы патогенности. Роль рецепторных взаимодействий в вирулентности листерий.....	26
1.5 InlB и другие факторы инвазии <i>L. monocytogenes</i>	30
1.6. InlB и другие бактериальные агонисты клеточных рецепторов факторов роста.....	36
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	44
2.1. Материалы	44
2.2. Микробиологические методы.....	49
2.2.1. Условия культивирования.....	49
2.2.2. Подготовка образцов бактериальных культур к иммуноферментному анализу.	49
2.2.3. Активация PrfA регулона.....	50
2.2.4. Приготовление лизатов <i>L. monocytogenes</i> для ПЦР.	50
2.2.5. Приготовление лизата <i>E. coli</i>	50
2.2.6. Экспрессия белков idInlB из культуры <i>E. coli</i> BL21 idInlBpET28b.	50
2.2.7. Дот-иммуноанализ	51
2.2.8. Инокуляция сырого молока	51
2.3. Молекулярно-генетические методы	52
2.3.1. Полимеразная цепная реакция и электрофорез в агарозном геле. ..	52
2.3.2. Очистка белков idInlB из лизата <i>E. coli</i> BL21 idInlBpET28b.....	53
2.3.3. Электрофорез белков в полиакриламидном геле	54
2.3.4. Вестерн-блотинг.....	54
2.3.5. Микротермофорез	54

2.4 Выделение иммуноглобулинов G сыворотки.	55
2.5 Получение конъюгата α -InlB-IgG - пероксидазы хрена.....	55
2.6. Прямой иммуноферментный анализ (ИФА)	56
2.7. Измерение концентрации белков методом Брэдфорда.....	56
3. Биологические методы	57
3.1. Получение гипериммунных сывороток.	57
3.2 МТТ-тест	58
3.3. Иммунофлуоресцентная микроскопия.	58
3.4 Клеточная культура и условия роста	59
3.5 Испытание на острую токсичность CCl_4	59
3.6. Гистологическое исследование срезов печени	60
3.7. Биохимические маркеры	60
3.8. 70% частичная гепатэктомия	60
3.10 Морфометрическое исследование срезов печени.....	61
3.11 Иммуногистохимия.....	62
Статистика	63
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	64
I часть. Получение и характеристика рекомбинантных белков idInlB	64
1.1. Очистка рекомбинантных белков idInlB.	64
1.2 Физико-химические свойства изоформ idInlB.....	72
II часть. Получение антител против очищенного препарата idInlB.	74
III часть. Оценка экспрессии InlB на поверхности клеток у изолятов <i>L. monocytogenes</i> , относящихся к разным клональным группам.	77
IV часть. Потенциал InlB как видоспецифического маркера <i>L. monocytogenes</i>	80
4.1. Разработка способа идентификации <i>L. monocytogenes</i> на основе специфического дот-иммуноанализа.	80
4.2. Обнаружение <i>L. monocytogenes</i> с помощью дот-иммуноанализа в смешанной культуре	84
4.3. Применение разработанного дот-иммуноанализа для выявления <i>L. monocytogenes</i> в сыром молоке.....	86
V часть. Свойства idInlB как лиганда человеческих рецепторов.	89

5.1. Константы связывания изоформ idInlB с рецепторами c-met и gC1q-R.	89
5.2. Особенности взаимодействие изоформ idInlB с рецептором gCq1-R... 90	90
5.3 Влияние рекомбинантных изоформ idInlB на внутриклеточные процессы в эпителиальных клетках.	92
VI. Терапевтические применения idInlB _{CC1}	94
6.1. Митогенная активность IdInlB _{CC1} <i>in vitro</i>	94
6.2. idInlB _{CC1} -стимулированная активация сигнального пути MAPK- и PI3K/Akt <i>in vitro</i>	95
6.3. Оценка токсичности idInlB _{CC1} у мышей	97
6.4 Гепатопротективная активность IdInlB _{CC1}	99
6.5. Регенеративный потенциал idInlB _{CC1} <i>in vivo</i> на модели 70% частичной гепатэктомии.	102
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ	107
ВЫВОДЫ.....	117
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	119
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	120

Введение

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 сальмонеллезу, но значительно превосходит по тяжести клинического течения и частоте летальных исходов: смертность от листериоза достигает 30% среди госпитализированных пациентов [118]. 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%)[56], 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, биотехнологический потенциал использования белка листерий InlB не ограничивается его специфическими серологическими свойствами. Было установлено, что в ходе процесса инфекции белок *L. monocytogenes* InlB специфически связывается с тирозин-киназным рецептором фактора роста гепатоцитов HGFR (hepatocyte growth factor recеptor, более известным как c-Met), находящимся на поверхности гепатоцитов, эпителиальных клеток и некоторых других клеток человека.

Существует также второй рецептор, с которым связывается InlB – рецептор системы комплемента gC1qR [19]. Основная мишень этого рецептора – белок системы комплемента Gc1q, однако помимо этого белка gC1qR 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, увеличению подвижности и повышению клеточной жизнеспособности. По сути, InlB является функциональным гомологом физиологического лиганда рецептора HGFR – растворимого белка, известного как фактор роста гепатоцитов HGF ((hepatocyte growth factor). Фактору роста

гепатоцитов HGF принадлежит ключевая роль в процессах регенерация 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 тем, что 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 [74, 78, 136]. Производство в этих клетках является дорогостоящим и сложным из-за высокой стоимости питательных сред, низкой толерантности клеток к изменениям условий реакции и медленных темпов роста [106]. 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 используются для синтеза гетерологичных бактериальных белков.

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 ускорения 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 [23].

В связи с вышесказанными 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 получения поликлональных антител, специфичных к idInlB. С использованием полученных антител к idInlB, разработан метод дот-блоттинга для выявления и идентификации *L. monocytogenes*, для которой доказаны высокая специфичность и чувствительность (1 КОЕ в 1 мл молока). Разработанная способ может быть использован для выявления и идентификации *L. monocytogenes* в пищевых продуктах. На метод 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 гепатэктомии.

Методология и методы исследования

Методологией исследования является экспериментальная работа по гетерологичной экспрессии, очистке и анализу свойств белков *L. monocytogenes*, получению антител и изучению их характеристик, анализ штаммов *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 гепатэктомии и химическом повреждении, при этом гепатопротекторная и пролиферативная активность использованного бактериального белка idInlB_{СС1} сравнима с активностью физиологического лиганда рецептора с-Met HGF.

Личный вклад автора

Разделы: получение и очистка рекомбинантного белка idInlB, оценка продукции InlB у изолятов *L. monocytogenes*, 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: FEMS Conference on Microbiology 2020, DGHM&VAAM 2020, Российский микробиологический конгресс 2021, Ломоносов-2023.

В завершеном виде работа была апробирована и рекомендована к защите 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 9 печатных работах, из них 5 статей в рецензируемых журналах Scopus/WoS и рекомендованных ВАК для публикации защите, все - по результатам экспериментальных исследований, 4 тезиса в сборнике трудов конференции, из них 2 в международных. По результатам исследования получены 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

1.1. *Listeria monocytogenes* как пищевой патоген: свойства, распространение и способы идентификации.

Listeria monocytogenes (*L. monocytogenes*) – один из патогенов пищевого происхождения. Инфицирование бактерией вызывает заболевание – листериоз, который может приводить к летальному исходу для человека. Доля смертности составляет порядка 19 % от общей смертности основных пищевых патогенов, представляющих значительную медицинскую и общественную угрозу [57, 122]. Вид *L. monocytogenes* широко распространен в различных пищевых продуктах и источниках окружающей среды [111]. Грамположительные неспорообразующие бактерии рода листерий включают патогенные для человека и животных *L. monocytogenes*; только для животных – *L. ivanovii* и 19 видов непатогенных, в числе которых самый близкий к *L. monocytogenes* сапрофитический вид *L. innocua* [33, 48, 61, 66]. Большинство представителей рода *Listeria*, включая *L. monocytogenes* широко распространены в окружающей среде, включая почву, воду, растения, сточные воды, корма для животных и среда пищевых производств.

Метод MLST (Multilocus sequence typing, типирование на основе мультилокусных последовательностей), основанный на секвенировании семи генов домашнего хозяйства, позволил проводить объединение генетически близких штаммов в группы – клональные комплексы (CC).

При помощи метода MLST было показано, что:

1) вид *L. monocytogenes* образует структурированную популяцию, состоящую из четырех филогенетических линий (I–IV);

2) Каждая линия включает определенные серотипы: линия I включает серотипы 1/2b, 3b, 4b, 4e и 7; линия II, серотипы 1/2a, 1/2 c, 3a и 3 c; линия III, серотипы 4b, 1/2a, 4a и 4 c; и линия IV, 4a и 4c [112, 119]. Хотя большинство

клинически значимых штаммов принадлежат к линиям I и II, основные эпидемии листериоза связаны с изолятами линии I, а именно с серотипом 4b [69, 97, 98]. Линия II (серотипы 1/2a, 1/2b и 1/2 c) чаще встречается в пищевых продуктах [58, 98]. Линии III и IV выделяются редко, и преимущественно изоляты выделяются из животных.

Для обеспечения воспроизводимости экспериментов в лабораториях большинство исследований, посвященных патогенности *L. monocytogenes*, были проведены с типовыми штаммами: EGD_e, EGD или 10403S. Эти штаммы принадлежат к филогенетической линии II (EGD и 10403S к клональному комплексу CC7 и EGD_e к CC9). Постоянное использование этих типовых штаммов CC7 и CC9 привело к недооценке общего биоразнообразия *L. monocytogenes* и, как следствие, гетерогенности, которая может существовать в механизмах вирулентности, используемых штаммами линий I и II [35]. Клональные комплексы CC1, CC2, CC4 и CC6 связаны с клиническими случаями у людей. Эти данные свидетельствуют о том, что перечисленные клональные комплексы являются гипервирулентными, в то время как другие, такие как CC9 и CC121, принадлежащие к линии II, связаны с пищевыми источниками.

Клональные комплексы, связанные со случаями заболевания людей, относят к гипервирулентным и штаммы из данной группы часто обнаруживают в молочных продуктах. С другой стороны, менее вирулентные клональные комплексы, CC9 и CC121, часто обнаруживают в мясных продуктах [105]. Гипервирулентные штаммы лучше колонизируют кишечник и демонстрируют более высокую скорость инвазии слизистой оболочки кишечника, чем гиповирулентные. И наоборот, гиповирулентные клоны хорошо адаптируются к условиям пищевой среды, с более высокой распространенностью генов, участвующих в устойчивости к стрессу и толерантности к дезинфицирующим средствам. Из домашних животных листериоз чаще всего встречается у жвачных. Интересно, что CC1 (который

связан с клиническими случаями у людей) также ассоциируется со случаями ромбэнцефалита жвачных животных и широко представлен в продуктах, полученных из молока. Эти данные свидетельствуют о том, что вирулентность *L. monocytogenes* у людей может быть связана с его способностью вызывать заболевания у жвачных животных [65].

Вызываемое *L. monocytogenes* заболевание, листериоз, приводит к тяжелой инфекции у животных и людей. Хотя при исследованиях пищевых продуктов *L. monocytogenes* обнаруживают не часто, однако летальность в случае поражения людей из группы риска может достигать 30%. К группе риска относят беременных женщин, пожилых и иммунодефицитных людей. При этом листериоз трудно диагностировать в связи с тем, что симптомы крайне разнообразны и могут быть характерны для других заболеваний.

Начиная с восьмидесятых годов прошлого века в странах Европы и Америки произошли многочисленные вспышки листериоза у людей, характеризующиеся тяжелым течением болезни и высокой смертностью. Первый точно установленный случай массового заболевания был зафиксирован в 1981 году в Канаде [124]. В результате чего пострадал 41 человек. Причиной отравления стал салат из сырой белокочанной капусты. Вспышка листериоза в 1983 году в Массачусетсе (США) была связана с употреблением пастеризованного молока [47]. Последующие вспышки листериоза в Америке и Швейцарии с 1983 по 1987 год были связаны с употреблением мягких сыров [115]. Таким образом, контаминацией *L. monocytogenes* подвержены различные пищевые продукты.

Следует отметить, что существуют и другие пути передачи листериоза, но большинство случаев заболевания связано именно с употреблением контаминированных продуктов питания. Однако, инкубационный период листериоза составляет несколько недель при отсутствии типичных симптомов

пищевых инфекций, что и вызывает трудности с определением конкретного источника распространения заболевания.

В масштабном исследовании, проведенном в Великобритании, из 18337 образцов пищевых продуктов в 1159 были обнаружены *L. monocytogenes*, в их числе молоко, мороженое, мягкий сыр, сырое мясо и овощи, салаты, рыба, а также готовая к употреблению продукция [127].

Основная причина заражения пищевых продуктов связана с контаминацией после их обработки. *L. monocytogenes* может расти при температуре + 4 °С, также относительно устойчива к повышенным концентрациям соли и способна выживать в течение длительного периода времени. Эти свойства вызывают определенную настороженность в отношении охлажденных продуктов с увеличенным сроком годности. *L. monocytogenes* способна размножаться в больших количествах за небольшой промежуток времени, в особенности в пищевых продуктах со значением рН более 5.

В экономически развитых странах на сегодняшний день проводят наблюдения за случаями заболевания листериозом [117, 150]. По статистике чаще всего листериоз регистрируется у новорожденных детей до 1 месяца и у взрослых старше 60 лет. Заражение листериями беременных женщин (30 % всех случаев) часто приводит к мертворождению и выкидышам из прохождения бактерией плацентарного барьера. Кроме того, известно, что листериоз встречается примерно в 4 раза чаще у женщин, чем у мужчин. Согласно исследованиям в США, около 11% всех домашних продуктов контаминированы листериями [38].

Было показано, что штаммы тесно связаны с эпидемическим клоном ЕС1, который ответственен за ряд временных и географически различных вспышек листериоза в Северной Америке и Европе. Также зафиксированы случаи листериоза у плода и матери в России [2].

Таким образом, несмотря на большое количество собранных данных как о самой бактерии, так и о способах распространения заболевания, листериоз как болезнь человека остается опасным и трудно диагностируемым заболеванием, главным путем передачи которого являются продукты питания.

1.2. Методы детекции и идентификации *L. monocytogenes*

В последние десятилетия разработаны различные методики обнаружения, характеристики и подтипирования *L. monocytogenes* в пищевых продуктах и источниках окружающей среды [1, 8, 33, 61].

Хотя не существует идеального метода обнаружения листерий (или любого анализируемого вещества), рассмотрение характеристик, которыми должна обладать такая система, может быть полезным при оценке существующих методов или при разработке новых. Идеальным методом обнаружения являлся бы:

- 1) специфичный для целевого анализируемого микроорганизма (*Listeria* или *L. monocytogenes*),
- 2) чувствительный (способен обнаруживать 1 КОЕ в образце массой 25 г),
- 3) быстрый (значительно менее затратный, чем методы культивирования), воспроизводимый,
- 4) простой в использовании (с легко интерпретируемыми результатами),
- 5) способный различать живые и мертвые клетки,
- 6) недорогой (по сравнению с затратами, связанными с традиционными методами обнаружения),

7) проверенный на соответствие стандартным методам, автоматизируемый и масштабируемый в соответствии с потребностями тестирования.

Хотя ни один метод не удовлетворяет всем этим критериям, производители продуктов питания могут определить, какие характеристики идеального метода требуются для их конкретных потребностей в тестировании, и выбрать доступный метод, который наилучшим образом соответствует этим потребностям.

Культуральные методы обнаружения листерий ограничены в первую очередь их высокими требованиями ко времени и трудозатратам [12, 39, 108]. Примером является, оригинальный метод холодного обогащения, описанный Греем и коллегами [59], в котором использовали инкубационные периоды от нескольких недель до месяцев, что явно противоречит сегодняшним быстрым темпам обработки и распределения пищевых продуктов. С тех пор для обнаружения стало доступно большое разнообразие бульонов и агаров селективного обогащения листерий или для дифференциации *L. monocytogenes* от других представителей рода [12, 26]. Были описаны дополнительные составы для восстановления термически или химически поврежденных листерий [37, 139]. Тем не менее, для культуральных методов обнаружения обычно требуется по меньшей мере четыре последовательных этапа:

1. предварительное обогащение;
2. селективное обогащение;
3. селективный отбор
4. биохимический скрининг

Многочисленные сходства с *L. innocua* и другими непатогенными видами листерий затрудняют обнаружение *L. monocytogenes* в образцах

пищевых продуктов. Селективные среды, такие как PALCAM-агар или Оксфорд-агар, поддерживают рост не только *L. monocytogenes*, но и других видов листерий и некоторых других родов бактерий [133, 149]. Сопутствующие микроорганизмы из образцов пищевых продуктов могут повлиять на низкое количество *L. monocytogenes*, что накладывает ограничения на хромогенные среды, такие как ALOA-агар, которые обеспечивают прямую дифференциацию *L. monocytogenes* от других листерий [133].

В результате всех манипуляций положительное обнаружение листерий в образцах пищи или окружающей среды только с использованием культуральных методов может занимать до 5-7 дней [109].

Если исходить из времени, необходимое для культурных методов в качестве ориентира, быстрый метод можно определить как любой подход, дающий сопоставимые результаты за меньшее время. Потенциальные преимущества быстрых методов включают снижение вероятности того, что загрязненный продукт будет выпущен на продажу, снижение затрат, связанных с использованием среды, рабочей силы или хранением продукта в ожидании результатов микробиологических исследований. Способность быстро обнаруживать листерии в пищевых продуктах и в среде пищевой промышленности также может обеспечить более своевременный мониторинг критических контрольных точек, способствуя контролю *L. monocytogenes* в этих средах и, в конечном счете, заболеваемости [155, 156].

Преимущества коммерчески наборов или систем экспресс-тестирования включают доступность тестов, стандартизацию, независимую валидацию, простоту, экономичность и доступность технической поддержки [108]. В продаже имеются тест-наборы и системы для быстрого выявления как типичных *Listeria*, так и *L. monocytogenes*. Форматы анализа включают колориметрический ДНК-зонд, латексный проточный иммуноанализ на

основе латексных шариков, иммуноферментный анализ (ИФА), иммунофлуоресцентный анализ, иммуномагнитное разделение (ИМР), флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) и полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Большинство методов требуют селективного обогащения в течение 48 часов. Одно из исключений – методы, основанные на ИМР, которые могут быть использованы для селективного концентрирования *L. monocytogenes* из образца без этапа обогащения.

Недостатком многих форматов экспресс-анализа является то, что они относительно сложны и могут включать повторяющиеся этапы, что может привести к снижению работоспособности оператора и ошибкам. При этом ряд быстрых методов поддается автоматизации. Преимущества автоматизации анализа включают снижение трудоемкости, увеличение производительности, лучшую воспроизводимость и более быстрое получение результатов [30, 60, 109]. Автоматизированные методы, описанные для быстрого обнаружения или определения характеристик листерий, включают иммуноферментный анализ, использование ДНК- или РНК-зондов, риботипирование, биохимический скрининг и импедансный тест [22, 46, 64, 73, 91, 100, 108, 113, 134, 144].

Для получения достоверных результатов необходимо выбрать диагностическую мишень. Диагностической мишенью является любая уникальная молекула, обнаружение которой сигнализирует о наличии определенного организма в образце. Потенциальные диагностические мишени для *Listeria* или *L. monocytogenes* включают эволюционно различные последовательности нуклеиновых кислот, обнаруженные в рРНК, мРНК или хромосомной ДНК. Дополнительные мишени могут включать структурные компоненты, такие как жгутиковые, соматические или капсульные антигены, или белковые факторы вирулентности, такие как β -гемолизин или фосфолипаза С [118, 151, 157, 163]. Присутствие этих мишеней может быть обнаружено с использованием ряда методов, включая ПЦР, гибридизацию

ДНК или РНК, иммунологические методы, или фенотипически, с использованием диагностических сред.

Однако для того, чтобы метод был диагностически значим, мишень должна быть уникальной только в пределах определенной экологической ниши. При необходимости микроорганизмы, которые потенциально могут привести к ложноположительным результатам, также могут быть исключены из образца перед тестированием с использованием селективного обогащения. При выборе диагностической мишени необходимо выявить любые потенциальные подводные камни, связанные с ее использованием. Например, экспрессия диагностических эпитопов может зависеть от среды, используемой для выращивания клетки, а мРНК фактора вирулентности могут экспрессироваться только при определенных температурах.

Наличие полных последовательностей генома *L. monocytogenes* (серотипы 1/2a, 4b, 6a) и *L. innocua* дало новое представление о молекулярных особенностях, способствующих патогенезу *L. monocytogenes* [46, 112, 141]. В дополнение к обеспечению более глубокого понимания патогенеза *L. monocytogenes*, эти результаты могут также дать новые диагностические мишени для обнаружения этого организма. Для обнаружения *L. monocytogenes* и других видов *Listeria* доступно несколько подходов на основе нуклеиновых кислот, включая те, которые основаны на амплификации, например лигазная цепная реакция, амплификация на основе последовательности нуклеиновых кислот (NASBA) и ПЦР [12].

ПЦР обеспечивает метод экспоненциальной амплификации специфических последовательностей ДНК, присутствующих в образце. Ошибки, которые могут повлиять на специфичность конечного теста, могут быть допущены на различных этапах разработки ПЦР-анализа. К ним относятся неточности в исходных последовательностях, используемых для выравнивания при разработке праймера, и использование неправильно

идентифицированных эталонных штаммов для проверки эффективности анализа [6]. Кроме того, последовательности-мишени должны быть тщательно подобраны, чтобы гарантировать, что они присутствуют только в группе, подлежащей обнаружению [83, 108]. Специфичность праймера также должна быть подтверждена экспериментально на обширной панели хорошо охарактеризованных эталонных штаммов, состоящих как из целевых, так и нецелевых организмы [7, 108]. Пищевые продукты содержат ряд компонентов, которые могут повлиять на реакцию ПЦР. Эти ингибиторы ПЦР включают белки, жиры, полифенольные соединения, нуклеазы, разрушающие мишени или праймеры, и ингибиторы Mg^{2+} [108, 123]. Кроме того, некоторые компоненты селективных сред, используемых для обогащения на листерии, также могут обладать ингибирующей активностью, включая акрифлавин, соли желчных кислот, эскулин и цитрат трехвалентного аммония [123]. Для того чтобы устранить мешающие факторы помимо разведения, используются центрифугирование, фильтрацию, иммуномагнитный захват клеток-мишеней, адсорбцию клеток на гидроксиапатите или гидроксидах металлов, поверхностную адгезию клеток к поликарбонатным мембранам, осаждение ДНК.

ПЦР на сегодняшний день является наиболее широко используемым методом выявления листерий, в частности *L. monocytogenes*, о чем говорит большое количество работ за последнее время на данную тематику [6, 20, 27, 84, 130, 135]. Когда-то используемый лишь небольшой группе специализированных лабораторий, данный подход стал доступен для гораздо большему числу пользователей. Факторы, способствующие дальнейшему внедрению ПЦР в основную среду тестирования, включают коммерческую доступность реагентов и возможность обнаружения в автоматическом режиме, что устраняет необходимость в трудоемких этапах обработки после амплификации. Тем не менее, существуют некоторые препятствия для рутинного внедрения ПЦР, включая относительно высокую стоимость

оборудования и отсутствие стандартизированных и валидированных методов ПЦР в пищевых продуктах [94].

1.3 Обнаружение *L. monocytogenes* с использованием антител.

Поскольку штаммы *L. monocytogenes* содержат специфические поверхностные белки, в том числе соматические (О)- и жгутиковые (Н)-антигены, их можно обнаружить с помощью индивидуальных и/или комбинаций антител против этих антигенов.

На сегодняшний день в медицинской практике широкое применение нашли иммунохимические методы анализа, используемые для определения самых разных физиологически активных веществ и объектов – от низкомолекулярных регуляторов метаболизма до маркеров раковых клеток и патогенных микроорганизмов. Уникальная специфичность реакции антиген – антитело позволяет достоверно выявлять индивидуальные соединения в биопробах сложного состава, не прибегая к их предварительной обработке и функционированию.

Антитела используются в качестве реагентов для детекции с 1960-х годов [159] и в последнее время успешно используются для обнаружения патогенных бактерий, обладая при этом хорошей чувствительностью [88].

Стандартный сэндвич-иммуоферментный анализ, предназначенный для выявления *L. monocytogenes*, обычно включает формирование иммунного комплекса между иммобилизованным первичным антителом, мишенью *L. monocytogenes*, и меченым вторичным антителом. Первичные антитела изначально иммобилизованы на поверхностях сфер, например, частицы золота, магнитные шарики, кремнезем, поверхности полистирола или непосредственно на поверхности датчиков.

Работы по созданию моноклональных антител к листериям начались с 80-х годов [13, 44, 99, 166]. Однако ни одни из данных моноклональных антител, о которых сообщалось, не являются специфичным для штаммов *L. monocytogenes*, за исключением em-7G1, описанного Bhunia & Johnson [13].

Работа Lin [85] одна из первых по созданию моноклональных антител к *L. monocytogenes*, а именно к серотипу 4b, на долю которого приходится около 40% случаев заражения листериозом.

Для обнаружения *L. monocytogenes* были разработаны несколько иммуноферментных систем. Например, Gangar et al. [54] сообщили о совместной оценке Listeria-TekELISA для выявления *L. monocytogenes* и других видах рода *Listeria* в образцах пищи. Позже, результаты VIDAS были подтверждены совместными исследованиями, проведенными в 19 лабораториях для выявления листерий в пищевых продуктах. VIDAS LIS сравнивали с американским бактериологическим методом FDA для обнаружения листерий в сыре, зеленой фасоли, мороженом и рыбе, фарше из индейки и ростбифа, которые были естественным образом контаминированы или искусственно инокулированы штаммом *L. monocytogenes* в трех концентрациях. Из 1558 протестированных образцов 935 оказались положительными, в том числе 829 - по VIDAS и 809 - по стандартному методу культивирования. Общие отрицательные коэффициенты для VIDAS-LIS и бактериологического метода культивирования составили 10,3 и 13,5%, соответственно, и 86% совпадения между обоими методами. Это исследование показало, что чувствительность VIDAS-ELISA была значительно выше, чем у АОАС 993.12 при обнаружении листерий в мороженом и метода USDA/FSIS при обнаружении листерий на низком уровне загрязнения в сырой индейке. Положительные результаты рассматриваются как предполагаемые и нуждаются в дальнейшем подтверждении путем выделения и идентификации листерий из обогащенной среды.

Одним из преимуществ иммуноанализов является то, что они могут выполняться в мультиплексных форматах и, таким образом это позволяет сократить время анализа, уменьшить количество используемых реагентов и затраты на обнаружение нескольких патогенов пищевого происхождения. Например, Magliulo et al [93] применили сэндвич-ИФА для одновременного обнаружения *L. monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *E. coli* O157:H7 и *Yersinia enterocolitica* с четырьмя моноклональными антителами, специфичными для этих бактерий, одновременно иммобилизованных в 96-луночной планшете. Уровень чувствительности для этих бактерий варьировался от 10^4 до 10^5 КОЕ/мл.

Однако имеются ряд недостатков связанных с иммуноанализом. Один из них заключается в том, что они менее чувствительны, так как их чувствительность обычно находится в диапазоне от 10^5 до 10^6 КОЕ/мл. Другие недостатки связаны с перекрестной реактивностью антител из-за возможного обмена антигенами между близкородственными штаммами, высокой стоимостью производства специфических антител и вариациями уровней экспрессии поверхностных Н - и О-антигенов.

Помимо иммуноферментного анализа антитела находят применение и в иммунофлуоресцентном анализе. Например, Tully E. и др [146]использовали меченные квантовой точкой антитела к белкам клеточной поверхности *L. monocytogenes* интерналин А (InlA) и интерналин В (InlB). Квантовые точки представляют собой нанокристаллические полупроводники, которые проявляют уникальные светоизлучающие свойства, которые могут быть изменены путем изменения размера или состава точек. Они обычно имеют размер 2–8 нм и покрыты слоем органического материала, что позволяет функционализировать поверхность для прикрепления биомолекул [153]. Узкие спектры излучения нанокристаллов дают более резкие цвета и высокое спектральное разрешение, что может улучшить чувствительность анализа [9, 25].

Разработан новый конкурентный иммуноанализ с использованием специфического моноклонального антитела, меченного флуорофором [9]. Синтезирован специфический и высококонсервативный пептид из 11 аминокислот белка р60 *L. monocytogenes*, используемый для получения моноклонального анти-Р60. Тест основан на конкуренции между рекомбинантным протеином р60 и р60 у *L. monocytogenes*, присутствующих в образце. Для иммобилизации был использован рекомбинантный белок р60 и меченые моноклональные антитела, которое связывали р60 из образца. Увеличение сигнала флуоресценции элюата означает положительный результат. При этом у непатогенных видов листерий перекрестная реактивность не наблюдалась. И хотя очевидно, что иммунофлуоресцентный анализ обладает более высокой чувствительностью, чем иммуноферментный, его использование более трудоемко и нуждается в дополнительных реагентах и приборах.

Таким образом, в настоящее время заболевание, вызываемое *L. monocytogenes*, листериоз, остается хоть и редко диагностируемым, но опасным заболеванием, особенно для лиц с ослабленным иммунитетом. К группе риска относятся пожилые люди и беременные женщины. Наиболее характерным путем заражения является алиментарный, через продукты питания, в частности молочные продукты. Чтобы предотвратить риски, связанные с употреблением пищи, контаминированной *L. monocytogenes*, необходимы простые, быстрые и точные методы обнаружения, способные обнаружить характерные для *L. monocytogenes* мишени, а именно факторы патогенности данного микроорганизма.

1.4. Биология *L. monocytogenes* и факторы патогенности. Роль рецепторных взаимодействий в вирулентности листерий.

Исследования, направленные на разгадку механизмов патогенности *L. monocytogenes* и ее взаимодействия с хозяевами на клеточном, молекулярном

и генетическом уровнях, были начаты около четырёх десятилетий назад. Ранние исследования использовали транспозонный мутагенез и заражение первичных и устойчивых клеточных линий, чтобы получить представление о взаимодействии *L. monocytogenes* с эукариотическими клетками-хозяевами. Секвенирование геномов *L. monocytogenes* и *Listeria innocua* вместе с разработкой генетических инструментов позволяет «манипулировать» *L. monocytogenes*, что в совокупности с экспериментами на клеточной культуре и моделями на животных значительно расширили понимание молекулярной и клеточной биологии инфекций *L. monocytogenes*.

В большинстве ранних исследований клеточной биологии инфекций *L. monocytogenes* использовались эпителиоподобные и макрофагоподобные клеточные линии [51, 104, 140]. Макрофаги активно поглощают *L. monocytogenes*, но интернализация бактерии обычно нефагоцитарными клетками инициируется специфичными для *L. monocytogenes* белками.

Не считая стадии интернализации, внутриклеточный жизненный цикл бактерий в фагоцитах или нефагоцитарных клетках млекопитающих, однако, очень похожи. Патоген сначала появляется в вакуоли, которая впоследствии лизируется некоторыми проникшими бактериями, что позволяет *L. monocytogenes* распространиться в цитоплазме.

В то время как большинство бактерий начинают размножаться в цитоплазме, те, которые остаются в фагосоме, погибают и расщепляются. Одновременно с началом внутриклеточной репликации *L. monocytogenes* индуцирует зарождение актиновых нитей хозяина, расположенных в полярном хвосте. Образование хвоста на одном полюсе бактериальной клетки создает движущую силу, которая перемещает бактерии через цитоплазму. Бактерии, которые достигают поверхности инфицированной клетки, индуцируют образование псевдоподоподобных структур с бактерией на кончике и актиновым хвостом позади нее. Эти псевдоподии поглощаются

соседними клетками. Бактерии, попадающие таким образом в соседние клетки, находятся внутри вакуоли, окруженной двойной мембраной, которая впоследствии лизируется для высвобождения бактерий в цитоплазму вновь инфицированной клетки-хозяина. Внутриклеточный жизненный цикл *L. monocytogenes* представлен на рис. 1.

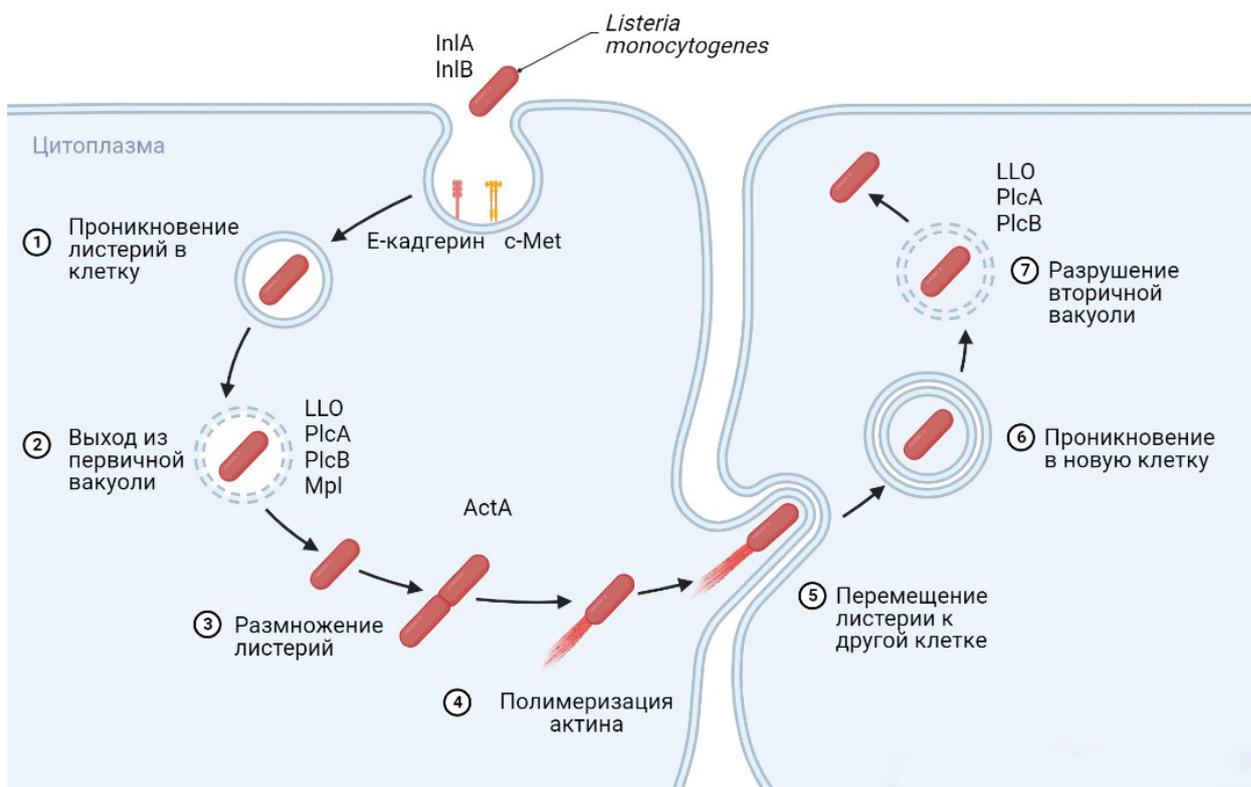


Рис. 1. Жизненный цикл *L. monocytogenes* внутри клетки.

Некоторые из известных генов вирулентности, продукты которых участвуют во внутриклеточном жизненном цикле *L. monocytogenes*, сгруппированы на хромосоме в так называемом PrfA-зависимом кластере генов вирулентности. Кластер включает шесть хорошо охарактеризованных генов: *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* и *plcB* (рис. 2).

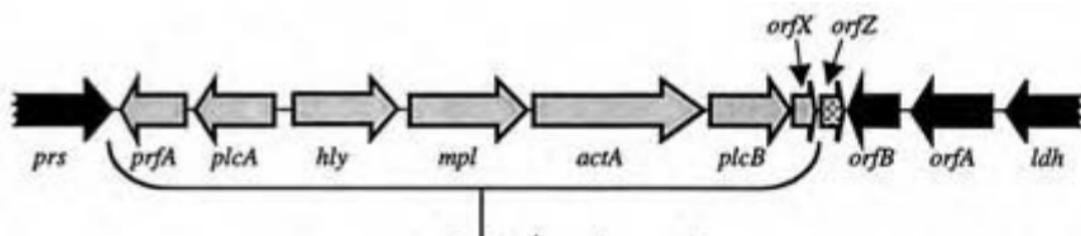


Рис. 2. Организация центрального кластера генов вирулентности *L. monocytogenes*.

Продуктами этих генов вирулентности являются листериолизин (LLO, кодируемый *hly*), фосфатидилинозитол-специфическая фосфолипаза С (PI-PLC, кодируемая *plcA*), фосфатидилхолин-специфическая фосфолипаза С (PC-PLC, кодируемый *plcB*), металлопротеаза (Mpl, кодируемая *mpl*), ActA, белок, участвующий в полимеризации актина (кодируется *actA*) и положительным регуляторным фактором PrfA (кодируется *prfA*). Хорошо изученные интерналин А (InlA) и InlB кодируются опероном *InlAB* [86].

PrfA является единственным регулятором, выявленным на сегодняшний день в отношении *Listeria spp.* который непосредственно участвует в контроле экспрессии генов вирулентности. Этот белок является основным переключателем регулона, включающего большинство известных листериальных генов вирулентности. PrfA принадлежит к семейству факторов транскрипции, которые активируются связыванием кофактора и имеют свою собственную сложную регуляцию, которая действует на транскрипционном, трансляционном и белковом уровнях [80]. Эксперименты, проводимые на протяжении многих лет, показали, что фактор, присутствующий в цитоплазме хозяина может аллостерически активировать PrfA; однако на настоящий момент времени этот кофактор остается неизвестным.

Белок, который кодируется геном *hly*, LLO, секретуемый холестерин-зависимый порообразующий токсин, необходим для выхода *L. monocytogenes* из вакуолей, также секретируется внеклеточными бактериями и вызывает

временный приток внеклеточного кальция в клетки-хозяева, что коррелирует с усилением клеточной инвазии [97]. Деление митохондрий также коррелирует с LLO-зависимым притоком кальция, и было высказано предположение, что *L. monocytogenes* модулирует биоэнергетическое состояние покоящихся клеток, вызывая клеточную инвазию. Сообщалось, что фосфолипаза С широкого спектра действия *L. monocytogenes*, PlcB, индуцирует приток кальция, необходимый для эффективной интернализации бактерий в макрофагах [116].

Модуляция актинового цитоскелета и перестройки плазматической мембраны при взаимодействии *L. monocytogenes* с рецепторами клетки-хозяина приводят к поглощению и интернализации бактерий в мембраносвязанной вакуоли. В других типах клеток *L. monocytogenes* способна разрушать содержащий его компартмент и перемещается в цитоплазму клетки-хозяина. Холестерин-зависимый порообразующий токсин LLO вместе с двумя бактериальными фосфолипазами являются основными бактериальными эффекторами, контролирующими выход *L. monocytogenes* из фагосомы.

1.5 InlB и другие факторы инвазии *L. monocytogenes*

Мутагенез транспозонов и соответствующий анализ инвазии *in vitro* с использованием эпителиальных клеток Caco-2 привели к идентификации интерналина (InlA), поверхностного белка *L. monocytogenes*, который опосредует бактериальную инвазию в эпителиальные клетки [11, 52]. Выявленные мутанты проявляют меньшую инвазивную способность, чем штамм дикого типа, при тестировании на разных клетках. Вставки транспозонов происходят в хромосомной области, которая представляет собой оперон, состоящий из генов *inlA* и *inlB*. Экспрессия *inlA* у *L. innocua*, неинвазивного вида листерий, близкого к *L. monocytogenes*, делает этот вид в некоторой степени инвазивным. Этот эксперимент показывает, что продукт

гена *inlA* необходим и достаточен для опосредования инвазии. С тех пор у *L. monocytogenes* было идентифицировано большое количество гомологов интерналина [28, 53, 82, 114].

Общим для всех интерналинов является элемент из нескольких богатых лейцином повторов с остатками лейцина в фиксированном положении в типичном 22 аминокислотных (aa) единицы. InlA - это кислый белок из 800 аминокислот, который обладает двумя расширенными повторяющимися доменами. Домен А состоит из 15 богатых лейцином повторов, тогда как домен В состоит из 2,5 повторов примерно из 70 аминокислот каждый. Белок InlA имеет типичную N-концевую сигнальную последовательность и якорь клеточной стенки в С-концевой части, содержащий мотив LPXTG, за которым следует гидрофобная область, охватывающая мембрану, состоящая из 20 а. о. и нескольких положительно заряженных аминокислот [81]. Этот дистальный мотив LPXTG, как и аналогичные мотивы в других поверхностных белках, ковалентно связан с пептидогликаном в грамположительных бактериях и отвечает за прикрепление InlA к оболочке бактериальной клетке [34, 55]. Важно отметить, что более 30% изолятов филогенетической линии II (представленных в продуктах питания) содержат преждевременные стоп-кодоны в гене *inlA*, что приводит к ослаблению вирулентности [119].

InlB, белок из 630 аминокислот, также содержит N-концевую сигнальную последовательность, восемь LRR-повторов и три С-концевых модуля GW [107]. Внутренний домен InlB из 321 аминокислоты (idInlB) является минимальной частью InlB, которая взаимодействует с тирозинкиназой c-Met и активирует ее [129]. Тем не менее, InlB представляет собой листериальный поверхностный белок, связанный с бактериальной поверхностью через GW-домены с липотейхоевыми кислотами в клеточной стенке *L. monocytogenes*. Этот тип связи является относительно слабым, поскольку в надосадочной жидкости обнаружено значительное количество InlB [14].

Чтобы получить более глубокое представление о молекулярных деталях InlA- и InlB-опосредованной клеточной инвазии, были получены трехмерные структуры обоих белков на атомном уровне [45, 107]. В InlA и InlB три N-концевые части в каждом белке объединяются, образуя непрерывный интерналиновый домен (id). В этом внутреннем домене центральная область LRR по бокам примыкает усеченный Cap, и иммуноглобулиноподобный домен (рис. 3). Расширенный бета-лист, полученный в результате отличительного слияния LRR и иммуноглобулиноподобных складок, представляет собой адаптируемую вогнутую поверхность взаимодействия, предлагаемую для взаимодействия с соответствующими молекулами рецептора млекопитающих во время инфекции. В случае InlB было показано, что четыре находящиеся на поверхности ароматические аминокислоты вдоль вогнутой поверхности необходимы для инвазии в клетку хозяина и связывания с рецептором Met [45, 148].

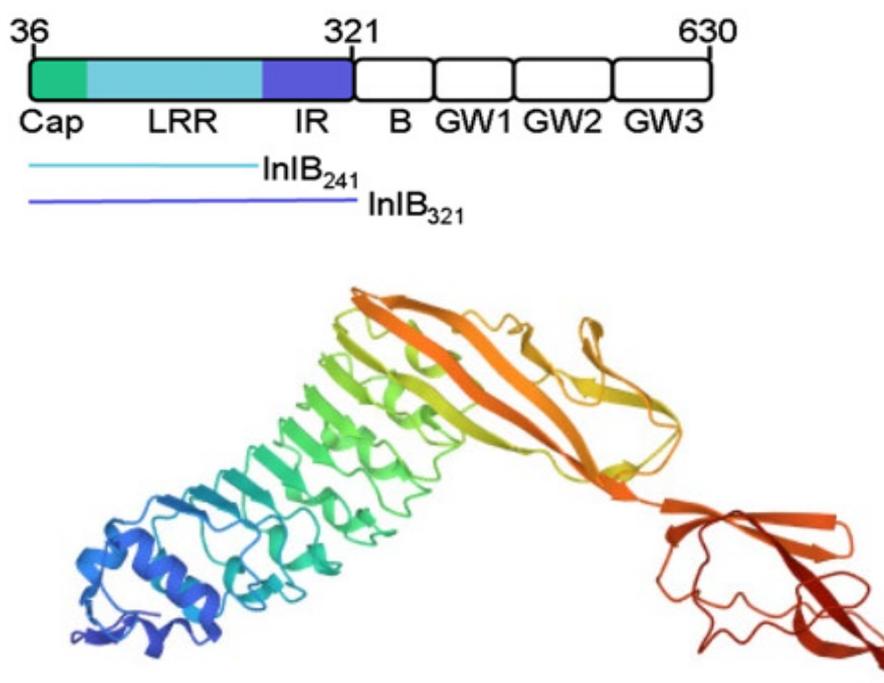


Рис. 3. Структура InlB. Интерналиновый домен показан цветом

Были идентифицированы четыре эукариотических рецептора для InlA и InlB [19, 72, 81, 148]. Человеческий E-кадгерин был идентифицирован как рецептор InlA хроматографическим методом с использованием, связанного с матрицей очищенного InlA для выделения лиганда InlA из белков эпителиальной мембраны. Член семейства кадгеринов, E-кадгерин в основном экспрессируется в базолатеральном участке энтероцитов и является основным компонентом адгезионных соединений, где он соединяет соседние клетки посредством гомофильных взаимодействий своих внеклеточных доменов. Он непосредственно связывает InlA и его местоположение на базолатеральной мембране эпителиальных клеток, что согласуется с предыдущими наблюдениями, предполагающими, что базолатеральная мембрана является местом инвазии для *L. monocytogenes*. Антитела против LRR-области InlA, блокируют проникновение *L. monocytogenes* в клетки, экспрессирующие E-кадгерин, тем самым подчеркивая важность повторяющихся областей InlA для его функции в качестве инвазина.

Первым рецептором InlB, который был обнаружен также с помощью хроматографического подхода, был рецептор gC1q-R. gC1qR - это широко распространенный белок, который также является рецептором для C1q, первого компонента каскада комплемента. gC1qR, белок с молекулярной массой 33 кДа, не проявляет никаких признаков трансмембранного или гликозилфосфатидилинозитол (GPI)-закрепленного белка, что позволяет предположить, что он может действовать совместно с другой молекулой, возможно, трансмембранным белком, для передачи сигналов, необходимых для перестроек цитоскелета и других событий, связанных с проникновением в клетку хозяина. Было продемонстрировано прямое взаимодействие gC1q-R и InlB, а также, что растворимый C1q или антитела против gC1q-R блокируют InlB-опосредованное проникновение *L. monocytogenes* [28].

Тирозинкиназный рецептор c-Met (HGFR) был идентифицирован как второй рецептор InlB, необходимый для InlB-зависимого проникновения *L.*

monocytogenes в различные клетки [14, 45, 129]. Обработка клеток млекопитающих белком InlB или инфекция с *L. monocytogenes* индуцирует быстрое фосфорилирование с-Met, для которого нативным лигандом является фактор роста гепатоцитов (HGF). Подобно HGF, InlB связывается с внеклеточным доменом Met и индуцирует “рассеивание” эпителиальных клеток.

Наконец, глюкозаминогликаны (ГАГ) были идентифицированы как третий тип лиганда InlB. ГАГ присутствуют на поверхности клеток млекопитающих, где они представляют протеогликаны; они способствуют олигомеризации факторов роста, таких как HGF. InlB связывается с ГАГ через свой С-концевые GW-повторы, которые закрепляют белок на поверхности бактериальной клетки. Следовательно, считается, что ГАГ отделяют InlB от поверхности бактерий, что позволяет ему взаимодействовать с рецептором Met в месте контакта *L. monocytogenes* на поверхности клетки-хозяина.

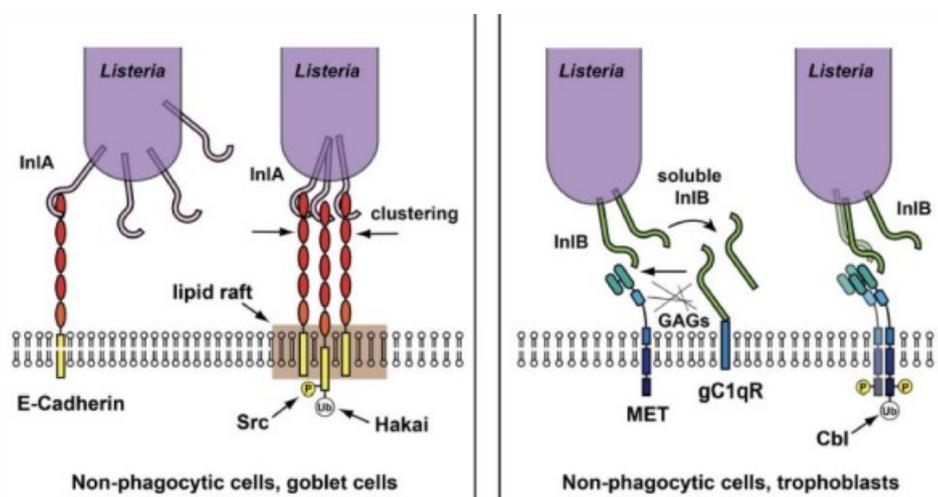


Рис. 4. Инвазия *L. monocytogenes* в непрофессиональные фагоциты через рецепторы E-кадгерин и с-Met.

InlB позволяет *L. monocytogenes* проникать в нефагоцитарные эпителиальные клетки *in vitro*, и взаимодействует с InlA во время инвазии плаценты *in vivo*. У небеременных животных экспрессия InlB связана с увеличением некротических очагов в печени и селезенке. С-концевая область

InlB характеризуется присутствием GW-повторов, которые способствуют свободному связыванию с липотейхоевыми кислотами, связанными с бактериальной мембраной, и связанными с пептидогликаном пристеночными тейхоевыми кислотами. На поверхности клеток-хозяев GW-повторы опосредуют связывание с рецептором глобулярной части компонента комплемента C1q и с гликозаминогликанами. N-концевая область отображает LRR-повторы, которые имеют решающее значение для инвазии клеток и связывают рецептор фактора роста гепатоцитов Met видоспецифичным образом. Экспрессия Met модулируется эпителиальными кератинами, которые способствуют InlB-опосредованной инфекции эпителиальных клеток.

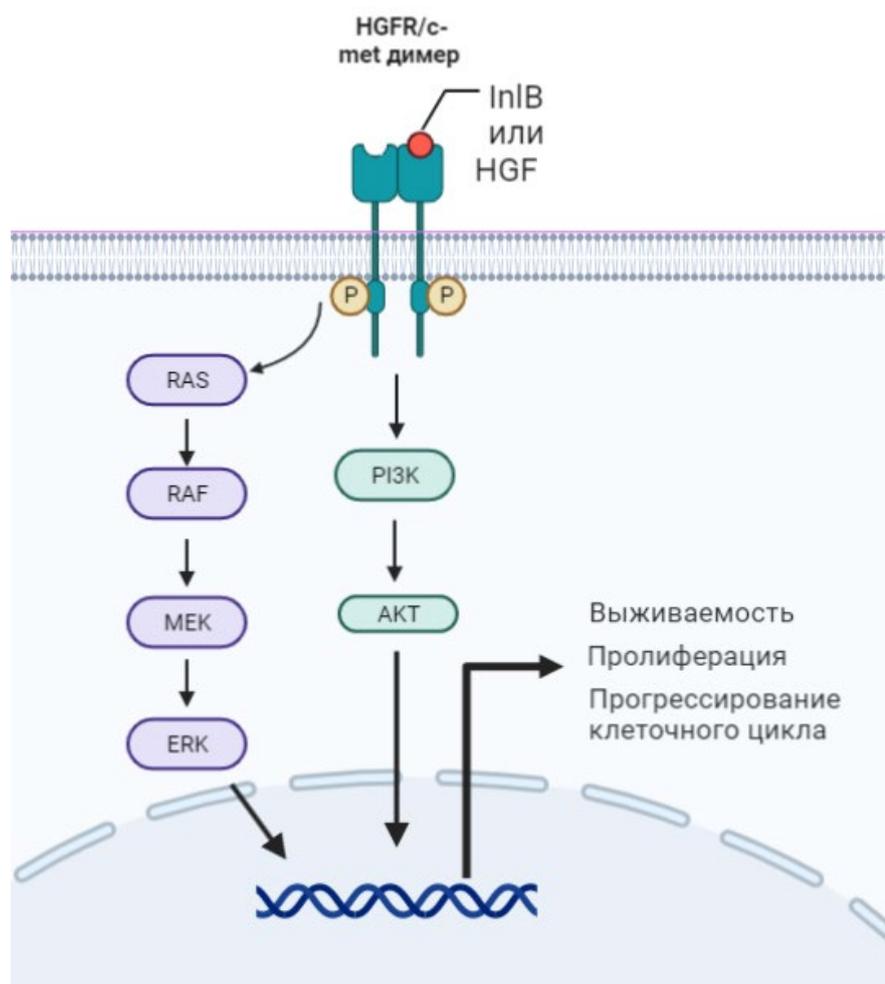


Рис. 5. Сигнальные пути c-Met/HGFR

1.6. InIB и другие бактериальные агонисты клеточных рецепторов факторов роста

Бактериальные токсины специфически распознают свои молекулярные мишени в клетках человека для проникновения патогена в ходе инфекции. В некоторых случаях очищенные токсины могут быть использованы в терапевтических целях, т. е. для специфической модификации когнитивного рецептора и/или его активности. Высокая активность и специфичность токсинов по отношению к их рецепторам-мишеням в сочетании с относительно простыми требованиями к производству вещества делают бактериальные токсины многообещающим инструментом для терапевтических использований [101, 121].

Бинарные бактериальные токсины представляют собой макромолекулярные комплексы, которые в настоящее время находятся в центре внимания терапевтических разработок. Эти белки связываются с поверхностями определенных популяций клеток человека и транспортируют ферменты через мембраны. Фундаментальные исследования охарактеризовали механизмы и структуру бактериальных токсинов таким образом, что белковые домены могут быть "перетасованы" для различных применений. Этот подход доставляет уже охарактеризованный фермент в новые типы клеток, определяемые аффинностью связывания. Выделенные белковые компоненты из холотоксинов также используются в приложениях для доставки лекарств для формирования составных многофункциональных устройств доставки лекарств. Ферментативные домены используются для диагностики и лечения рака, влияния на внутриклеточный транспорт, а также для облегчения боли, вегетативных расстройств, двигательных расстройств, спастичности и ВИЧ. Техническими проблемами в этой области являются иммуногенность, растворимость и стабильность терапевтических слитых белков. Клиническое вмешательство и прогностические вычислительные подходы выявляют, предотвращают и устраняют известную и

прогнозируемую иммуногенность без значительной потери эффективности. Нереализованный медицинский потенциал заключается в богатстве бактериального разнообразия, которое может быть использовано для повторного использования бактериальных токсинов.

Многие *perTox* представляют собой сложные мембраносвязанные белки с высокой растворимостью в воде, способные к целенаправленному молекулярному транспорту в определенные типы клеток человека и внутриклеточные локализации. Методы лечения рака и неврологических расстройств были в центре внимания нескольких клинических испытаний [10, 70], но только два были одобрены для терапевтического применения. Нейротоксин *Clostridium botulinum* серотипов А и В (Ботокс", Диспорт", Ксеомин*, Миоблок*) могут быть очищены непосредственно из микроорганизма и применяются как косметические и терапевтические средства, вызывающие нервно-мышечный паралич. Разработанный интерлейкин-2-дифтерийный токсин (Ontak*) представляет собой внутривенно вводимый противораковый препарат, полученный с помощью рекомбинантной биотехнологии, который сочетает в себе биомолекулярные функции интерлейкина-2 и дифтерийного токсина из *Corynebacterium diphtheria* для таргетной доставки на рецепторы IL-2 на поверхности раковой клетки. После чего проникает в цитоплазму, разрушая жизненно важный фактор трансляции белка. Потенциал этих функционально эффективных бактериальных компонентов еще не полностью реализован в контексте здоровья человека, и может обеспечить множество новых методов лечения и инструментов биомедицинских исследований.

Сообщается также о термостабильном энтеротоксине *Staphylococcus aureus* С2 (SEC2) [49, 158]. Являясь суперантигеном стафилококковый энтеротоксин SEC2 стимулирует высвобождение цитокинов, таких как интерферон-гамма (IFN- γ), интерлейкин-1 (IL-1) и интерлейкин-2 (IL-2), которые, как известно, участвуют в дифференцировке остеобластов. Было

обнаружено, что SEC2 значительно улучшает дифференцировку остеобластов путем усиления регуляции экспрессии BMP2 и Runx2/Cbfa1. В модели перелома бедренной кости у крыс местное введение SEC2 ускорило заживление перелома.

Таким образом, исследования, основанные на взаимодействии бактериальных токсинов с рецепторами в большинстве случаев связаны с их применением в противораковой терапии.

Наибольший интерес вызывают исследования, связанные с применением рецепторов факторов роста. Факторы роста регулируют клеточную пролиферацию, взаимодействуя со специфическими рецепторами клеточной поверхности. Эти рецепторы представляют собой мембранные белки, которые обладают специфическими сайтами связывания лиганда фактора роста. Необычная форма передачи сигналов возникает, когда лиганд взаимодействует со своим рецептором в одной и той же клетке. Например, рецепторы PDGF, присутствующие на внутриклеточной поверхности клеточных линий фибробластов, активируются внутриклеточным лигандом. Этот процесс известен как внутриклеточная передача сигналов. Однако большинство пептидных факторов роста взаимодействуют с рецепторами на разных клетках, регулируя пролиферацию.

Рецепторы фактора роста могут представлять собой одиночные полипептидные цепи, содержащие одну охватывающую мембрану область, такую как рецептор для EGF, или они могут состоять из двух гетеродимеров субъединиц, причем одна субъединица содержит трансмембранный домен, а другая находится внутриклеточно, но ковалентно связана с трансмембранной субъединицей. Гетеродимеры также могут димеризоваться с образованием рецептора состоит из четырех субъединиц (например, рецептора IGF). Связывание лиганда с его рецептором обычно вызывает агрегацию двух или более рецепторов и активацию внутренней активности тирозинкиназы.

Рецепторы фактора роста также обладают способностью к аутофосфорилированию при связывании с лигандом. Кроме того, активность рецепторной тирозинкиназы может фосфорилировать другие внутриклеточные белки, важные для передачи сигнала. Аутофосфорилирование ослабляет киназную активность рецептора и часто приводит к снижению регуляции и интернализации рецептора. Мутация рецептора в его сайте аутофосфорилирования может привести к конститутивной активности рецептора и клеточной трансформации. Рецепторы фактора роста могут связываться с различными внутриклеточными сигнальными путями, включая аденилатциклазу, фосфолипазу C, кальций-кальмодулиновые протеинкиназы, MAP-киназу и ядерные факторы транскрипции. Таким образом, факторы роста играют важную и разнообразную роль в большинстве клеток желудочно-кишечного тракта. Поэтому неудивительно, что мутации в рецепторах фактора роста или нижестоящих сигнальных белках могут приводить к нерегулируемому росту клеток и неоплазии.

Важным действием факторов роста является их способность модулировать экспрессию транскрипционных факторов транскрипции, которые могут регулировать экспрессию многих других генов. Гены раннего ответа, такие как *jun* и *fos*, быстро активируются после связывания лиганда и контролируют экспрессию многих других генов, участвующих в клеточной пролиферации. Другие важные факторы транскрипции включают c-myc и ядерный фактор κB (NF-κB). Последний находится в цитоплазме в неактивной форме и после связывания с лигандом перемещается в ядро, где активирует другие факторы транскрипции. NF-κB является ключевой мишенью для стратегий регуляции клеточной пролиферации и воспаления. В своей фосфорилированной форме Rb-1, первоначально идентифицированный при ретинобластоме, является ингибитором клеточной пролиферации, который образует комплексы с фактором транскрипции p53. Дефосфорилирование Rb-

1 высвобождает p53, который активирует другие гены, приводящие к клеточной пролиферации.

Рецептор Met относится к трансмембранным тирозинкиназным рецепторам (РТК), регулирующие многие важные клеточные процессы, в том числе пролиферацию и дифференциацию. Данный рецептор является продуктом протоонкогена Met и экспрессируется в эпителиальных клетках многих органов, включая печень, поджелудочная железа, почки и красный костный мозг, как во время эмбриогенеза, так и в зрелом возрасте [110].

Рецептор синтезируется из одной цепи предшественника, которая расщепляется путем протеолиза в двухцепочечный (α и β) связанный дисульфидной связью гетеродимер, образуя, таким образом, зрелую молекулу. Лиганды этого рецептора связывается с внеклеточной частью c-Met, которая состоит из трех типов доменов. Sema-домен, состоящий из 500 аминокислотных остатков аминного конца формирует первую часть рецептора. Вторая часть - PSI домен, содержит 50 аминокислот и имеет в структуре 4 дисульфидные связи. Этот домен присоединяется к трансмембранной спирали посредством четырех IPT (immunoglobulin-plexin-transcription) доменов, которых относят иммуноглобулин-подобным доменам. Внутриклеточная часть включает в себя околосмембранную последовательность, обуславливающая отрицательную регуляцию киназной активности, киназный домен, положительно модулирующий киназную активность посредством перекрестного фосфорилирования Tyr1234 и Tyr1235 и мультифункциональный сайт связывания, содержащий два связывающих тирозина 1349 и 1356, которые вызывают набор некоторых белков-адапторов и трансдукторов [142, 143].

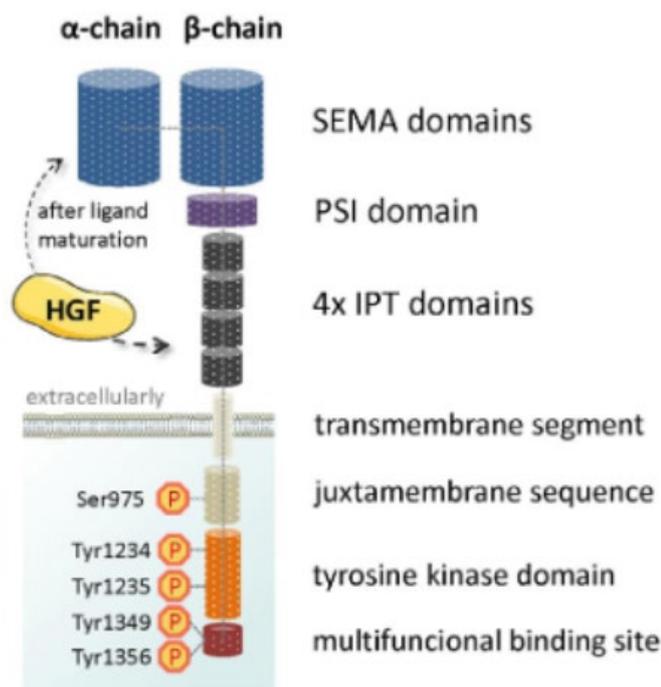


Рис.6. Структура рецептора Met [140]

Met обуславливает клеточное рассеивание, включающее в себя разрушение кадгерина межклеточных контактов и последующей подвижности клеток, которое является одним из ключевых в эмбриогенезе и заживлении ран [32]. Это явление, впервые продемонстрированное с клетками, обработанные природным лигандом Met фактором роста гепатоцитов HGF [165]. Во время эмбриогенеза, функция подвижности Met имеет решающее значение для миграции на большие расстояния скелетно-мышечных клеток-предшественников. Удаление гена *met* или HGF у мышей приводит к полному отсутствию всех групп мышц, полученных из этих клеток [16]. В процессе развития Met и HGF обеспечивают необходимые сигналы для выживания и пролиферации гепатоцитов и плацентарных клеток; вследствие этого, выключение Met или HGF гена (нокаут гена) у эмбрионов показывают заметное снижение размеров печени. А также, к изменению в развитии плаценты у «нокаутных» мышей, обуславливающую гибель этих животных в утробе матери [125, 147].

Активация рецептора происходит, путем, который встречается у большинства тирозинкиназных рецепторов. Связывание соответствующего лиганда приводит к димеризации рецептора, и киназные области двух рецепторов сближаются и активируются за счет перекрестного фосфорилирования по нескольким тирозинам [4]. В случае Met рецептора фосфорилируются два тирозиновых остатка (положение 1234 и 1235), расположенных в пределах каталитической петли тирозинкиназного домена [120]. Далее тирозины 1349 и 1356 в карбоксильном конце становятся фосфорилированными и рекрутируют различные сигнальные эффекторы, включая белковые адапторы GRB2 (Growth factor receptor-bound protein 2), SHC (Src homology-2-containing), CRK (v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homology) и другие. В большинстве случаев они содержат высококонсервативные фосфотирозин-связывающие домены: SH2-домены или РТВ-домены. Эти небольшие домены способствуют связыванию белка-адаптора с активированными RTK и различными внутриклеточными белками [4].

Нижестоящий ответ к активации Met зависит от стереотипных сигнальных модуляторов, являющиеся общими ко многим тирозинкиназным рецепторам. Главные пути – MAPK-каскад (Mitogen activated protein protein kinase), PI3K/Akt-путь, STAT-путь. Приведенные пути направлены на то, чтобы передать информацию от рецептора к ядру, что приводит к изменению экспрессии соответствующих генов.

MAPK-каскадный путь ведет к пролиферации и прогрессированию клеточного цикла. Три компонента этого пути являются протеинкиназами, каждая из которых фосфорилирует последующую, таким образом передавая сигнал дальше к ядру. Последняя киназа Erk непосредственно входит в ядро и активирует факторы транскрипции, обуславливающие регуляцию большого числа генов [15, 137].

Сигнальный путь PI3K/Akt стимулирует выживание и рост клеток посредством серин-треониновой киназы mTOR.

Прямое связывание STAT3 с Met приводит к фосфорилированию STAT3, димеризации и его транслокации к ядру, где действует как транскрипционный фактор, чтобы регулировать гены, отвечающие за клеточную пролиферацию и дифференциацию.

Лигандом для рецептора с-Met являются HGF и InlB. Активация HGFR его собственным лигандом HGF приводит к инициации ряда сигнальных каскадов, которые контролируют клеточную пролиферацию, подвижность и выживание. Показано, что терапия рекомбинантным человеческим HGF (рчHGF) эффективна при регенерации печени, сердца, ран и других органов после острых травм. Было показано, что очищенный InlB ведет себя как функциональный аналог rhHGF и активирует HGFR-зависимые сигнальные пути. InlB специфически взаимодействует с тирозинкиназой с-Met, что приводит к активации с-Met-контролируемых сигнальных путей, включая MAPK-, PI3K/Akt- и STAT-контролируемые каскады [148]. Помимо с-Met, InlB связывает C1q-связывающий рецептор gC1q-R и поверхностные гликозаминогликаны [19]. Было показано, что димерный вариант InlB₃₂₁ (InlB₃₂₁-CD) улучшает заживление ран в скрэтч-тесте на первичных кератиноцитах.

Таким образом, фактор патогенности *L. monocytogenes* InlB с одной стороны является перспективной мишенью для идентификации этой бактерии, так как характерен только для данного вида листерий, с другой стороны, являясь агонистом рецептора фактора роста гепатоцитов, растворимая форма этого белка может быть использована как средство для регенерации тканей.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

В работе использованы штаммы *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* из коллекции НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи, представленные в таблице 1.

Таблица 1. Штаммы бактерий рода *Listeria*

№	Вид	Штамм	Клональный комплекс	Источник	Серовар
1	<i>L. monocytogenes</i>	EGDe	CC9	Типовой штамм	1/2a
2		EGDe Δ inlB	Делеция по <i>inlB</i>	Любезно предоставлен Prof. J. Vazquez-Boland	1/2a
3		VIMHA004	CC1	Абортированный материал	4b
4		VIMHA007	CC2	Абортированный материал	4b
5		VIMHA009	CC1	Абортированный материал	4b
6		VIMHA010	CC1	Абортированный материал	4b
7		VIMHA011	CC1	Абортированный материал	4b
8		VIMHA034	CC7	Абортированный материал	1/2a

9		VIMHA015	CC1	Абортированный материал	4b
10		VIMHA017	CC1	Абортированный материал	4b
11		VIMHA012	CC1	Абортированный материал	4b
12		Lmo25	CC1	Курица	4b
13		Lmo70	CC8	Курица	
14		Lmo78	CC37	Курица	
15		VIMPH006	CC7	Носитель	1/2a
16		L.mo71	CC59	Курица	
17		GIMC2032:Lmc INH-1	CC7	Носитель	1/2a
18		GIMC2007:Lmc IH1_3	CC7	Носитель	1/2a
19		GIMC2010:Lmc UH8	CC7	Носитель	1/2a
20		L.mo84	CC37	Мясо	
21		VIMPA064	CC7	Абортированный материал	1/2a
22		VIMPR134	CC7	Грызун	1/2a
23		766	CC7	Свинья	1/2a
24		VIMPR422	CC7	Грызун	1/2a
25		Lmo129/3	CC9	Молочные продукты	1/2c
26		L.mo49	CC9	Курица	1/2c
27		L.mo75	CC9		1/2c

28		GIMC2035:Lmc 7218	CC9	Рыба	1/2с
29		GIMC2017: Lmc921	CC9	Мясо	1/2с
30		L.mo98-20	CC9	Молочные продукты	1/2с
31		LO28	CC9	Типовой штамм	1/2с
32		1300	CC1	Молочные продукты	4b
33		56-T	CC315	Молочные продукты	4b
34		87014	CC2	Молочные продукты	,4b
35		8712	CC8	Молочные продукты	1/2а
36		114/26	CC37	Молочные продукты	1/2а
37		VIMHA036	CC20	Абортированный материал	1/2а
38	<i>L. innocua</i>	SLCC 3379	-	Типовой штамм	6а
39	<i>L. ivanovii</i>	ATCC 19119	subsp. Ivanovii	Типовой штамм	-
40		NCTC 11846	subsp. Ivanovii	Типовой штамм	-
41	<i>L. welshimeri</i>	ATCC 35897	-	Типовой штамм	6b
42	<i>L. seeligeri</i>	SLCC 5921	-	Типовой штамм	1/2b

Использованные в работе штаммы *E. coli* представлены в таблице 2.

Таблица 2. Штаммы *E. coli*

Штамм	Генетическая характеристика	Источник
JM109	e14- (McrA-) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(rK- mK+) supE44 relA1 (lac-proAB) [F' traD36 proAB lacIqZ M15]	Promega, США
BL21(D E3)	fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHI ΔEcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5	Novagen, США
BL21(D E3)	pET28b-inlBallele13	[24]
BL21(D E3)	pET28b-inlBallele9	[24]
BL21(D E3)	pET28b-inlBallele14	[24]

Иммуноблот и иммуноферментный анализ проводился с использованием коммерческих антител, представленных в таблице 3.

Таблица 3. Антитела, использованные в работе.

Название антитела	Производитель
Donkey anti-Rabbit IgG H&L (HRP)	Абсам, Великобритания

6x-His Tag Monoclonal Antibody (AD1.1.10), HRP	Thermo Scientific, США
6x-His Tag Antibody	Thermo Scientific, США
Anti-gC1qr developed against recombinant protein corresponding to human gC1q-R	Thermo Scientific, США
PA5-14989 specific to aminoacids 76–104 from the central region of human gC1q-R	Thermo Scientific, США
PA5-14988 specific to amino acids 221–249 from the C-terminal region of human GC1qR	Thermo Scientific, США
PA5-55318 поликлональные антитела к gC1qR	Thermo Scientific, США
Anti-pErk ½	Thermo Scientific, США
Anti-pAkt	Thermo Scientific, США

Для проведения ИФА были использованы следующие реактивы

Таблица 4. Реактивы для проведения ИФА

Буфер для иммобилизации	0,1 М Na-карбонатный буфер, pH=9.4.
Отмывающий буфер	500 мМ NaCl, 50 мМ Tris-HCl, pH 7.6
Блокирующий буфер	2% БСА (Amresco, США) в PBS
Раствор для разведения стандартов	Блокирующий буфер с Tween-20 0,05 %
Субстрат	1-Step Ultra TMB-ELISA Substrate Solution (Thermo Scientific, США)

Раствор для остановки реакции	2 М H ₂ SO ₄ (Русхим, Россия)
-------------------------------	---

2.2. Микробиологические методы

2.2.1. Условия культивирования

Все культуры хранили замороженными при -70 °С в 10% глицерине. Перед началом эксперимента из замороженного образца брали стерильной петлей, которую высевали на соответствующий агар.

L. monocytogenes культивировали на сердечно-мозговом агаре (ВНІ, BD), при 37°С. Культивирование *E. coli* проводили на жидкой и твердой питательных средах LB 25 г/л (Amresco, США), содержащая 10 г/л триптона, 5 г/л дрожжевой экстракт, 10 г/л NaCl. Для твердой среды добавляли агар до концентрации 1,5%. Для идентификаций *L. monocytogenes* в молоке образцы высевались на твердую питательную среду PALCAM.

2.2.2. Подготовка образцов бактериальных культур к иммуноферментному анализу.

Для ИФА бактерии выращивали в ВНІ с добавлением 1 % (объем/объем) смолы Amberlite XAD4 (Sigma-Aldrich, США) в течение ночи. Бактерии собирали, промывали и ресуспендировали в PBS до оптической плотности 0,2. Десятичные разведения исходной бактериальной суспензии готовили в PBS. 96-луночные полистирольные планшеты Corner Notch Pierce™ (Thermo Scientific, США) покрывали 100 мкл бактериальных суспензий каждую и инкубировали при +37 °С в течение 1 часа.

2.2.3. Активация PrfA регулона

Для проведения дот-иммуноанализа *L. monocytogenes* выращивались на твердой питательной среде ВНИ, содержащий 0,2% уголь (ВНІС).

При приготовлении образцов для проведения иммуноферментного анализа использовалась жидкая питательная среда, содержащая 1% ионообменную смолу Amberlite XAD4 (Sigma Aldrich, США).

2.2.4. Приготовление лизатов *L. monocytogenes* для ПЦР.

К 45 мкл дистиллированной воды добавляли 5 мкл буфера для ПЦР (ООО «Бионем», Россия), в эту смесь вносили небольшое количество бактерий из одной колонии (со свежей чашки), добавляли лизоцим до концентрации 2мг/мл. Тщательно ресуспендировали до гомогенного состояния. Инкубировали при температуре 37°C 30 минут. Затем вносили 2 мкл протеиназы К в концентрации 20 мг/мл и инкубировали при температуре 56°C 1 час. Смесь кипятили 10 минут. Для ПЦР брали по 1 мкл раствора.

2.2.5. Приготовление лизата *E. coli*

К 45 мкл дистиллированной воды добавляли 5 мкл буфера для ПЦР (ООО «Бионем», Россия), в эту смесь вносили небольшое количество бактерий из одной колонии (со свежей чашки). Смесь кипятили 10 минут.

2.2.6. Экспрессия белков idInlB из культуры *E. coli* BL21 idInlBpET28b

Ночную культуру *E. coli* BL21 idInlBpET28b пересеивали в свежую среду в соотношении 1:100. Рекомбинантные штаммы выращивали в бульоне LB с добавлением 100 мкг/мл канамицина при шутелировании 180 об/мин. После достижения оптической плотности 0,5 добавлялся индуктор ИПТГ (Изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид) до концентрации 1 мМ. После 3

часов бактериальные клетки были сконцентрированы посредством центрифугирования в течение 15 минут при 4200 g. Клетки были ресуспендированы в буфере А (30 мМ имидазола – 150 мМ NaCl – 10 мМ Na₂PO₄, рН 7,4) и разрушали с помощью ультразвука. Остатки клеток осаждали центрифугированием при +4°C. Из клеточных лизатов готовили образцы для разделения белков в полиакриламидном геле. В качестве контроля использовалась культура *E. coli* BL21, несущая плазмидный вектор pET28b без вставки.

2.2.7. Дот-иммуноанализ

Колонии выращивали на чашках с ВНС-агаром в течение 18-24 ч, если не указано иное, а затем отпечатывали на нитроцеллюлозной мембране (Bio-Rad, США). Мембрану высушивали перед погружением в хлороформ на 15 минут для фиксации. Затем мембрану высушивали от остатков хлороформа и инкубировали в течение 30 минут в блокирующем буфере (2% бычьего сывороточного альбумина в PBS) при комнатной температуре. Разработанный конъюгат α -InlB-IgG - HRP разбавляли 1:4000 в TTBS. Высушенную мембрану инкубировали с разбавленным конъюгатом при комнатной температуре в течение часа, используя шейкер со скоростью 150 оборотов в минуту. Мембраны промывали 3 раза, каждый в течение 5 минут с помощью TTBS. Колонии были детектированы с помощью раствора для блоттинга 1-Step™ Ultra TMB (Thermo Fisher Scientific, США). Реакцию останавливали промыванием мембран дистиллированной водой. Изменение цвета от светло- до темно-фиолетового указывало на положительную реакцию и наличие колоний вида *L. monocytogenes*.

2.2.8. Инокуляция сырого молока

Ночную культуру штамма *L. monocytogenes* EGDe концентрировали центрифугированием, промывали и ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (PBS). Суспензию, взятую в концентрации 10⁹ КОЕ/мл в соответствии

со стандартом Макфарланда, разбавляли до 10^3 и 10^4 КОЕ/мл в PBS. Сырое молоко было взято с фермерского рынка в день эксперимента. Бактериальные суспензии смешивали с образцами сырого молока в соотношении 1:9 (бактериальная суспензия: молоко). Образцы были посеяны на агар ВИС. Иммуноферментный анализ проводили, как описано выше. В качестве контроля использовались образцы неинокулированного молока. Перед экспериментом отсутствие в молоке *L. monocytogenes* подтверждалось высевом на среду PALCAM.

2.3. Молекулярно-генетические методы

2.3.1. Полимеразная цепная реакция и электрофорез в агарозном геле.

Приготовление реакционной смеси (25 мкл):

- 16,7 мкл NFW (Nuclease-free Water),
- 2,5 мкл 10-буфера для амплификации,
- 1,5 мкл 0,025 М $MgCl_2$,
- 0,8 мкл 10 мМ dNTP,
- 0,5 мкл 2,5 Ед Taq polymerase,
- 1 мкл 15 пМ праймера InlBF1 (Forward)
- 1 мкл 15 пМ праймера InlBF2 (Reverse)
- 1 мкл ДНК.
- На смесь добавляли минеральное масло в объеме 40 мкл.

ПЦР проводили в термоциклере Терцик (ДНК-технология, Россия) по следующей программе:

Таблица 5. Условия проведения полимеразной цепной реакции.

Шаг	Функция	Температура	Длительность	Число
		а	, мин	циклов
Начальная денатурация	Денатурация	94 °С	3	1
Аmplификация	Денатурация	94 °С	0,5	10
	Отжиг	56 °С	0,5	
	Синтез	72 °С	2	
Завершающий синтез	Синтез (элонгация цепи)	72 °С	5	1

Для того чтобы оценить количество и качество ДНК, а также размер молекул ДНК использовали электрофорез агарозном геле с бромистым этидием в качестве интеркалирующего агента по стандартной методике.

Чтобы подтвердить принадлежность колоний к *L. monocytogenes*, был проведен ПЦР-анализ в реальном времени с использованием коммерческого набора (ДНК-технология) в соответствии с инструкциями производителя на thermocycler QuantStudio 5 (Thermo Scientific). Этапы программы термоциклера были следующими: первый при 80°С в течение 1 мин, 94°С в течение 1 мин, второй (5 раз) при 94°С в течение 30 с, 64°С в течение 15 с и третий (повторяется 45 раз) при 94°С в течение 10 с, 64°С в течение 15 секунд.

2.3.2. Очистка белков idInlB из лизата *E. coli* BL21 idInlBpET28b.

Супернатант наносили на колонку HisTrap™ FF Crude (Sigma Aldrich, США). Колонку промывали 5 объемами буфера А, а затем связанный белок InlB-HisTag элюировали элюирующим буфером (500 мМ имидазола - 150 мМ NaCl - 10 мМ Na₂HPO₄, pH 7,4). Элюированные фракции проверяли с помощью

SDS-PAGE. Очищенный белок подвергали диализу против PBS с использованием диализных кассет Slide-A-Lyzer (ThermoFisher Scientific Inc., США). Конечную концентрацию белка определяли по методу Брэдфорда. Очищенный белок хранили при -20°C.

2.3.3. Электрофорез белков в полиакриламидном геле

Разделение белков проводили методом вертикального гель-электрофореза в полиакриламидном геле с использованием вертикальной электрофорезной камеры BIO-RAD Mini-PROTEAN Tetra Cell («BIO-RAD», США) согласно инструкции производителя. Образцы готовили в 1x Леммли буфере [76]. Электрофорез проводили в электродном буфере: 3 г Tris, 14,4 г глицина, 1 г SDS на 1 литр H₂O. После разделения гели окрашивали красителем R250 в течение 30 минут

2.3.4. Вестерн-блоттинг

L. monocytogenes выращивали в бульоне ВНІ с добавлением 0,2 % угля в течение ночи. Поверхностные белки были получены, как описано ранее [43]. Поверхностные белки отделяли на 10 % SDS-PAGE, переносили на нитроцеллюлозную мембрану и проводили вестерн-блоттинг в буфере TTBS (0,05 % Tween 20- 10 мм Tris HCl, pH 7,5 – 0,15 М NaCl) с кроличьей антисывороткой, разведенной 1:5000. InlB визуализировали с помощью HRP (пероксидазы хрена)-конъюгированных анти-кроличьих антител (Bio Rad) и субстрата ТМВ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин) (Thermo Fisher Scientific).

2.3.5. Микротермофорез

Система NanoTemper [66] использовалась для измерения способности связывания C-met и с idInlB. Варианты idInlB были помечены красителем 2-го поколения RED-tris-NTA (нитрилотриуксусная кислота), который связывается с His-метками в соответствии с протоколом производителя. В

типичном эксперименте MST концентрация меченного RED-трис-NTA idInlB поддерживалась постоянной (50 нМ), в то время как концентрация немеченого C-met варьировалась от 0,076 нМ до 2,5 мкМ в буфере PBST. Образцы загружали в капилляры Monolith NT.115 Premium и проводили MST-анализ с использованием системы Monolith NT.115 (технология NanoTemper, Германия). Мощность светодиода/возбуждения составляла 80-100%, мощность MST - 40%. Анализ данных проводился с использованием программного обеспечения MO.Affinity Analysis v.2.3.

2.4 Выделение иммуноглобулинов G сыворотки.

Для получения специфического иммуносорбента очищенный idInlB иммобилизовали на активированной бромцианом сефарозе ® 4B (Sigma-Aldrich) в соответствии с инструкциями производителя. Гипериммунную сыворотку загружали в подготовленную колонку с иммуносорбентом. Колонку промывали фосфатно-солевым буфером с 0,3 М NaCl для вымывания несвязанных антител. В InlB-специфических антителах элюировали 4,5 М MgCl₂ и подвергали диализу в фосфатно-буферном физиологическом растворе с pH 7,4. Очищенные InlB-специфичные IgG-антитела (и a-IgGs) растворяли до концентрации 5 мг/мл и хранили в 50% глицерине при -20°C.

2.5 Получение конъюгата a-InlB-IgG - пероксидазы хрена

a-InlB IgG были помечены пероксидазой хрена с использованием двухстадийного метода и глутарового альдегида в качестве сшивающего агента. 10 мг пероксидазы хрена растворяли в 0,2 мл 0,1 М фосфатного буфера, содержащего 0,15 М NaCl и 1,25% глутарового альдегида, pH 6,8, путем перемешивания в течение ночи при комнатной температуре. Избыток глутарового альдегида удаляли диализом против 0,15 М NaCl. Раствор пероксидазы хрена разбавляли до 1 мл с использованием 0,15 М NaCl. Затем добавляли 1 мл раствора IgG (5 мг/мл), содержащего 0,15 М NaCl и 0,1 мл 1 М карбонатного буфера, pH 9,5. Смесь инкубировали при 4 оС в течение 24

часов, затем вводили 0,1 мл 0,2 М раствора лизина, чтобы остановить реакцию. Смесь инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре и диализировали в течение ночи против PBS (0,01 М фосфатного буфера с добавлением 0,15 М NaCl, pH 7,2). Конъюгат a-InlB-IgG - пероксидаза хрена (a-InlB-IgG-HRP) осаждали эквивалентным объемом насыщенного раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и растворяли в 1 мл фосфатного буфера. Раствор подвергали диализу против фосфатно-буферного физиологического раствора (PBS). Раствор центрифугировали при 10000 g в течение 30 мин, удаляли осадок, добавляли BSA до 1% и раствор фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм. Полученный конъюгат a-InlB-IgG - HRP хранили при -20 °С.

2.6. Прямой иммуноферментный анализ (ИФА)

Бактериальные культуры для ИФА готовили как описано в п. 2.2.2. После трехкратной промывки раствором TTBS добавляли конъюгат a-InlB-IgG - HRP, разведенный 1:10 000. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч, трижды промывали TTBS и добавляли раствор субстрата HRP substrate 1-Step™ Ultra TMB-ELISA (Thermo Fisher Scientific). Результаты колориметрической реакции считывали с помощью планшетного считывателя iMark (BioRad) при 450 нм.

2.7. Измерение концентрации белков методом Брэдфорда

Концентрацию белков оценивали методом Брэдфорда [18], используя краситель G-250. В лунки 96-луночного планшета вносили по 10 мкл образцов и 7 стандартов 0,125; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2 мг/мл. К каждому образцу добавляли 200 мкл красящего реагента. Инкубировали при комнатной температуре 20 мин. Измеряли поглощение на ридере iMark (Bio-Rad) при длине волны 595 нм. Строили калибровочную кривую и рассчитывали концентрацию белка в образцах по полученной кривой.

3. Биологические методы

3.1. Получение гипериммунных сывороток.

Иммунизация состояла из 2-х циклов:

1 цикл

1-я иммунизация

1. 1 мл (0,25 мг белка антигена) внутривенно.
2. 1 мл (0,375 мг белка антигена + 0,5 мл полного адьюванта Фрейнда) подкожно по боковым поверхностям тела в 5 точек с одной стороны.
3. 1 мл (0,375 мг белка антигена + 0,5 мл неполного адьюванта Фрейнда) в/м в лапку.

2-я иммунизация – через месяц

1. 1 мл (0,25 мг белка антигена) внутривенно.
2. 1 мл (0,750 мг белка антигена + 0,5 мл неполного адьюванта Фрейнда) подкожно по боковым поверхностям тела в 5 точек с одной стороны.

3-я иммунизация – через две недели

1. 1 мл (0,250 мг белка антигена) внутривенно.
2. 1 мл (0,750 мг белка антигена + 0,5 мл неполного адьюванта Фрейнда) подкожно по боковым поверхностям тела в 5 точек с одной стороны.

4-я иммунизация – через две недели

2. 1 мл (0,250 мг белка антигена) внутривенно.
3. 1 мл (0,375 мг белка антигена + 0,5 мл неполного адьюванта Фрейнда) в/м в лапку.

2 цикл. Ревакцинация через месяц

1. 1 мл (0,250 белка антигена) внутривенно.
2. 1 мл (0,375 мг белка антигена + 0,5 мл неполного адьюванта Фрейнда) подкожно по боковым поверхностям тела в 5 точек с одной стороны.
3. 1 мл (0,375 мг белка антигена + 0,5 мл неполного адьюванта Фрейнда) в/м в лапку.

Взятие крови на 7-й день после последней иммунизации.

В дальнейшем уровень антител поддерживается повторными иммунизациями, в среднем 1 раз в полгода. Сыворотка ампулируется и хранится при -70 °С.

3.2 МТТ-тест

Стандартный анализ пролиферации и жизнеспособности клеток МТТ проводили в 96-луночных планшетах с реагентом МТТ (R&D Systems, Миннеаполис, Миннесота, США в трех экземплярах. Результаты считывались с помощью считывателя iMax (Био-рад, город, штат, страна).

3.3. Иммунофлуоресцентная микроскопия.

Клетки HepG2 фиксировали и пермеабелизировали 3,7% параформальдегидом и 0,1% Triton X-100 соответственно. Клетки блокировали 2% BSA (в PBS) перед инкубацией с первичными антителами в течение ночи при 4°C, с последующим введением вторичных антител в течение 1 ч при комнатной температуре в условиях затемнения. Затем добавляли Hoescht 33342 (Invitrogen), и образцы инкубировали в темных условиях еще 20 минут. Изображения конфокальной микроскопии были получены с помощью флуоресцентного микроскопа Carl Zeiss Axiovert при увеличении 100× (Йена, Германия). Используемые антитела описаны выше.

3.4 Клеточная культура и условия роста

Объектами исследования эукариотических клеток послужили перевиваемая линия эпителиальных клеток человека HEp-2. Эукариотические клетки выращивали в среде DMEM с добавлением 2% сыворотки при 37°C в 5% CO₂ атмосфере.

3.5 Испытание на острую токсичность CCl₄

Десятичные разведения белков от 2 до 2000 нг/г, разведенный в PBS, вводили внутривенно в хвостовые вены мышей. В группу были включены три мыши. Контрольная группа получала только PBS. Мышей умерщвляли, а их печень отбирали для макроскопического и гистологического анализа через 48 ч после последней инъекции. Для определения массы тела две группы по 5 животных получали минимальную дозу 2 нг/г или 2 раза в неделю в течение 3 недель. Мышей умерщвляли на 21-й день, и у них брали кровь для анализа АЛТ/АСТ, а печень брали для макроскопического и гистологического анализа.

2.9.

Мышей случайным образом распределяли на 5 групп (6 в каждой группе). В группах 1, 2 и 4 острое повреждение печени было вызвано внутрижелудочным введением однократной дозы CCl₄, растворенной в оливковом масле (в отношении 1:1; 4,5 мкл смеси масла на грамм. Внутрижелудочную инъекцию проводили животным, которые голодали в течение 12 ч и анестезировали внутрибрюшинной инъекцией пентобарбитала натрия (40 мкг/г). Иглу диаметром 0,6 мм и длиной 25 мм использовали для подачи 100 мкл масла смеси CCl₄. Кончик иглы был разрезан и отполирован до гладкости, чтобы избежать повреждения желудка. Мыши 2-й и 3-й групп получали внутривенную дозу idInlB (2 нг/г) за 2 ч до внутрижелудочной инъекции CCl₄ или того же объема растворителя (оливкового масла) путем внутрижелудочной инъекции без повреждения печени, соответственно. Группа 4 получала HGF (2 нг/г) внутривенно за 2 ч до инъекции CCl₄. Группе

5 внутривенно вводили носитель без idInlB и объем растворителя (оливковое масло) путем внутрижелудочной инъекции. Через 48 ч после инъекции CCl₄ мышам были обескровлены и вскрыты под наркозом. Их печень удаляли, взвешивали и фиксировали для последующего гистологического исследования, как описано ниже.

3.6. Гистологическое исследование срезов печени

Для гистопатологии срезы тканей анализировали с помощью окрашивания гематоксилин-эозином. Площадь некроза определяли в микроскопическом поле площадью 3,56 мм²/срез в 5 полученных срезах ткани из 10 от разных животных (n = 5) в каждой группе с использованием морфометрического анализа с помощью программного обеспечения ImageJ на гематоксилин-эозиновых срезах (Москва, Россия).

3.7. Биохимические маркеры

Уровни АСТ (аспиратаминотрансферазы) и АЛТ (аланинаминотрансферазы) в сыворотке крови определяли с помощью автоматического анализатора Chem Well 2900(T) (Awareness Technology, Ltd, Палм-Сити, Флорида, США) и реагенты, специфичные для мыши (Spinreact, Жирона, Испания).

3.8. 70% частичная гепатэктомия

Крыс разделяли на две группы путем случайного распределения по пять особей в каждой группе. Контрольная группа 1 не получала лечения, а группа 2 был обработан idInlB_{CC1}. Все хирургические вмешательства проводились под анестезией 35 мг/кг Телазола, вводимого внутривенно. Затем была выполнена 70%-ная частичная гепатэктомия путем резекции срединная и левая доли. Таким образом, после резекции были оставлены правая внутренняя и правая боковые доли. idInlB_{CC1} в концентрации 2 нг/г вводили внутривенно на второй, четвертый и шестой дни после операции. В общей сложности препарат вводили три раза с интервалом в 1 день. Контрольным

животным вводили PBS. Через неделю после первого введения препарата животных выводили из эксперимента. Для расчета определяли массу тела и массу печени, а срезы, полученные из печени, фиксировали в нейтральном 10% формалине для гистологического исследования.

Индекс массы печени (LWI) рассчитывали как процентное отношение массы регенерированной печени (L_w) к массе тела (B_w), которое можно описать уравнением $LWI = L_w/B_w \times 100\%$.

3.10 Морфометрическое исследование срезов печени

Зафиксированную в формалине печень измельчали на блоки толщиной примерно 1 мм^3 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). Окрашенные срезы исследовали с помощью световой микроскопии, чтобы обеспечить надлежащую подготовку и подтвердить выбор медиальных долевых областей. Из этих срезов были отобраны два среза для морфометрического анализа. Клеточные параметры, такие как доля двуядерных гепатоцитов и диаметр ядер, измеряли на двух случайно выбранных полях для каждого отдельного среза печени. Количество двуядерных гепатоцитов определяли количественно вручную. Количество гепатоцитов на сечение составило 415 ± 47 . Оценка диаметра ядра проводилась с использованием архитектуры нейронной сети, основанной на сверточной архитектуре U-Net с потерей коэффициента Dice (Ronneberger, Fischer, & Brox, 2015). Тренировочный набор был откалиброван вручную. Цель, выбранная в стандартной форме сегментации для решений, подобных U-Net: битовая маска с той же тензорной формой, что и входной тензор. Изображения и соответствующие мишени были обрезаны на куски размером 100×100 с перекрытием. Эти небольшие образцы были использованы в

качестве рентгеновского снимка для NN-решение. Битовая маска дает нам информацию о том, какой пиксель исходного изображения имеет ядро или нет. Чтобы найти диаметр ядра, над каждой фигурой были построены ограничивающие рамки с вероятностью больше 0,5 на предсказанной битовой маске с помощью алгоритма Сузуки и Эйба [138]. В качестве диаметра ядра использовался самый большой размер прямоугольника. Кривая распределения была построена на основе данных из двух случайно выбранных полей от каждого из пяти животных.

3.11 Иммуногистохимия

Чтобы оценить долю пролиферирующих клеток, три депарафинизированных и регидратированные срезы из каждого блока обрабатывали специфическим моноклональным антителом против Ki-67 (BD Bioscience Pharmingen, San Хосе, Калифорния), конъюгированное с биотином козы антитела против мышей, используемое в качестве вспомогательного средства (BD Bioscience Pharmingen). Антигенреактивные клетки контрастировали с хромогенным субстратом 3,3-диаминобензидином (BD Bioscience Pharmingen). Снимки были сделаны с помощью тепловизора Zeiss Axio Imager Микроскоп М2 с камерой Ахiosam ICc5. Количественная оценка Ki-67 получение положительных ядер проводилось двумя способами. Ручной подсчет Ki67 проводился гистологом с точным ручным подсчетом 400 соседних клеток на единицу площади в четырех полях зрения на срез при увеличении микроскопа составляло $\times 400$. Для автоматизированного Оценка Ki-67, была использована описанная выше сверточная архитектура U-Net на основе нейронной сети. Чтобы найти цвет ядра, мы преобразовали наше исходное изображение в цветовое пространство HSV и, используя информацию о том, какой пиксель этого преобразованного изображения HSV принадлежит каждому ядру, мы вычислили среднее значение “V” для этих пикселей. Всего было проанализировано два случайно выбранных поля от каждого из пяти

животных. Распределение было построено индивидуально для каждого поля. Типичный представлены данные.

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.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

I часть. Получение и характеристика рекомбинантных белков idInlB

1.1. Очистка рекомбинантных белков idInlB.

На первом этапе работы необходимо было получить очищенные препараты с-Met-связывающего фрагмента InlB – интерналинового домена (idInlB) в бактериальной системе экспрессии.

Предыдущие работы, проведенные в лаборатории экологии возбудителей инфекций НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи, показали, что интерналиновый домен имеет филогенетические детерминированные варианты (изоформы), которые могут влиять на свойства белка [2, 24, 131].

В работу были включены три изоформы интерналинового домена InlB (idInlB; аминокислоты 36-321) (рис. 7). Один из них был специфичен для штаммов филогенетической линии I, а два других были специфичны для штаммов линии II. Изоформа специфичная для линии I idInlB, в дальнейшем обозначаемая как idInlB_{CC1}, характерна для высоковирулентных штаммов эпидемического клона EC1, клонального комплекса CC1 и клонирована из штамма VIMHA015 (ST1, CC1) [24]. Среди изоформ линии II первая, обозначенная как idInlB_{CC9}, была клонирована из штамма типа EGDe, а вторая, обозначенная как idInlB_{CC7}, была клонирована из человеческого изолята VIMHA034. Были взяты две формы филогенетической линии II, потому что вариант idInlB_{CC9} из штамма типа EGDe описан и используется в ряде исследований, в то время как idInlB_{CC7} является наиболее часто встречающимся среди штаммов серовара 1/2a *L. monocytogenes*, выделенных из диких животных, клинических образцов и других источников. Более того, ранее было показано различие в их влиянии на вирулентность. Аминокислотные замены, которые дифференцируют варианты, показаны на рис. 7. idInlB_{CC9} и idInlB_{CC7} отличались четырьмя заменами в положениях 41,

49, 117 и 132. Одиннадцать замен отличались вариантами линии I и линии II (выделены жирным шрифтом на рис. 7).

	N-Cap			LRR								Ig-like			
	41	49	69	73	91	117	132	164	176	181	197	205	246	251	262
idInlB _{CC9}	P	S	A	N	V	A	V	P	I	V	Q	A	P	S	T
idInlB _{CC1}	P	P	L	S	I	A	I	L	L	I	E	S	S	M	I
idInlB _{CC7}	S	P	A	N	V	T	I	P	I	V	Q	A	P	S	T

Рис. 7. Аминокислотные замены интерналинового домена. За основу был взят идентификатор в последовательности idInlB_{CC9}. Замены между линиями I и II изоформ idInlB выделены жирным шрифтом. LRR-лейцин-богатые повторы (Leucine-rich-repeat);

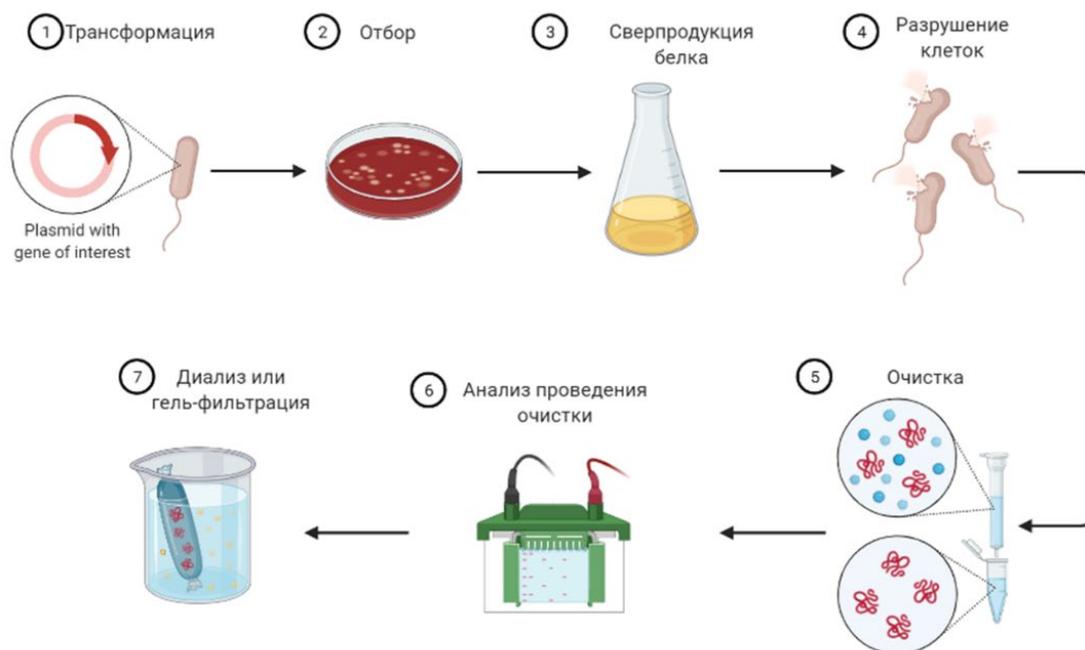


Рис. 8. Общая схема получения рекомбинантных белков idInlB

Для получения очищенных препаратов были использованы штаммы-продуценты *E. coli* BL21, ранее полученные в лаборатории экологии возбудителей инфекций Чаленко Я. М [24]. Вкратце схема получения штаммов-продуцентов была следующей. Гены интерналинового домена были амплицированы в полимеразной цепной реакции. Продукты клонированы в промежуточный вектор pGemTEasy. Для проверки полученных нуклеотидных последовательностей проводилось секвенирование. Для экспрессии интерналинового домена ген, кодирующий белок, был переклонирован в экспрессирующий вектор pET28b. Данный вектор широко используется для создания систем экспрессии прокариотических рекомбинантных белков. Вектор несет ген устойчивости к канамицину, обладает сайтами узнавания для рестриктаз и содержит последовательность, кодирующую His-tag. Таким образом, полученные белки содержали аминокислотную последовательность из 6 остатков гистидина, что облегчает их очистку при использовании метода металл-аффинной хроматографии. Использование данного вектора и штамма позволяет индуцировать экспрессию целевого гена при добавлении в среду изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозида (ИПТГ).

Для экспрессии гена idInlB (рис. 8) ночную культуру штамма *E. coli* BL21, содержащую плазмиду pET28b-idInlB, разводили свежей средой 1:100 и культивировали до оптической плотности 0,6-1,0 при 37 °C с шутелированием 200 об/мин. Измерение оптической плотности культуры проводили на приборе Ultraspec 10 Cell Density Meter (Amersham Science). После чего добавляли индуктор ИПТГ на 3 часа. Клетки собирали центрифугированием и разводили в фосфатно-солевом буфере. Для разрушения клеток использовали ультразвуковой дезинтегратор (УД-20, Techpan, Польша). Трехкратная обработка в течение 20 секунд с перерывом 1 минуту на средней мощности прибора позволяла максимально разрушить клетки. Альтернативно в тестовых экспериментах также использовали механический метод дезинтеграции при помощи прибора SuperFast Prep-1 (MP

Biomedicals), однако при применении данного метода концентрация общего белка в пробах, а следовательно, и целевого было меньше, чем при использовании ультразвукового дезинтегратора ($4,73 \pm 0,53$ мг/мл против $13,03 \pm 0,67$ мг/мл. Поэтому для получения белка основным методом дезинтеграции был выбран ультразвук.

Для того чтобы определить наличие целевого белка в пробах, в тестовых экспериментах были сравнены электрофоретические профили лизатов штаммов *E. coli* BL21 с плазмидой *pet28b* без гена *idInlB* и с геном *idInlB*. (рис. 9). Электрофоретический анализ показал, что в районе 37 кДа у лизата штамма *E. coli* BL21 *idInlB-pet28b* присутствует белок, молекулярная масса которого соответствовала теоретически рассчитанному значению. Процентное содержание этого белка от общего белка составляет около 25 %. При этом данный белок отсутствует у штамма *E. coli* BL21 *pet28b*. Эти данные подтверждают наличие целевого белка в полученном лизате *E. coli* BL21 *idInlB-pet28b*.

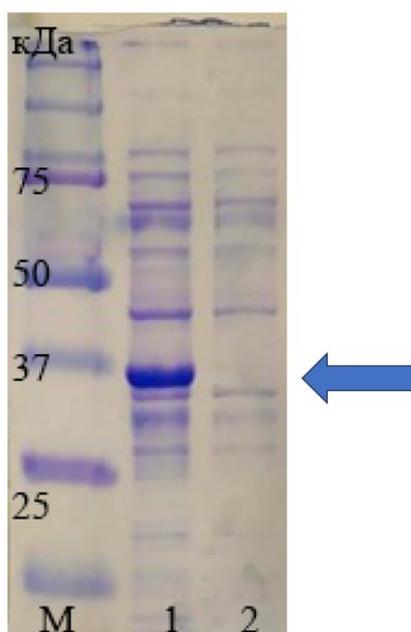


Рис. 9. Электрофоретические профили лизатов штаммов *E. coli* 1 – BL21 *idInlB-pet28b*, 2 - BL21 *pet28b*.

Анализ литературных данных показал, что наиболее часто для индукции применяют ИПТГ в конечной концентрации 1 мМ. Однако в отдельных работах эффективный синтез целевых продуктов достигнут при использовании ИПТГ в концентрации 0,5 мМ и меньше для индукции транскрипции целевого гена, контролируемой *tac*-промотором [68, 132, 152], *lac*-промотором, а также в описанной выше системе экспрессии на основе РНК-полимеразы фага Т7 [17, 160]. Показано, что высокие концентрации ИПТГ могут стимулировать образование целевого продукта в нерастворимой форме [17, 160], влиять на его локализацию (в цитоплазме и/или периплазме), а также угнетать рост рекомбинантных бактерий.

Была изучена экспрессия гена *idInlB* при индукции 0,1; 0,25; 0,5; 1 мМ ИПТГ. Так как ИПТГ отрицательно влияет на рост бактерий (значение оптической плотности культур после 3-часовой индукции соответственно составляло 1,85; 1,32; 1,18; 1,12), Полученные клетки были отмыты фосфатно-солевым буфером (PBS), после чего дезинтегрированы при помощи ультразвукового дезинтегратора. Клеточный дебрис отделяли центрифугированием (13000 об/мин). Белковые растворы доводили до одной концентрации и готовили пробы для электрофореза в ПААГ. Результаты электрофореза оценивались при помощи программы TotalLab. При всех четырех концентрациях наблюдалось экспрессия гена *idInlB* (Рис. 9). Однако содержание целевого белка в пробах с индукцией ИПТГ 0,5 и 1 мМ составило соответственно 22,82 и 21,14 % от общего белка, а в пробах с индукцией ИПТГ 0,25 и 0,1 мМ содержание белка было несколько ниже и составило 14,84 и 10,68 % соответственно. Для оптимальной индукции был выбран вариант с концентрацией 1 мМ ИПТГ в течение 3 часов при 37 °С (рис. 10).

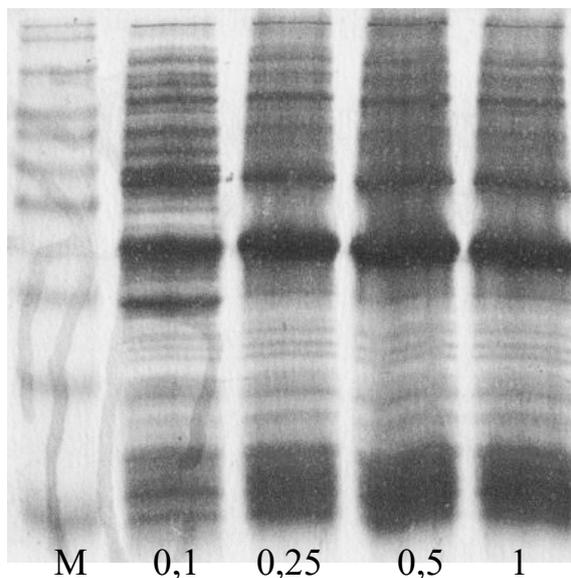


Рис.10. Влияние концентрации ИПТГ на содержание целевого белка.
Концентрация ИПТГ 0,1; 0,25 0,5; 1 мМ.

Для очистки использовалась аффинная хроматография на Ni-NTA-сефарозе (как описано в Материалах и методах). Отсутствие искомой полосы во фракции «проскока» (фракция 2 на рис. 11), свидетельствует о связывании рекомбинантного белка с сорбентом. При промывании колонки использовался буфер с концентрацией имидазола 30 мМ. При этом искомый белок отсутствовал в промывочной фракции (фракция 3 на рис. 11). При элюировании белка применялся ступенчатый метод, с использованием концентрации имидазола 100 мМ, 300 мМ, 500 мМ. В результате этого последовательно были собраны фракции. Незначительные количества рекомбинантного белка и примесей обнаруживались при элюировании 100 мМ имидазола (данные не показаны), однако при этом удалось уменьшить количество примесных белков в следующих фракций (4, 5, 6 на рис. 11). Основная часть белка сходила с колонки при концентрациях 300 мМ и 500 мМ

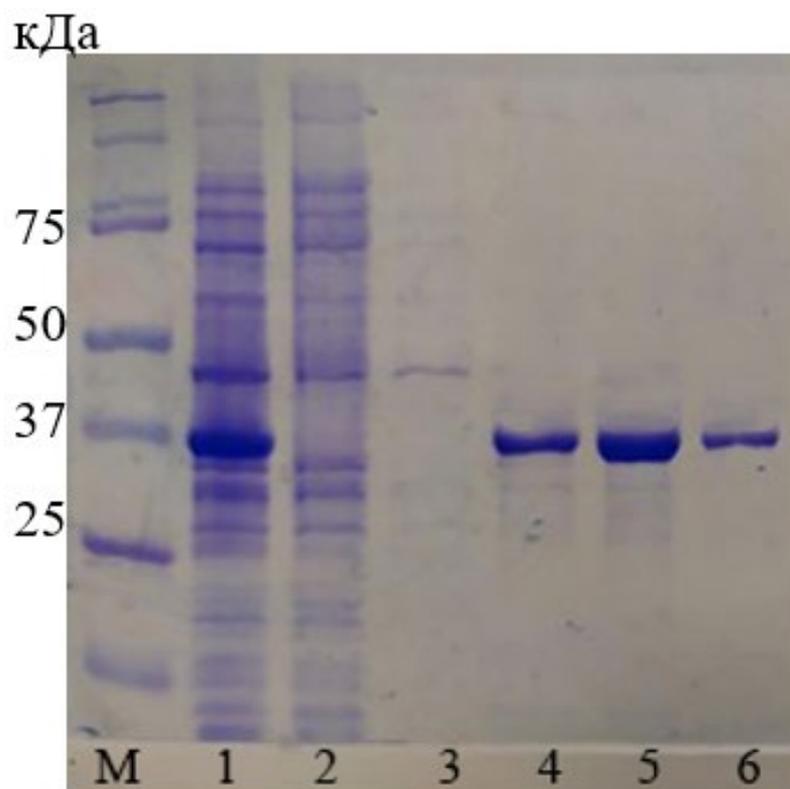


Рис. 11 Электрофореграмма лизата рекомбинантного штамма *E. coli* BL21 idInlB-pet28b и очищенных белковых препаратов. М – маркер (BioRad); 1 – лизат рекомбинантного штамма *E. coli* pET28b-idInlB, 2 – «проскок», 3 – фракция промывки (30 мМ имидазола), 4 – 300 мМ имидазола (элюирующая фракция 1), 5 - 300 мМ (элюирующая фракция 2), 6 – 500 мМ (элюирующая фракция 3).

Результаты электрофореза оценивались при помощи программы TotalLab. Денситограмма результатов анализа электрофореграммы очищенного препарата белка idInlB представлена на рис. 12. Фракции с высокой степенью очистки (> 97 %) были собраны и подвергнуты диализу.

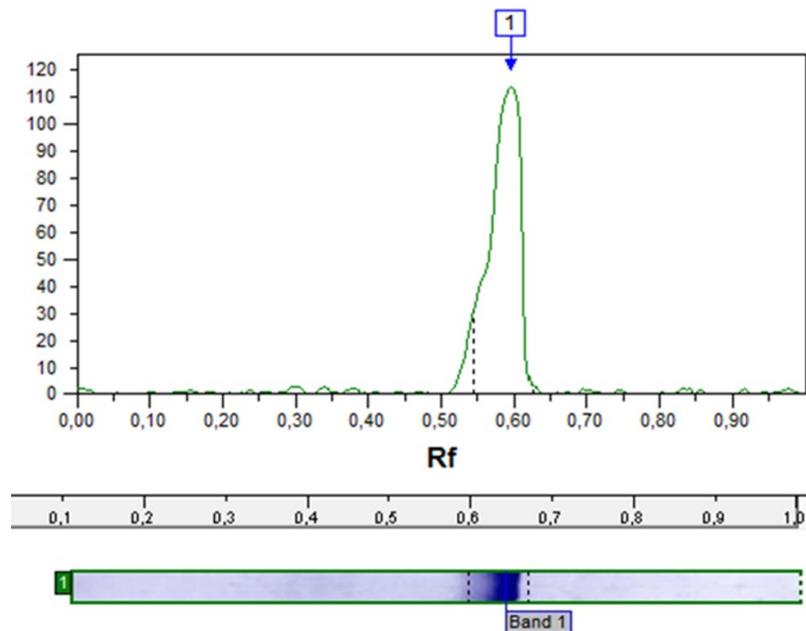


Рис. 12. Денситограмма результатов анализа электрофореграммы очищенного препарата белка IdInlB.

В дальнейшем из собранных фракций удаляли имидазол. Для удаления имидазола использовали диализную систему для образцов с объемом до 2 мл Slide-A-Lyzer™ MINI на ночь. Для определения сохранности основного вещества готовили образцы как описано в Материалах и методах. Затем отбирали для анализа 9 мкл образца и подвергали электрофорезу в 10%-м геле по стандартной методике.

Как следует из проведенного исследования (рис. 13), белок сохраняет исходную структуру после диализа.

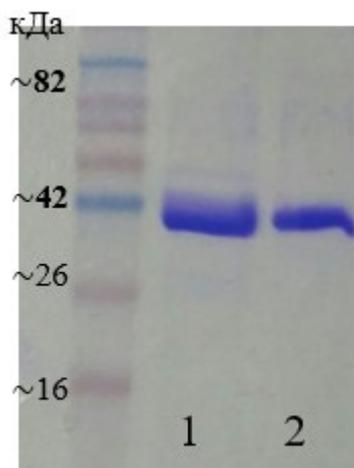


Рис. 13 Анализ сохранности рекомбинантного idInlB после этапа диализа.

1 – idInlB_{CC1} до диализа 2 – idInlB_{CC1} после диализа

Для очистки от бактериальных эндотоксинов использовали метод двухфазной экстракции [89]. Отсутствие эндотоксинов подтверждали при помощи гель-тромб-теста с использованием ТАЛ-реактива (BioEndo). Все стадии очистки были проведены по аналогии для все трех выбранных изоформ белков. Очищенные белки хранились при температуре – 80 °С.

Таким образом, в результате проведенного выделения и очистки из исходных лизатов были получены высокоочищенные рекомбинантные белки idInlB; препараты однородны, о чем свидетельствует наличие единственной полосы на электрофореграмме. Проведенные выделение и очистка данных белков характеризуются высокой эффективностью. Препараты могут быть использованы в дальнейших исследованиях.

1.2 Физико-химические свойства изоформ idInlB.

После получения очищенных изоформ idInlB были исследованы их физико-химические свойства, способность связываться с рецепторами c-met и gc1Q-г и способность активировать MAPK и PI3-киназные пути.

Для определения олигомерного состояния белков проводили гель-фильтрацию препаратов с последующей перешивкой пиковых фракций глутаровым альдегидом. Для хроматографии исходные препараты центрифугировали, отбирали 200 мкл и фильтровали их через центрифужный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм. Гель-фильтрация в 150 mM боратном буфере pH 8.8 дала уширенные пики неправильной формы с максимумом, соответствующим мономеру с молекулярной массой 37 кДа. Присутствие агрегатов/высокомолекулярных примесей незначительно. Профили ГПХ всех вариантов включали основной пик со временем элюирования, соответствующим мономерному состоянию белков (рис. 14). Более высокий

квантовый выход флуоресценции при 340 нм наблюдался для $idInlB_{CC1}$, в то время как пиковые интенсивности были сопоставимы для $idInlB_{CC9}$ и $idInlB_{CC7}$. Небольшое смещение в положении пикового времени наблюдалось для $idInlB_{CC9}$ по сравнению с другими вариантами (время элюции $39,28 < 39,48 = 39,48$ мин для $idInlB_{CC9}$, $idInlB_{CC1}$ и $idInlB_{CC7}$ соответственно).

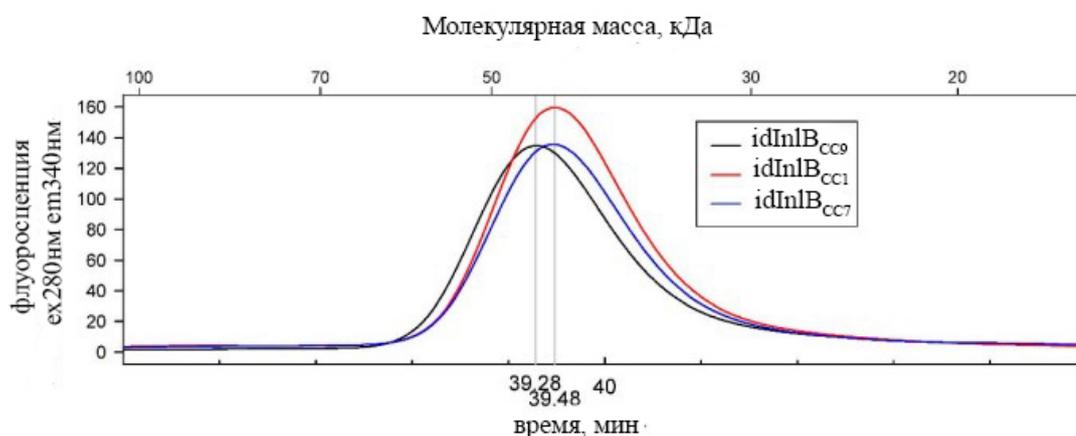


Рис. 14 Гель-проникающая хроматография очищенных изоформ $idInlB$.

Для дальнейшей оценки конформации белка были взяты собственные спектры флуоресценции. $idInlB_{CC1}$ продемонстрировал самую высокую относительную флуоресценцию. В отличие от приведенных выше данных, флуоресценция $idInlB_{CC7}$ и $idInlB_{CC9}$ отличалась, причем $idInlB_{CC7}$ демонстрировал самый низкий квантовый выход. Более того, второй пик наблюдался для $idInlB_{CC7}$ с максимумом при 440 нм. На этой длине волны нет аминокислоты с излучением. Ретракция пика 2 показала, что флуоресценция $idInlB_{CC7}$ была очень похожа по форме на другие белки, хотя и ниже по интенсивности (рис. 15).

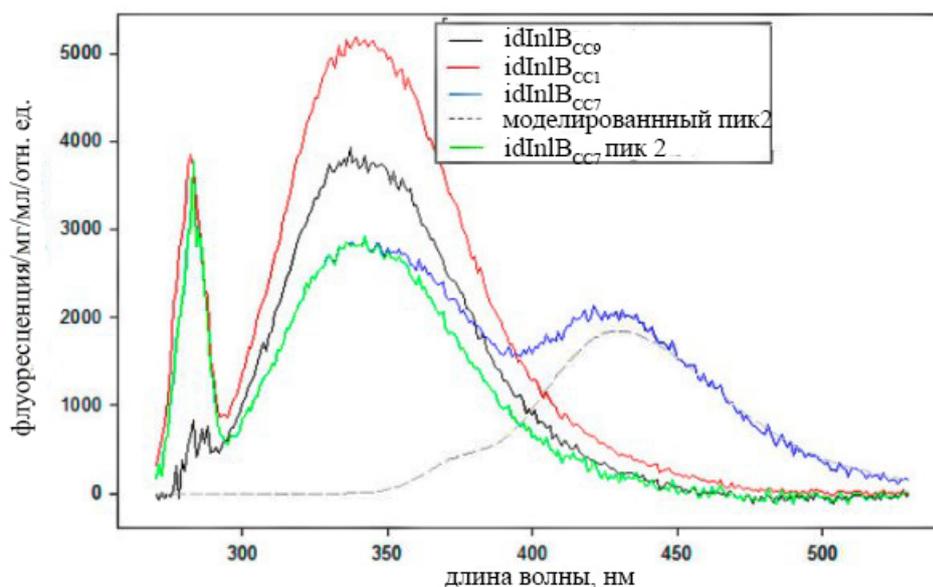


Рис. 15. Спектры флуоресценции очищенных idInlBs. Для idInlB_{CC7} показаны исходный и вытянутый спектры.

Таким образом, По физико-химическим показателям между изоформами наблюдаются незначительные отличия. Варианты не отличаются по способности образовывать димеры.

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}).

Гипериммунную сыворотку получали по схеме, представленной в Материалах и методах. Способность антисыворотки, разработанной против idInlB_{CC9}, распознавать полноразмерный InlB других изоформ, проверяли методом иммуноблота. Для этого использовали лизаты трех штаммов *L. monocytogenes* (EGDe (CC9), VIMHA015 (CC1), VIMHA034 (CC7)), принадлежащие к разным клональным комплексам I и II филогенетических линий, и штамм EGDeΔinlB, у которого отсутствует ген *inlB*. Для всех

штаммов, кроме EGDe Δ InlB, антитела реагировали с белком с молекулярной массой около 66 кДа, что соответствует молекулярной массе полноразмерного InlB (рис. 16). Антитела из сыворотки реагировали с InlB на одном уровне для всех трех вариантов InlB.

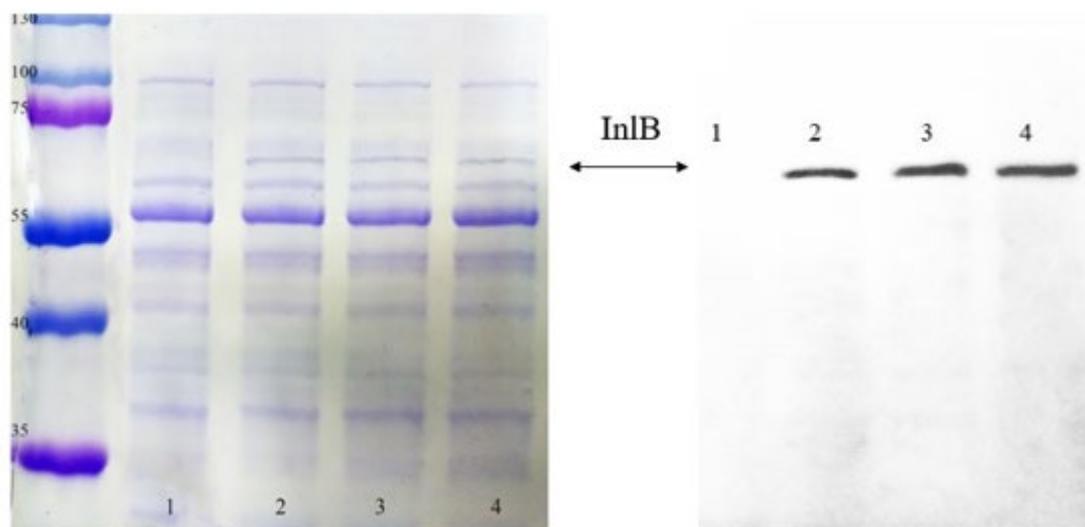


Рис. 16. Электрофорез и вестерн-блот анализ лизатов с помощью поликлональных антител к idInlB. 1 – штамм *L. monocytogenes* Δ InlB, 2 – штамм *L. monocytogenes* EGDe 3 - штамм *L. monocytogenes* VIMNA015, 4 - штамм *L. monocytogenes* VIMNA034, М – маркер молекулярных масс.

Для получения фракции IgG из сыворотки кролика была использована колонка с ДЭАЭ-сефадексом А-50. Для этого полученную после высаливания насыщенным раствором сульфата аммония, глобулиновую фракцию наносили на колонку с ДЭАЭ-сефадексом. Фракция, выходящая в свободном объеме, являлась IgG, что было подтверждено электрофорезом белков в ПААГ (при наличие агента, осуществляющий разрыв дисульфидных связей (β -меркаптоэтанол) молекулярная масса выделенной фракции – 55 кДа и 22 кДа (дорожка 1 на рис. 17), что говорит о присутствии легких и тяжелых цепей , при отсутствии – 150 кДа (дорожка 2 на рис. 17).

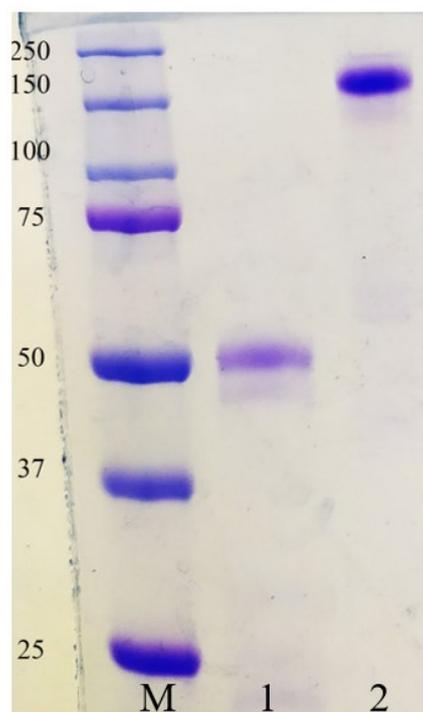


Рис. 17 Электрофорез фракции иммуноглобулинов G против InlB, выделенных на колонке с ДЭАЭ-сефадексом. 1 – при добавлении β -меркаптоэтанола, 2 – в отсутствии β -меркаптоэтанола

Затем антитела IgG, специфичные к InlB, очищали из сыворотки с помощью колонки с иммуносорбентом и конъюгировали с HRP для получения конъюгата α -InlB-IgG - HRP (см. Материалы и методы). Для проверки того, что конъюгированные антитела сохраняют способность специфически связываться с антигеном, был проведен прямой иммуноферментный анализ (ИФА) с использованием штаммов *L. monocytogenes* EGDe и EGDe Δ InlB, штамма *L. innocua* SLCC3379 и штамма *L. ivanovii* ATCC 19119 (рис. 18). Конъюгированные антитела α -InlB-IgG связывались с клетками *L. monocytogenes* EGDe, но не связывали EGDe Δ InlB, *L. innocua* и *L. ivanovii*.

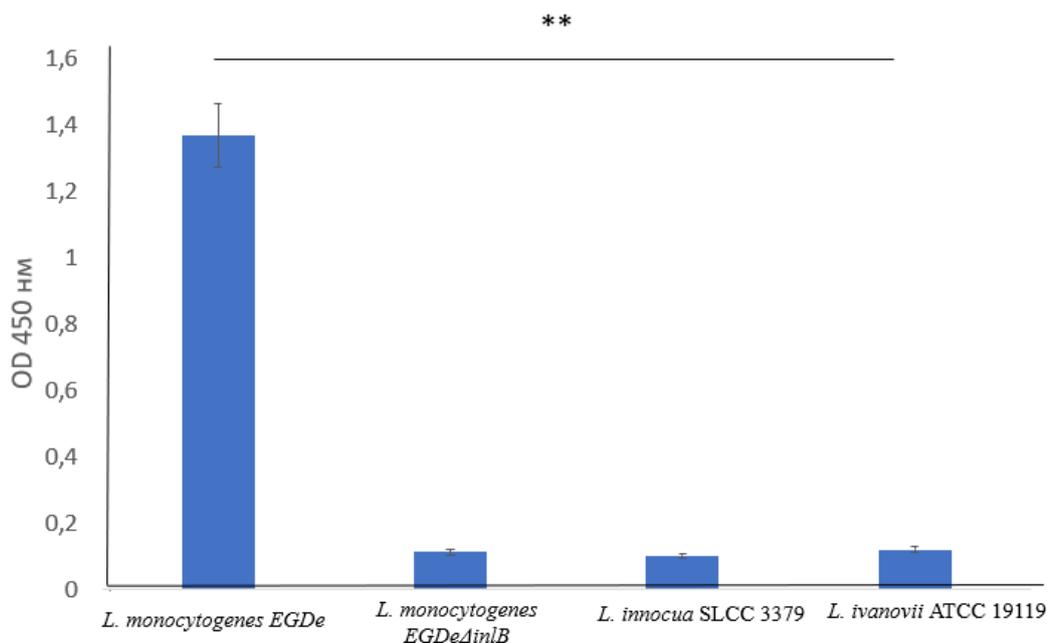


Рис. 18. Результаты прямого ИФА с использованием конъюгата α-InlB-IgG-HRP. ** $p < 0.01$

Таким образом, в ходе многоступенчатой очистки из сыворотки иммунизированных кроликов были получены фракцию 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*. Конъюгат реагировал только с культурой *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 экспрессии InlB на поверхности клеток у изолятов *L. monocytogenes*, относящихся к разным клональным группам.

Для того чтобы использовать антитела к InlB для идентификации *L. monocytogenes*, на их основе в иммуноферментном анализе, были оценены

уровни InlB в штаммах, относящихся к разным клональным комплексам. Ранее было показано, что клинические и пищевые изоляты отличаются уровнем экспрессии генов *inlB* [128]. Экспрессия ключевых факторов патогенности активируется во время клеточной инфекции и зависит от регулятора транскрипции PrfA. *L. monocytogenes* имеет сложную систему перекрёстных взаимодействий между регуляторными цепями σ^B и PrfA, чтобы обеспечить оптимальную реализацию генов, необходимых во внешней среде, включая репрессию генов, связанных с вирулентностью. И наоборот, внутри организма эта регуляторная сеть обеспечивает повышенную экспрессию генов, связанных с вирулентностью, для успешной инвазии [50]. Активность PrfA снижается при культивировании *L. monocytogenes* на богатой питательной среде. Гидрофобные адсорбенты, включённые в состав среды культивирования, активируют PrfA и индуцируют повышенную активность генов факторов вирулентности [43]

Чтобы изучить как изменяется концентрация InlB на клеточной поверхности *L. monocytogenes* при активированном PrfA регулоне сравнивали уровень экспрессии InlB в среде ВНИ с добавлением и без добавления сорбента 1% Amberlite XAD4 (рис. 19).

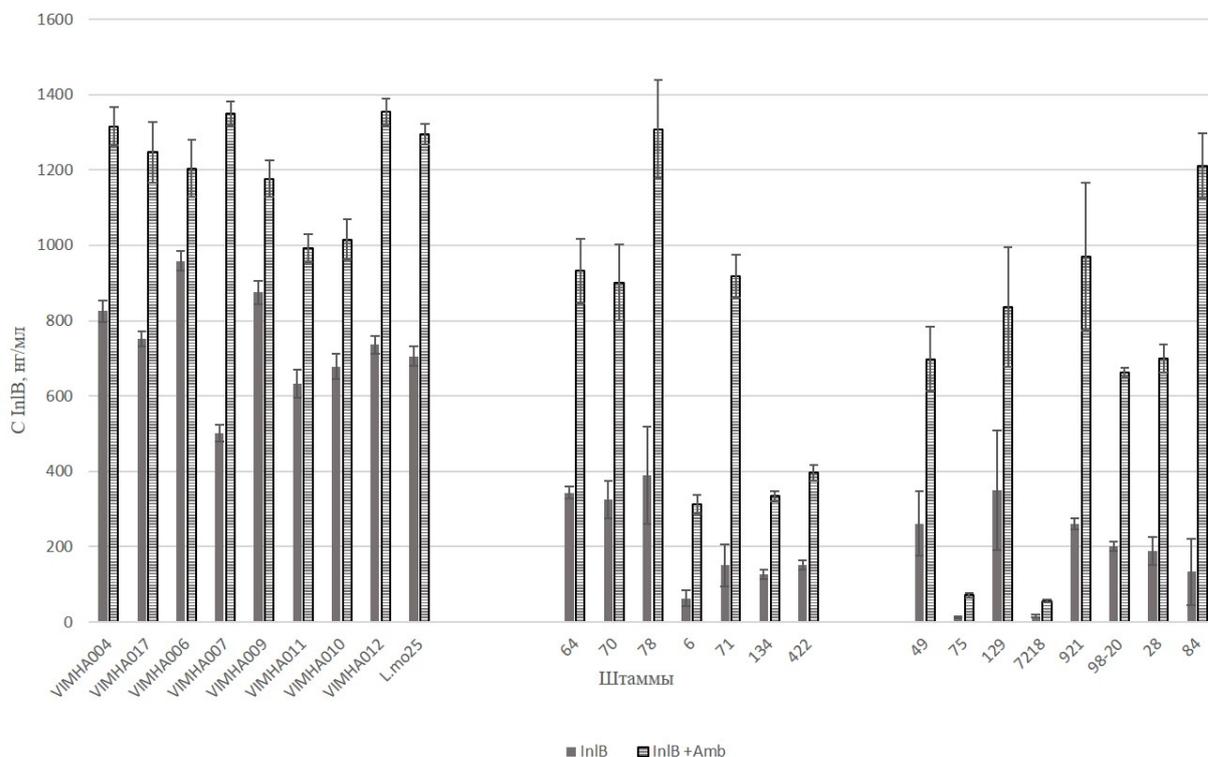


Рис. 19. Уровень экспрессии InlB на поверхности клеток у изолятов, относящихся к разным СС. Концентрацию InlB измеряли при помощи метода ИФА (как в Материалах и методах). Бактерии выращивали в среде ВНИ без и с добавлением 1% Amberlite XAD4.

Уровень экспрессии InlB между штаммами варьировал от 15 до 958 нг/мл без активации PrfA регулона (рис. 19). При этом в среднем концентрация у штаммов СС1 и СС2 составляла 740,5 нг/мл, что было существенно выше, чем у штаммов СС7 и СС9 (209,5 и 177,9 нг/мл соответственно). При активации PrfA концентрация InlB достигала максимальных значений 1353 нг/мл для штаммов СС1 и СС2, 917 нг/мл — для СС7, 835 нг/мл — для СС9. При этом наибольшего увеличения уровня InlB достигала у штаммов СС7 (в 3,29 раза в сравнении с уровнем без активации). Для штаммов СС9 и I филогенетической линии (СС1, СС2) увеличение уровня InlB в присутствии адсорбента составило 2,93 и 1,54 раза соответственно.

В целом, полученные данные показывают, что для штаммов, относящихся к более вирулентным клональным комплексам (CC1, CC2) характерен и 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 тест-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.

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

4.1. Разработка способа идентификации *L. monocytogenes* на основе специфического дот-иммуноанализа.

Для разработки способа идентификации *L. monocytogenes* был выбран метод дот-иммуноанализа. Дот-блот с одной стороны совмещает технику иммуноблотинга: использование мембраны в качестве носителя антигена и возможность оценить все колонии на твердой питательной среде. С другой стороны простоту иммуноферментного анализа, так как исчезает необходимость специальной подготовки образца, проведения белкового электрофореза и последующего блотирования анализируемых белковых смесей, при этом появляется возможность анализировать колонии напрямую с чашки.

Разработанный конъюгат a-InlB-IgG-HRP использовали в дот-иммунологическом анализе. Выращивали бактерии на агаре ВНИ, содержащий 0,2 % уголь (ВНИС-агар) для повышения выработки InlB, и делали отпечатки колоний на нитроцеллюлозной мембране. В качестве альтернативного подхода мы попытались выращивать бактерии непосредственно на мембране,

помещенной поверх ВНІС-агара на ночь. Первый подход позволял улучшить рост бактерий и дал лучшие результаты, поэтому во всех дальнейших экспериментах использовались отпечатки колоний. Мембрану окрашивали конъюгатом α -InlB-IgG-HRP, и результаты визуализировали с помощью ТМВ-субстрата, как описано в разделе Материалы и методы. Положительная реакция с *L. monocytogenes* выглядела как сплошная окрашенная точка в том месте, где была отпечатана колония (рис. 20).

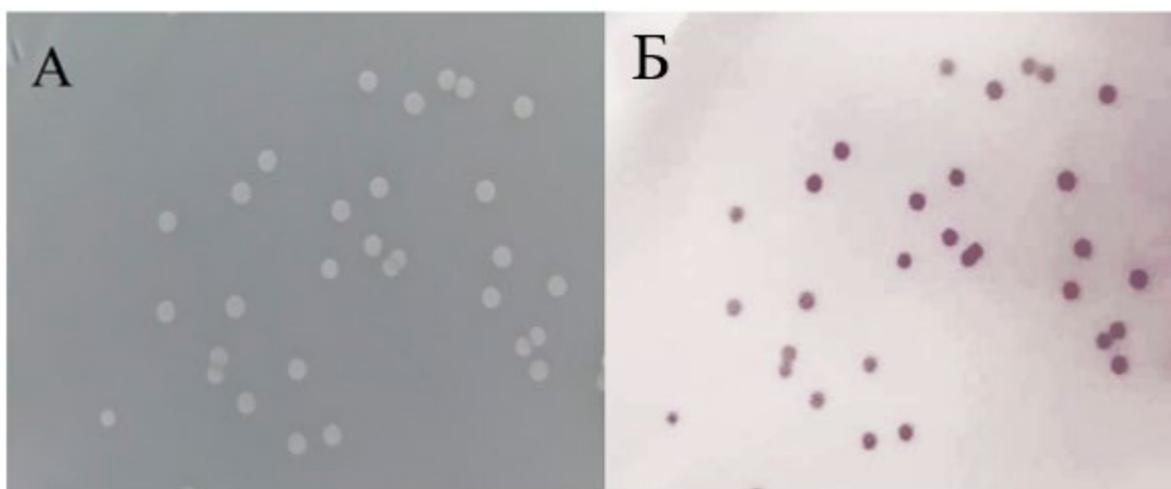


Рис. 20 Дот-иммуноанализ с конъюгатом α -InlB-IgG-HRP (очищенные InlB-специфические IgG, конъюгированные HRP). А – отпечатки мембран колоний *L. monocytogenes* EGDe, выращенных на агаре ВНІ (с добавлением 0,2 % угля); Б – дот-иммуноанализ мембраны с конъюгатом α -InlB-IgG-HRP.

Для проверки его специфичности был проведен дот-иммуноанализ со штаммами *L. monocytogenes*, принадлежащими к различным клональным комплексам и сероварам, другими видами *Listeria spp.* и видами, не относящимся к *Listeria*. Для анализа были использованы изоляты *L. monocytogenes*, выделенных из молочных продуктов. Все протестированные

штаммы *L. monocytogenes* дали положительный сигнал, в то время как другие бактерии - нет (рис. 21).

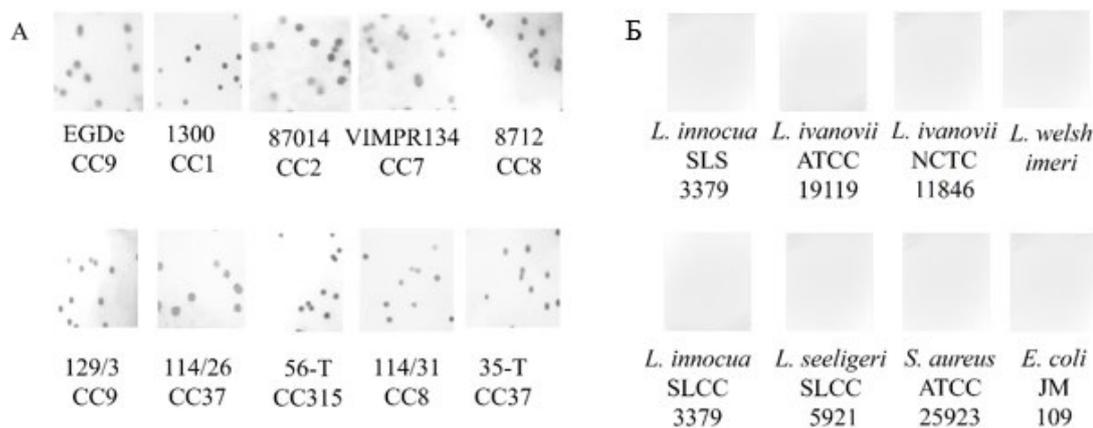


Рис.21. Дот-иммуноанализ с конъюгатом a-InlB-IgG-HRP. А – Дот-иммуноанализ со штаммами *L. monocytogenes*, обозначения штаммов и клональные комплексы, к которым принадлежит штамм, показаны на рисунке; Б – Дот-иммуноанализ с *Listeria spp.* и нелистерияльными видами.

В частности, анализ не выявлял *L. ivanovii* несмотря на то, что белок InlB описан у этого вида [36]. Однако выравнивание этих белков у *L. monocytogenes* и *L. ivanovii* показывает множественные замены, что, по-видимому, является важным для связывания специфических антител (рис. 22). Таким образом, было показано специфичность этого метода, который детектирует только патогенные штаммы *p. Listeria*, но не обнаруживает непатогенные для человека штаммы *p. Listeria* и *E. coli*.

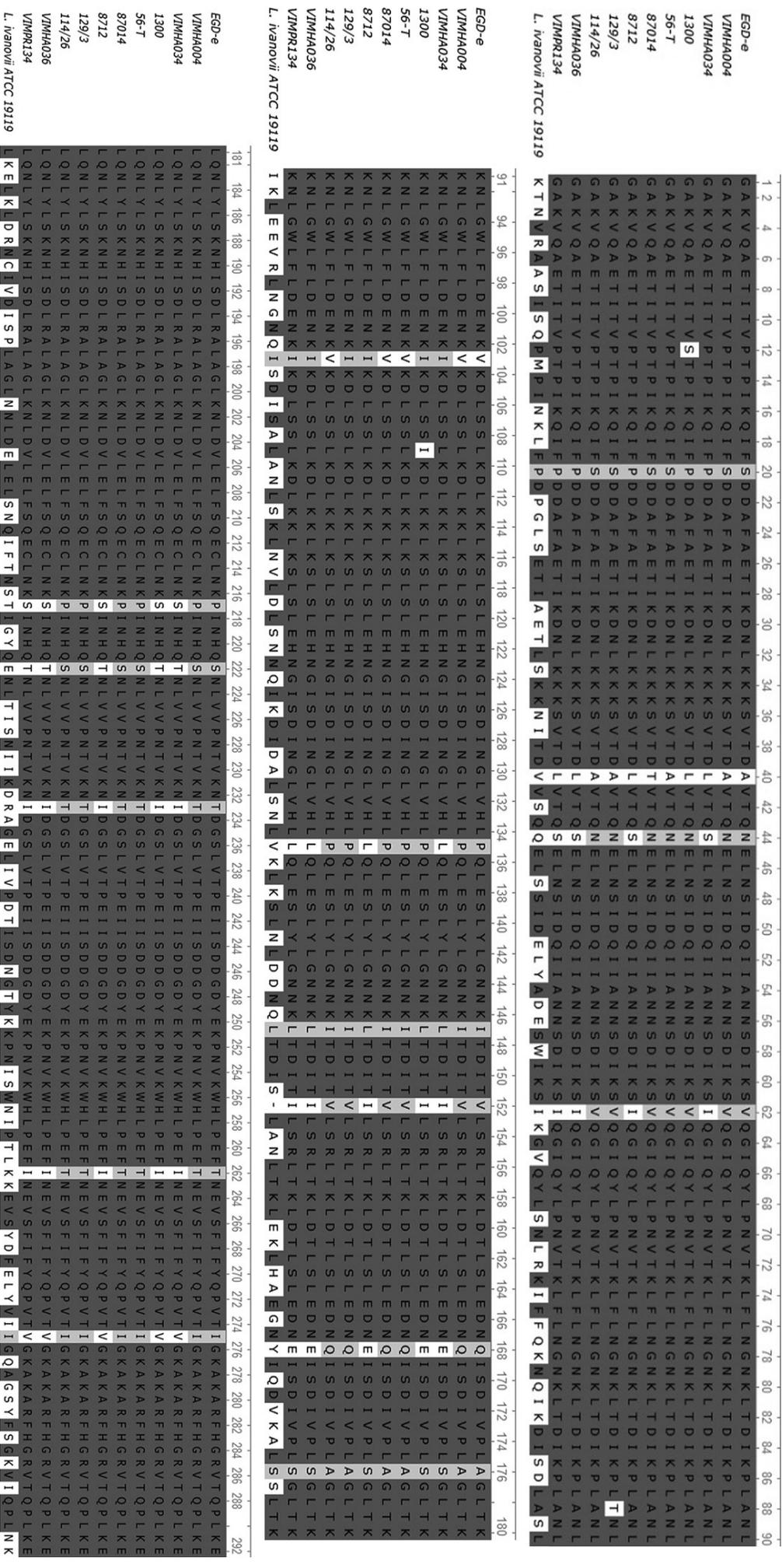


Рис. 22. Выравнивание в домене HlyB EGD-e *Listeria monocytogenes*, используемом для разработки поликлонального антигена, доменам штаммов *L. monocytogenes*, использованных в исследовании, включая VIMNA004 (СС2), VIMNA034 (СС7), 1300 (СС1), 56-T (СС315), 87014 (СС2), 8712 (СС8), 129/3 (СС9), 114/26 (СС37) VIMRA134 (СС7), VIMNA036 (СС20), и гомологичный домен белка HlyB из штамма *Listeria ivanovii* ATCC 19119. Использовалась программное обеспечение UniProt GENЕ версии 41.0.

4.2. Обнаружение *L. monocytogenes* с помощью дот-иммуноанализа в смешанной культуре

Наиболее близким к *L. monocytogenes* видом является *L. innocua*, который также часто встречается в молочных продуктах. Чтобы оценить потенциал InlB в качестве маркера для дифференциации *L. monocytogenes* от *L. innocua* в смешанной культуре, мы брали ночные культуры *L. monocytogenes* EGDe и *L. innocua* SLCC3379 в соотношениях 1:1, 1:5, 1:10 и наносили смешанные культуры на ВНИ-агар. Колонии двух видов были морфологически неразличимы, но дот-иммуноанализ с конъюгатом α -InlB-IgG-HRP, нанесенным на отпечатки колоний, позволило однозначно идентифицировать колонии как положительные (рис. 23). Доля положительных колоний соответствовала процентному содержанию *L. monocytogenes* в смешанной культуре. На рис. 23 и 24 показаны результаты для соотношения 1:1.

Для подтверждения результатов положительные и отрицательные колонии были протестированы с помощью ПЦР с праймерами InlBF и InlBR (см. Материалы и методы). Только колонии, которые были положительными в дот-иммуноанализе, давали сигнал в ПЦР-анализе, что подтверждает специфичность анализа (рис. 23С). Также это доказывает, что анализ с помощью дот-блоттинга дифференцировал *L. monocytogenes* от *L. innocua* в смешанной культуре.

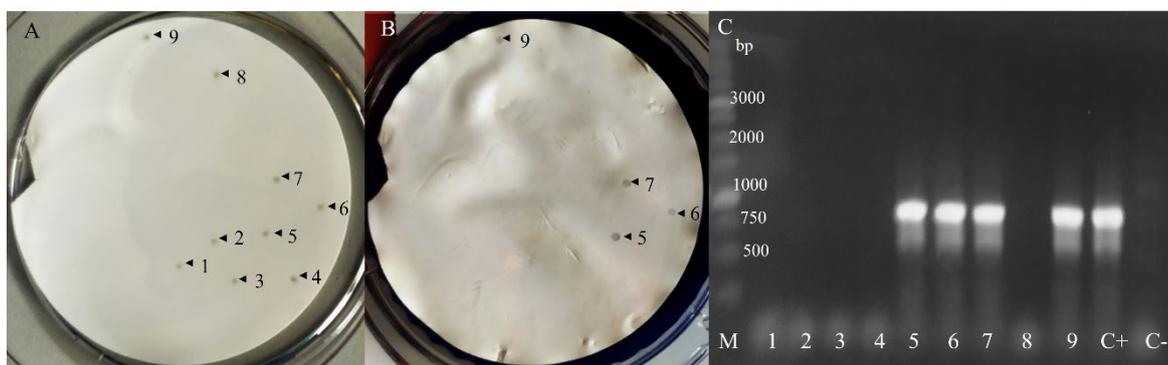


Рис. 23. Проверка результатов дот-блоттинга. *L. monocytogenes* EGDe и *L. innocua* SLCC 3379 взяты в соотношении 1:1 и выращены на агаре ВНС в течение 24 ч. Отпечатанные колонии отбирали перед отмывкой, затем мембрану обрабатывали конъюгатом α -InlB-IgG-HRP, как описано выше. Для идентификации *L. monocytogenes* была проведена ПЦР с использованием праймеров, специфичных к гену *inlB*. А – отпечатки колоний, выращенных на ВНС-агаре; Б – результаты дот-иммуноанализа после отпечатывания на мембране; В – продукты ПЦР были разделены на 1 % агарозном геле, фрагмент гена *inlB* имеет размер 872 п.н. Цифрами обозначены отдельные колонии.

Для того чтобы подтвердить, что колонии принадлежат к виду *L. monocytogenes* также использовался «Набор реагентов для выявления ДНК *Listeria monocytogenes* методом ПЦР» (ДНК-технология). Постановка реакции описана в «Материалах и методах». Таким образом было дополнительно показано, что колонии 5, 6, 7, 9 принадлежат к виду *L. monocytogenes*.

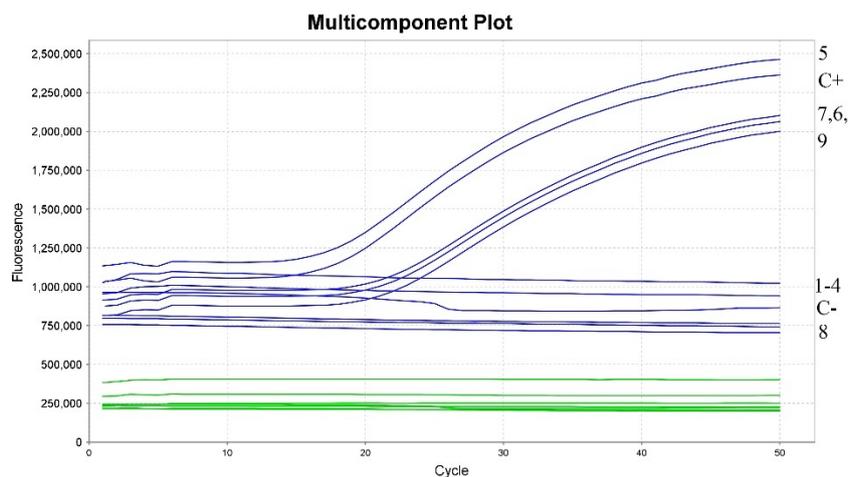


Рис. 24 ПЦР в реальном времени с использованием набора «ДНК-технология для подтверждения результатов дот-иммуноанализа для смешанных культур; цифры 1-9 соответствуют номерам колоний из рис. 23

4.3. Применение разработанного дот-иммуноанализа для выявления *L. monocytogenes* в сыром молоке

Образцы сырого молока, приобретенные на рынке, были инокулированы 1, 10, 10^2 или 10^3 КОЕ/мл штаммом *L. monocytogenes* EGDe. Инокулированные образцы молока высевали на ВНИ-агар, содержащий 0,2% уголь (ВНИС-агар), а выращенные колонии анализировали с помощью дот-иммуноанализа, как описано выше (рис. 25). Параллельно те же образцы наносили на селективный PALCAM-агар для анализа выращенных колоний методом ПЦР. Обнаружение такой незначительной концентрации *L. monocytogenes*, как 1 КОЕ/мл, было успешным в одном эксперименте с использованием дот-иммуноанализа и в двух экспериментах с использованием PALCAM-агара, дополненного проверкой колоний ПЦР. Результаты всех трех экспериментов были успешными с обоими методами, когда использовались более высокие концентрации бактерий, начиная с 10 КОЕ/мл. Согласно подсчету колоний,

чувствительность метода PALCAM/PCR была несколько выше, чем чувствительность дот-иммуноанализа (таблица 6; $p < 0,05$). Это несоответствие может быть вызвано конкуренцией и чрезмерным ростом молочной микрофлоры. Использование селективной среды не подходит для метода, основанного на обнаружении *InlB*, поскольку *InlB* слабо экспрессируется в селективных средах [79]. Тем не менее, полученные результаты показали, что чувствительность разработанного дот- иммуноанализа варьировала от 1 до 10 КОЕ/мл. Такой же диапазон наблюдался для метода PALCAM/PCR.

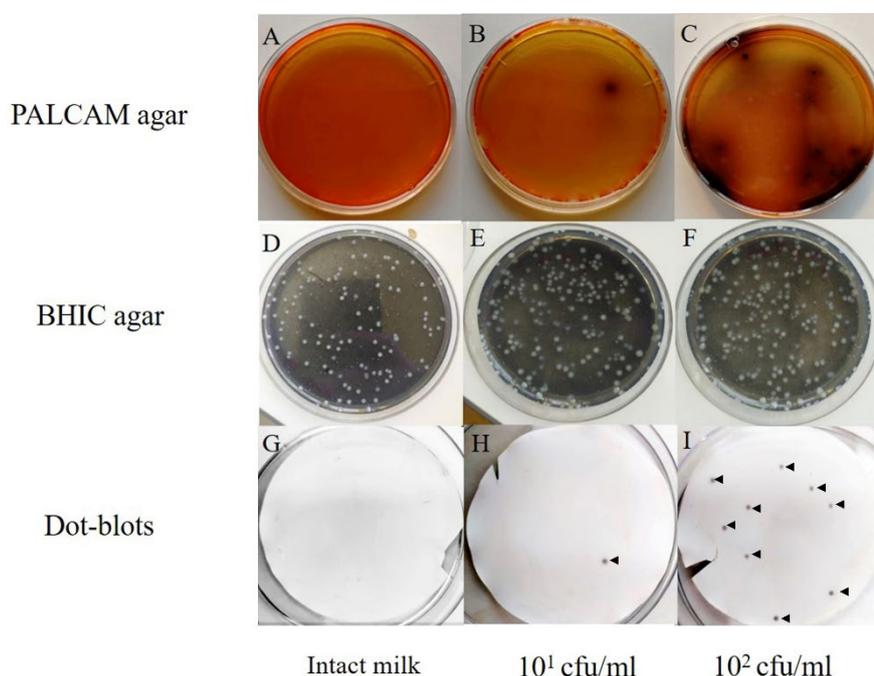


Рис. 25. Обнаружение *L. monocytogenes* в образцах искусственно инокулированного молока. Образцы сырого молока инокулировали *L. monocytogenes* EGDe до указанных концентраций. Образцы объемом 100 мкл наносили на селективный PALCAM и неселективный BHC-агар. Принадлежность к виду *L. monocytogenes* была подтверждена методом ПЦР для бактерий, выращенных на агаре PALCAM, и разработанным методом дот-блот-иммуноанализа для бактерий, выращенных на агаре BHC. А, В, С – образцы молока, нанесенные на агар PALCAM; D, E, F - образцы молока, нанесенные на агар BHC, обратите внимание на рост внутренней микрофлоры молока; G, H, I - результаты дот-иммуноанализа с образцами, выращенными

ВНІС. А, D, G – интактное молоко; В, Е, Н – 1 мл пробы молока инокулировали 10 КОЕ/мл; С, F, I -1 мл пробы молока инокулировали 100 КОЕ/мл. Стрелки показывают точки, соответствующие колониям *L. monocytogenes*.

	Отрицательный контроль (интактное молоко)		1 КОЕ/мл		10 КОЕ/мл	
	PALC АМ/П ЦР	Дот- анализ	PALCA М/ПЦР	Дот- анализ	PALCA М/ПЦР	Дот- анализ
Эксперимент 1	0	0	1	1	11	8
Эксперимент 2	0	0	1	0	8	6
Эксперимент 3	0	0	0	0	9	8

Таблица 6. Обнаружение *L. monocytogenes* в образцах молока, искусственно инокулированных 1 и 10 КОЕ/мл *L. monocytogenes* EGDe

V часть. Свойства idInlB как лиганда человеческих рецепторов.

5.1. Константы связывания изоформ idInlB с рецепторами c-met и gC1q-R.

Константы диссоциации взаимодействия изоформ idInlB с рецепторами c-Met и gC1q-R были определены методом микротермофореза. Для этого был взят рекомбинантный внеклеточный домен c-Met, непосредственно связывающийся с интерналиновым доменом. Рецептор титровали в диапазоне концентраций от 0,076 нМ до 2,5 мкМ против флуоресцентных меченных idInlB взятых в концентрации 50 нМ. Нормализованное значение термофореза $F_{\text{norm}}\%$, нанесенное на график в зависимости от концентрации idInlB, соответствовало модели связывания 1:1, что приводило к константе диссоциации для idInlB_{CC1} $K_d = 7,4 \pm 1,3$ нМ (Табл. 7). Исследования, в которых использовались, связанные на подложке idInlB или c-Met, дали более высокие значения константы диссоциации в диапазоне от 20-30 нМ до 150 нМ [40, 92]. Значения K_d для взаимодействий HGF с c-Met, находились в аналогичном диапазоне от 3,5 нМ до 20-30 нМ в зависимости от используемого метода [63, 138, 162]. Таким образом наши данные продемонстрировали, что *in vitro* сродство idInlB_{CC1} было аналогичным рчHGF.

	c-Met	gC1q-R
InlB _{CC1}	$7,4 \pm 1,3$	$7,4 \pm 0,8$
InlB _{CC7}	$93,6 \pm 11,5$	$10,2 \pm 0,9$
InlB _{CC9}	$58,7 \pm 18,5$	$21,5 \pm 1,0$

Таблица 7. Определение константы для рецепторов c-Met и gC1q-R 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 взаимодействие изоформ idInlB с рецептором gC1q-R.

Данные о взаимодействии InlB с рецептором gC1q-R противоречивы. С одной стороны, роль gC1q-R в InlB-опосредованной клеточной инвазии подтверждается конкурентным анализом и экспериментами по адаптации InlB-игнорирующих клеток морских свинок *L. monocytogenes* путем введения человеческого gC1q-R. С другой стороны, взаимодействия gC1q-R с C-концевыми GW-доменами InlB (консервативный дипептид Gly-Trp (GW)) стимулируют высвобождение InlB с поверхности бактерий и противодействуют передаче сигналов c-Met, индуцируемой взаимодействиями интерналиновый домен-c-Met.

Для уточнения потенциальных различий во взаимодействия различных изоформ idInlB с gC1q-R, мы провели иммуноферментный и конкурентный анализ. Все варианты idInlB взаимодействовали с gC1q-R *in vitro*, хотя специфичность взаимодействий была разной. При концентрации 0,4 мкг/мл специфичный для линии I idInlB_{CC1} связывал белки gC1q-R лучше, чем оба idInlB линии II (рис. 26). При концентрациях выше 0,4 мкг/мл эффективность связывания gC1q-R была одинаковой для всех изоформ.

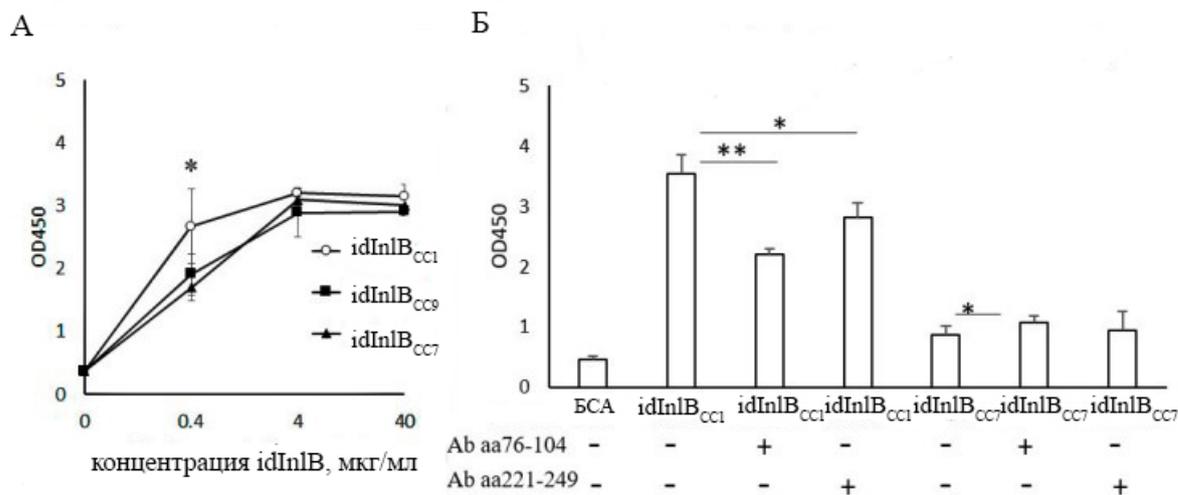


Рис. 26 Исследование взаимодействий между idInlBs и gC1q-R *in vitro* с использованием иммуноферментного и конкурентного анализа. Лунки планшета были покрыты рекомбинантным человеческим gC1q-R. А) Кривая насыщения, демонстрирующая связывание трех изоформ idInlB с gC1q-R; очищенные idInlB добавляли в концентрациях 0-40 мкг/мл) конкурентный анализ; поликлональные антитела против олигопептидов, специфичных для центральной (аминокислоты 76-104) и С-концевой (аминокислоты 221-249) частей gC1q-R, добавляли в концентрации 4 мкг/мл за 1 ч до добавления idInlBs в концентрации 0,4 мкг/мл. Бычий сывороточный альбумин использовали в качестве отрицательного контроля, а idInlBs без антител использовали в качестве положительного контроля. Показаны средние значения \pm SD из трех экспериментов, выполненных в трех экземплярах; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Чтобы проверить, были ли взаимодействия между изоформами idInlB и gC1q-R специфичными, был проведен конкурентный анализ. Так как оба варианта idInlB линии II показывали схожую кинетику связывания (линия II), в этом анализе был использован только один из них idInlB_{CC7}. idInlB_{CC7} сравнивали со специфичным для линии I idInlB_{CC1}. Оба idInlB были взяты в концентрации 0,4 мкг/мл. Антитела против центральной области человеческого gC1q-R (аминокислоты 76-104) и против С-концевой области

gC1q-R (аминокислоты 221-249), были использованы для блокирования связывания idInlB. Связывание idInlB_{CC1} было частично заблокировано антителами против центральной области человеческого gC1q-R (в 1,6 раза, $p < 0,01$; Рис. 25) и в меньшей степени антителами против С-концевой области gC1q-R (в 1,25 раза, $p < 0,05$). Связывание idInlB_{CC7} не зависело от антител. Показана статистическая значимость конкурентного анализа относительно соответствующего положительного контроля.

5.3 Влияние рекомбинантных изоформ idInlB на внутриклеточные процессы в эпителиальных клетках.

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/AKT/mTOR сигнальный путь, соответственно. после внесения очищенных препаратов idInlB в среду культивирования клеток HEp-2

Киназы Erk1/2 и Akt представляют собой MAPK- и PI3K-контролируемые пути, которые представляют собой центральные сигнальные каскады, запускаемые связыванием лиганда с-Met. Мы обнаружили заметно различную динамику фосфорилирования как Erk1/2, так и Akt в зависимости от того, какой вариант idInlB был применен (рис. 27).

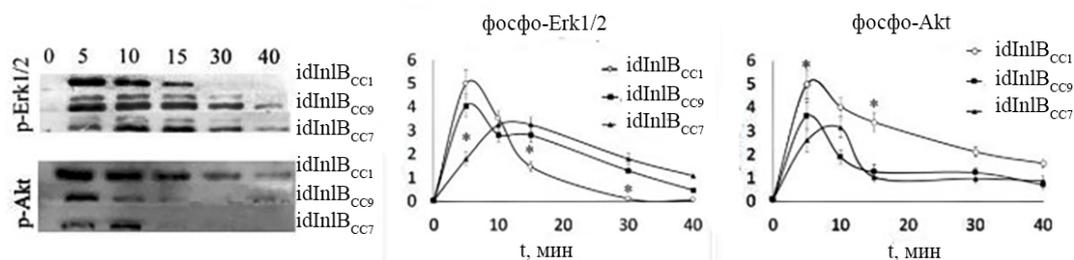


Рис. 27. Кинетика Erk1/2 и Akt фосфорилирования в присутствии idInlBs. 100 нг/мл idInlB было добавлено к клеткам HEp-2. Клетки были лизированы в соответствующие временные точки и проанализированы с антителами против фосфорилированных Erk1/2 и Akt. Кривые показывают оцифрованные данные из трех независимых экспериментов. * $p < 0,05$.

Как idInlB_{CC9} линии II, так и idInlB_{CC7} вызывали сходную кинетику появления фосфо-Erk1/2 и фосфо-Akt в каждый момент времени, но через 5 мин. Напротив, добавление idInlB_{CC1} линии I обеспечивало иную кинетику фосфорилирования Erk1/2 и Akt. idInlB линии II вызывал фосфорилирование киназы Erk1/2 более 40 мин, в то время как добавление idInlB_{CC1} линии I вызывало фосфорилирование Erk1/2 не более 30 мин.

Фосфорилирование Akt-киназы было более продолжительным при добавлении idInlB_{CC1}. Влияние idInlBs линии II на фосфорилирование Akt было менее выраженным как по интенсивности, так и по продолжительности. В течение первых минут после добавления idInlB_{CC7} вызывал заметно различную эффективность фосфорилирования Erk1/2 и Akt по сравнению с обоими другими вариантами. Для idInlB_{CC1} и idInlB_{CC9} максимальное накопление фосфо-Erk1/2 и фосфо-Akt наблюдалось через 5 мин после добавления белка, в то время как обе фосфорилированные киназы заметно увеличивались между 5 и 10 мин после добавления idInlB_{CC7}.

Вариант idInlB_{CC1} (филогенетическая линия I) стимулировал более короткую активацию Erk1/2, киназы MAPK-сигнального пути, и более

длинную активацию Akt, киназы PI3k/Akt- сигнального пути, по сравнению с вариантами idInlB_{CC9}, idInlB_{CC7} (филогенетическая линия II).

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 дальнейших приложениях.

VI. Терапевтические применения idInlB_{CC1}

6.1. Митогенная активность IdInlB_{CC1} *in vitro*

Для оценки возможности использования фактора патогенности *L. monocytogenes* InlB в процессах регенерации печени из трех изоформ была выбрана изоформа интерналинового домена InlB, принадлежащая клональному комплексу CC1 (idInlB_{CC1}). Этот вариант отличался максимальной активностью *in vitro* при минимальных побочных эффектах.

Пролиферативный потенциал idInlB_{CC1} был протестирован на клетках HepG2 в анализе МТТ (рис. 28). idInlB_{CC1} оказывал дозозависимое действие на клетки HepG2 через 48 ч после добавления. idInlB_{CC1}, взятый в дозе 250 нг/мл, вызывал увеличение количества клеток в 1,21 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$). рчHGF, в дозе 100 нг/мл (концентрация, рекомендованная производителем) вызывал увеличение количества клеток в 1,37 раза ($p < 0,05$). При высоких концентрациях 500 и 1000 нг/мл idInlB_{CC1} вызывал снижение количества жизнеспособных клеток, что указывает на умеренный цитотоксический эффект.

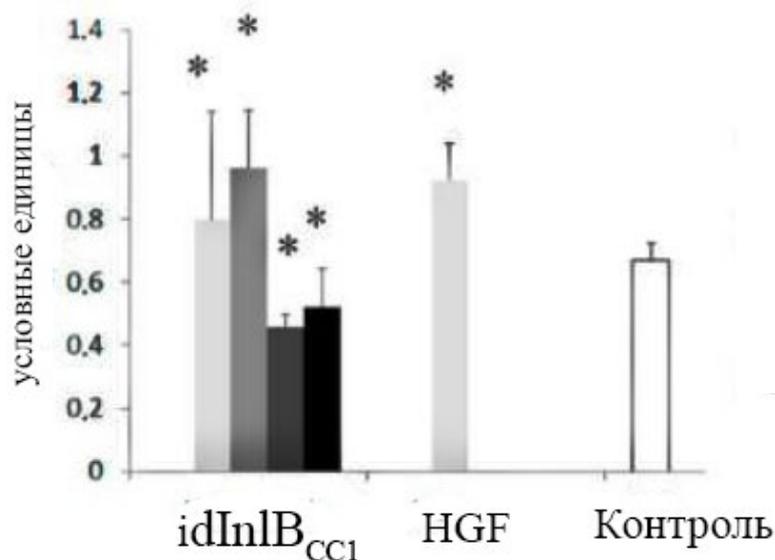


Рис. 28. МТТ-тест выживаемости и пролиферации клеток HepG2. Клетки выращивали в течение 72 ч с увеличением концентрации IdInlB_{CC1} (100, 250, 500 или 1000 нг/мл) или рчHGF (100 нг/мл). * p < 0.05

6.2. idInlB_{CC1}-стимулированная активация сигнального пути MAPK- и PI3K/Akt *in vitro*

Каскады MAPK и PI3K/Akt играют центральную роль в передаче сигналов, управляемых HGFR. Внеклеточная сигнально-регулируемая киназа 1/2 (Erk1/2) принадлежит к семейству MAPK и контролирует начальные стадии каскада MAPK, в то время как Akt/ПКВ является ключевой киназой сигнального пути PI3K/Akt [18]. Иммуноокрашивание клеток антителами против фосфо-Erk1/2 показало, что как рчHGF, так и IdInlB_{CC1}, приводят к фосфорилированию и доставке фосфор-Erk1/2 в ядро что является необходимым условием для митогенеза (рис. 28).

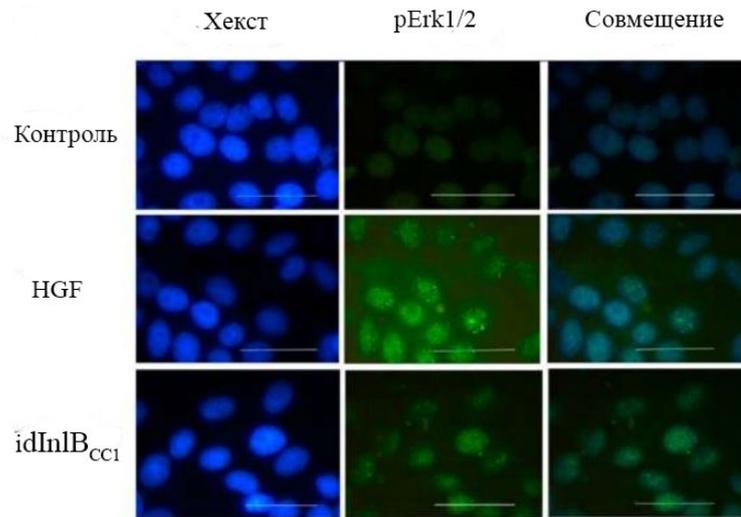


Рис. 29. Распределение pErk1/2 в клетках. Клетки обрабатывали idInlB_{CC1} или рчHGF в течение 15 мин. Для маркировки ядер использовали краситель Хекст. Клетки обрабатывали антителами против pErk1/2 и вторичными антителами, меченными Alexa Fluor 488. Изображения получали с помощью флуоресцентной микроскопии.

Для сравнения активности IdInlB_{CC1} и рчHGF применяли вестерн-блоттинг и ИФА (рис.26). Вестерн-блоттинг продемонстрировал четкую индукцию Erk1/2 и Akt-контролируемых путей в клетках, стимулированных 250 мкг/мл IdInlB_{CC1} или 100 мкг/мл рчHGF (рис. 29).

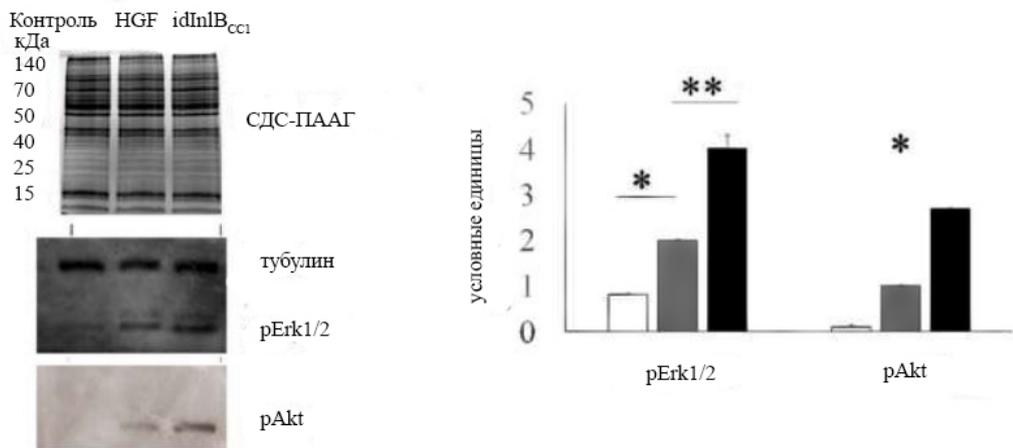


рис. 30. Окрашивание SDS-PAGE Coomassie R-250 и вестерн-блоттинг с использованием антифосфо-Erk1/2, антифосфо-Akt и антител, специфичных к

тубулину. Клеточные лизаты были получены из клеток, обработанных IdInlBCC1 (250 нг/мл) или рчHGF (100 нг/мл) в течение 15 мин; денситограмма показывает соответствующие значения (белый, серый и черный столбцы для контроля, HGF и idInlBCC1 соответственно)

Полуколичественный анализ ИФА показал, по крайней мере, в 3,5 и 1,7 раза более высокие эффекты IdInlBCC1 по сравнению с рчHGF по фосфорилированию Erk1/2 и Akt (рис. 31 $p < 0,01$).

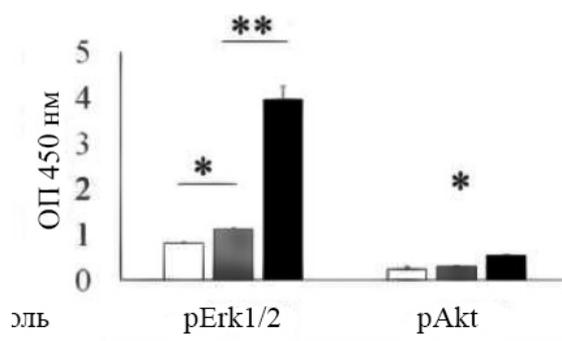


Рис. 31 Измерение уровня pErk1/2 и pAkt при помощи InstantOne ELISA™ (Invitrogen) (белый, серый и черный графики для контроля, HGF и IdInlBCC1 соответственно) Данные представляют собой средние значения \pm SD; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Таким образом, IdInlBCC1 активирует Erk1/2 и Akt-контролируемые сигнальные пути и обеспечивает митогенный эффект *in vitro*, что говорит о том, что

6.3. Оценка токсичности idInlBCC1 у мышей

Токсические эффекты *in vitro* idInlBCC1 при введении в высоких дозах предполагают потенциальную токсичность *in vivo*. Чтобы проверить

токсичность для мышей, IdInlB_{CC1} вводили внутривенно в концентрациях от 2 нг на г веса животного (нг/г) до 2000 нг/г. Для макроскопического и гистологического анализа печень брали через 48 ч после инъекции. При самой низкой дозе 2 нг/г никаких макроскопических изменений не наблюдалось, в то время как более высокие дозы вызывали легкие изменения цвета печени (рис. 32А). Гистологический анализ выявил изменения в ткани печени при более высоких дозах. Дистрофия гепатоцитов наблюдалась после применения 200 нг/г IdInlB_{CC1} и дистрофические изменения увеличивались при концентрации 2000 нг/г (Рис. 32Б). Между тем, структура ткани печени не была полностью нарушена при концентрации 2 нг/г, и поэтому она считалась концентрацией без наблюдаемых побочных эффектов.

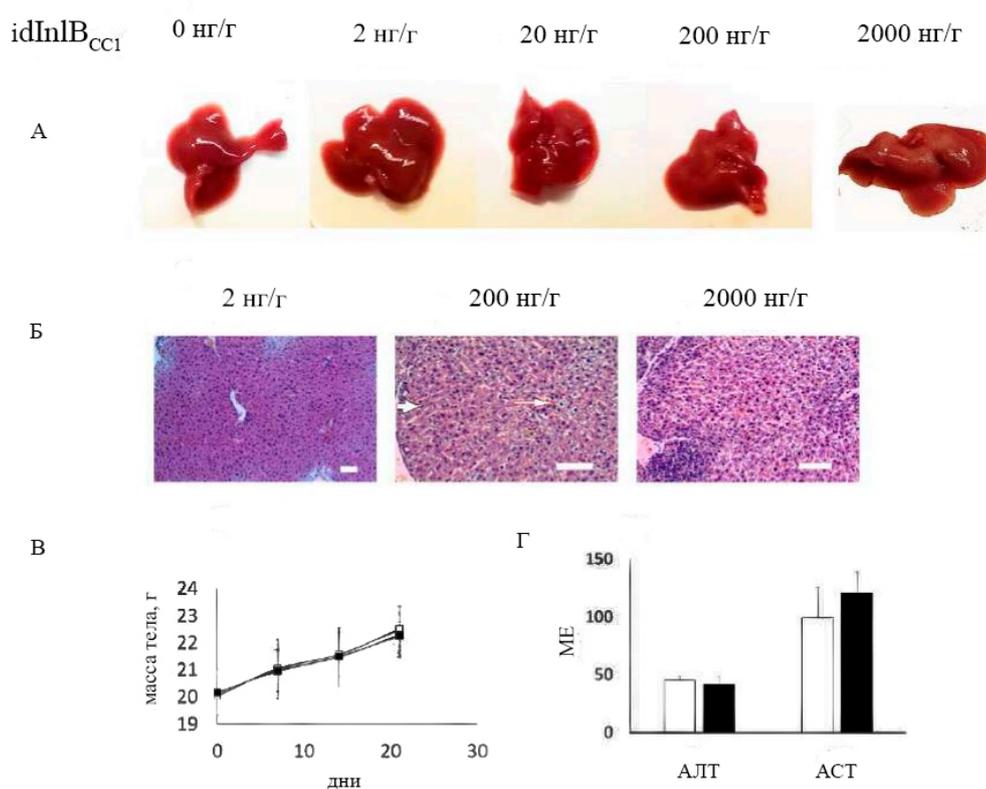


Рис. 32 Анализ токсичности IdInlB_{CC1} у мышей BALB/c. (А, Б) Мышам вводили растворитель (PBS) или разведения IdInlB_{CC1} (2-2000 нг на г веса животного, г). Печень была взята для макроскопического (А) и патогистологического (Б) исследования через 48 ч после лечения. Стрелка

показывает дистрофические изменения в печени животных, которым давали 200 и 2000 нг/г idInlB_{CC1}; шкала 100 мкм. (В, Г) Количество 2 нг/г InlB_{CC1} вводили два раза в неделю в течение 3 недель; измеряли массу тела еженедельно (В); в конце эксперимента брали сыворотку для измерения маркеров повреждения аминотрансферазы (АЛТ) и аспаратаминотрансферазы (АСТ) (Г).

Еженедельное наблюдение показало аналогичную динамику массы тела у животных, получавших белки в концентрации 2 нг/г и растворитель два раза в неделю. Инъекции idInlB_{CC1} не изменяли биохимические параметры, характеризующие повреждение клеток, такие как наличие аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспаратаминотрансферазы (АСТ) в сыворотке крови, измеренные на 21-й день эксперимента (рисунок 32Г). Гистологическое обследование печени, проведенное на 21-й день, не выявило патологических изменений, связанных с применением IdInlB_{CC1} при такой концентрации.

Таким образом, концентрация 2 нг/г являлась безопасной для мышей и в дальнейшем ее использовали для оценки гепатопротективного эффекта и регенеративного эффекта.

6.4 Гепатопротективная активность IdInlB_{CC1}

Полученные результаты показали, что 2 нг на грамм веса животного IdInlB_{CC1} безопасны для мышей. Мы использовали эту концентрацию для проверки гепатопротективного эффекта idInlB_{CC1} при остром повреждении печени. idInlB_{CC1} в концентрации 2 нг/г или рсHGF в концентрации 2 нг/г вводили внутривенно за 2 ч до повреждения печени, вызванного внутрижелудочной инъекцией CCl₄. Печень удаляли через 48 ч после токсического воздействия. Визуальное сравнение печени показало, что InlB_{CC1}

снижает характеристики макроскопической деструкции острого повреждения печени CCl_4 (рис. 33А). Визуальные данные подтверждались относительным уменьшением массы печени по сравнению с животными, получавшими растворитель (рис. 34Б). Средняя масса печени составляла 1,51, 1,27 и 1,15 г для животных, которые получали растворитель, InlB_{CC1} и HGF, соответственно.

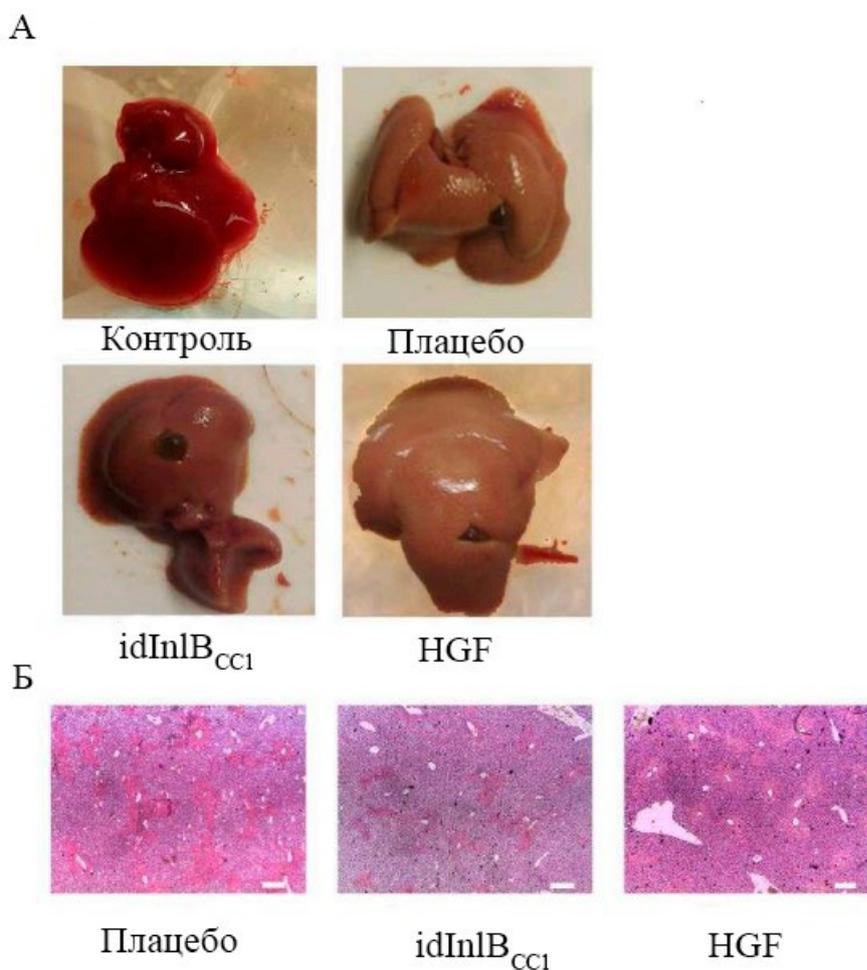


Рис.33 $\text{IdInlB}_{\text{CC1}}$ оказывает гепатопротекторное действие. Мыши получали CCl_4 внутрижелудочно. За 2 ч до повреждения печени вводили внутривенно дозу InlB_{CC1} 2 нг/г или 2 нг/г рчHGF. Печень была извлечена через 48 ч после повреждения печени.

(А) Макроскопические изменения в печени; (Б) гистопатологические изменения в печени; шкала 250 мкм;

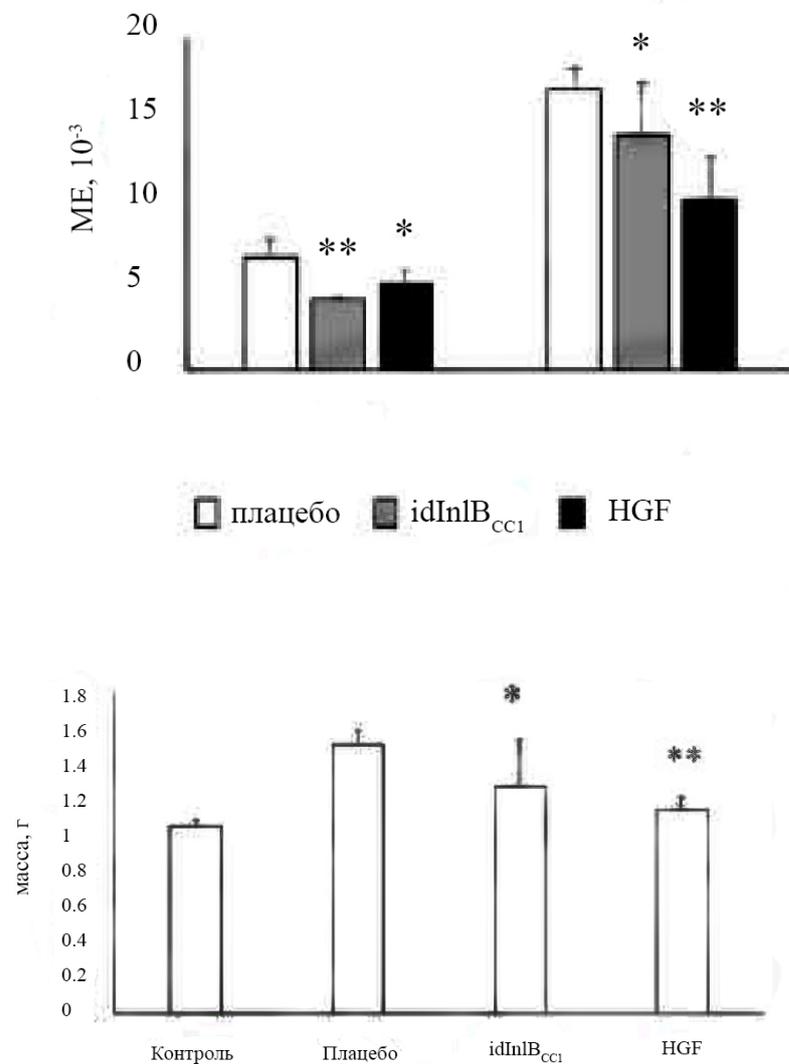


Рис. 34 (А) накопление аминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ) в сыворотке. Б) изменение массы печени. Данные представляют собой средние значения \pm SD; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Гистологический анализ выявил множественные очаги центрилобулярного, перипортального и очагового некроза у животных, получавших CCl₄ (рис. 33Б). При использовании idInIB_{CCl4} заметно

уменьшилась общая площадь некроза. Некротические участки составляли 24,0%, 16,18% и 21,66% от общей площади для животных, получивших носитель, idInlB_{CC1} и рчHGF, соответственно. Очаговый некроз практически отсутствовал при профилактическом применении idInlB_{CC1}. Применение рчHGF также заметно уменьшало очаговый некроз. Как idInlB_{CC1}, так и рчHGF снижали концентрации АЛТ и АСТ в сыворотке крови (рис. 34А).

6.5. Регенеративный потенциал idInlB_{CC1} *in vivo* на модели 70% частичной гепатэктомии.

Ранее проведенное стандартное тестирование не выявило сильной острой токсичности IdInlB_{CC1} и предоставило данные об оптимальной дозе idInlB_{CC1}, которая составляла 2 нг/г.

Чтобы оценить регенеративный потенциал *in vivo* на модели 70% частичной гепатэктомии, мы вводили idInlB_{CC1} внутривенно в концентрации 2 нг/г на второй, четвертый и шестой день после операции. Затем, через 7 дней после резекции, животных умерщвляли, печень взвешивали и получали гистологический доступ.

У животных, получавших idInlB_{CC1}, и контрольных животных индекс массы печени (ИМП) соответственно составил $2,9 \pm 0,12\%$ и $2,0 \pm 0,47\%$ ($p < 0,05$, рис. 35). ИМП животных, получавших IdInlB_{CC1}, достиг 88% относительно ИМП животных, которым не вводился белок, в то время как у контрольных животных он составлял 62%. Эти данные продемонстрировали, что idInlB_{CC1} ускоряет восстановление массы печени.

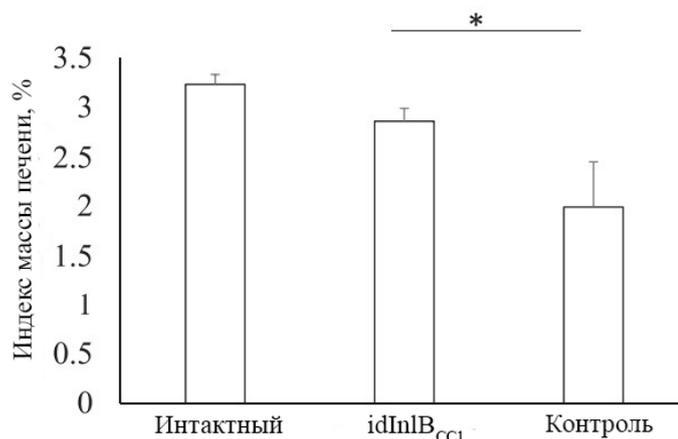


Рис. 35. Индекс массы печени (ИМП) у крыс после 70% гепатэктомии.

Процесс регенерации печени после 70% гепатэктомии включает деление и гипертрофию гепатоцитов [98, 100, 122]. Чтобы оценить потенциал IdInlB_{CC1} для стимуляции пролиферации гепатоцитов, мы провели анализ параметров ядерного класса, таких как процент двуядерных клеток и диаметр ядра на гистологических препаратах печени. Было показано, что увеличение ploидности гепатоцитов из-за нетрадиционного цикла клеточного деления важно для регенерации печени после 70% гепатэктомии [100]. Затем 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 $4,0 \pm 1,8\%$ у животных, получавших IdInlB_{CC1}, и контрольных животных, соответственно, $p < 0,05$; рис. 36).

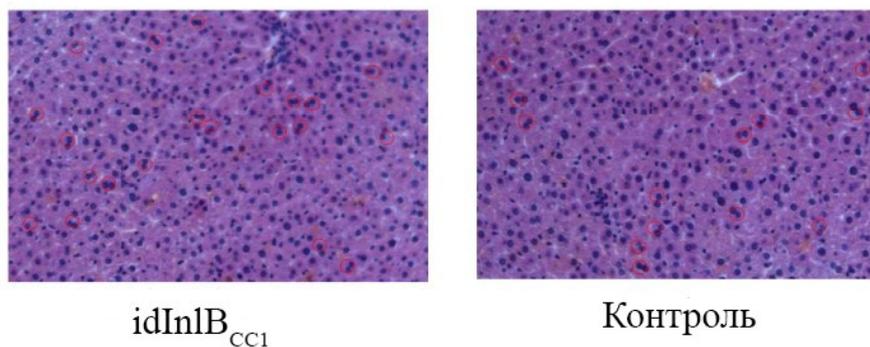


Рис. 36 Срезы регенерированной печени обработанных idInlB_{CC1} и контрольных животных, образцы двуядерных клеток показаны красными кружками.

Диаметр ядра является еще одним параметром, характеризующим активность клеточной пролиферации [71]. Автоматический подсчет распределения диаметра ядер показал явное увеличение процентного возраста ядер с большим диаметром у животных, получавших IdInlB_{CC1}, по сравнению с контролем (рис. 37). Наблюдаемая разница в диаметре ядра подтверждала улучшенную активность пролиферации гепатоцитов у животных, получавших IdInlB_{CC1}.

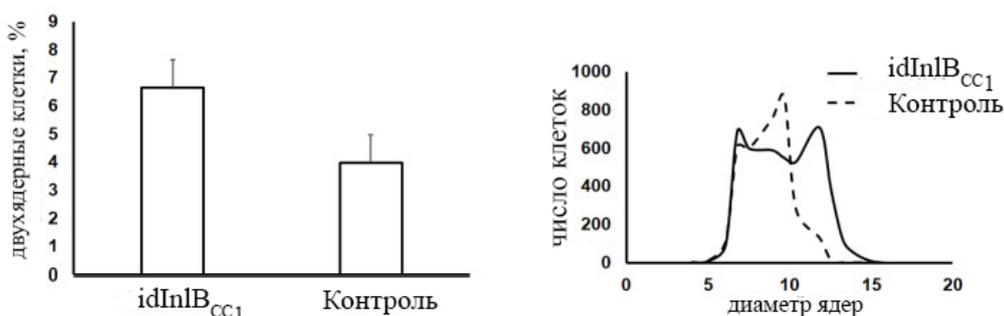


Рис. 37 А. Процентное содержание двуядерных клеток, подсчитанных для 10 срезов печени. Б. Машинная оценка распределения диаметра ядер, выполненная для 4331 и 3831 ядер.

Для дальнейшей оценки пролиферирующей активности гепатоцитов мы применили иммунофлуоресцентное окрашивание Ki67. Ручное количественное определение ядер, окрашенных Ki67, дало 19,8 и 0,6% положительных ядер у животных, получавших idInlB_{CC1}, и контрольных животных, соответственно (рис. 38А). Машинная оценка продемонстрировала различное распределение интенсивности окраски с явным преобладанием более высокого накопления красителя у животных, получавших idInlB_{CC1}, что подтверждает ручную оценку (рис. 38Б).

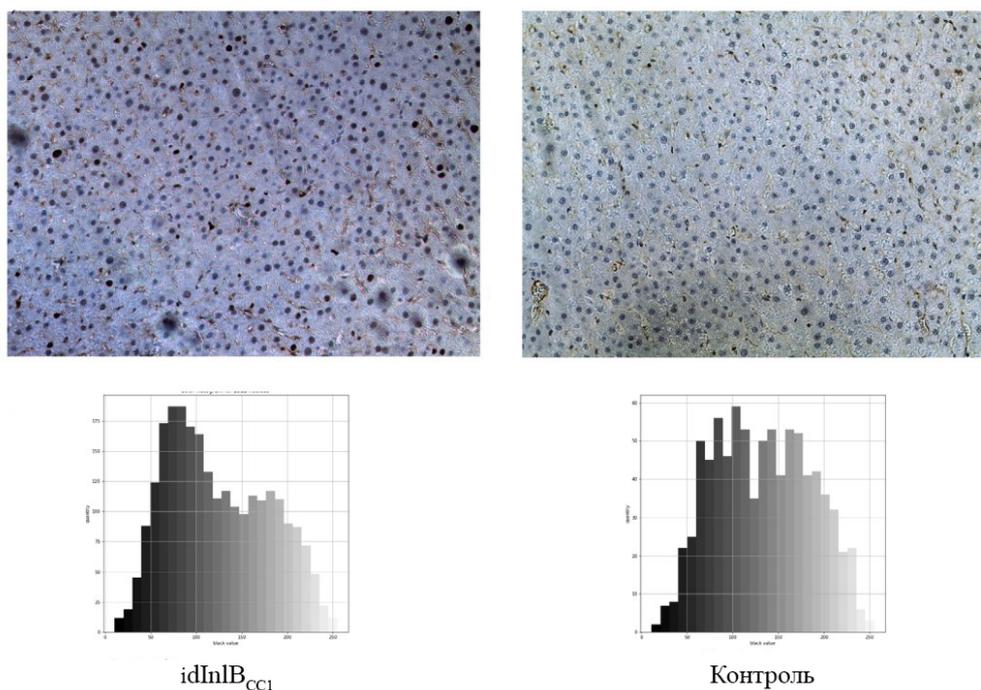


Рис. 38 Иммуногистохимический анализ срезов печени, взятых на седьмой день. (А) Репрезентативные окрашенные Ki67 срезы регенерированной печени обработанных idInIB_{CC1} контрольных животных. (Б) Соответствующая машинная оценка распределения цвета ядра

Ki67 экспрессируется в фазах G1-M клеточного цикла, но не в фазе G0 [97]. Таким образом, полученные результаты продемонстрировали, что InIB_{CC1} стимулировал вступление гепатоцитов в клеточный цикл после 70% гепатэктомии. Было показано, что пролиферация и гипертрофия гепатоцитов способствуют регенерации печени после 70% гепатэктомии [95, 98, 100]. В нашем исследовании мы не заметили заметной разницы в размере клеток между животными, получавшими idInIB_{CC1}, и контрольными животными, что позволяет предположить, что изменения гепатоцитарной гипертрофии схожи.

Однако полученные данные ясно показали крупный гепатоцит, вступающий в клеточный цикл, стимулированный после обработки IdInlB_{CC1}. 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.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Бактерия *L. monocytogenes* является важным патогеном пищевого происхождения. *L. monocytogenes* широко распространена в природе и является частым контаминантом в фермерских хозяйствах и на пищевых производствах, часто присутствует в молочных продуктах, что подчеркивает важность эпиднадзора за этим патогеном [56]. Большинство методов обнаружения этой бактерии в пищевых продуктах требуют селективного обогащения с использованием традиционных методов культивирования бактерий, которые могут быть довольно трудоемкими.

Современные методы культивирования, в которых используются различные обогащающие и селективные среды, имеют большое значение для обнаружения *L. monocytogenes* в образцах пищевых продуктов и окружающей среды. Эти методы надежны, но затратны по времени. Методы, основанные на ПЦР и MALDI-TOF, обеспечивают наилучшие результаты для дифференциации *Listeria spp.* [8, 32, 67]. Однако эти методы являются дорогостоящими и требуют специализированного оборудования и специальных технических знаний.

Иммунологические подходы являются более быстрыми, простыми и удобными в использовании, и для обнаружения *L. monocytogenes* в пищевых продуктах, окружающей среде и клинических образцах были разработаны различные варианты такого способа, включая ИФА, РЛА, иммунофлуоресцентный анализ и т. д. Эти методы зависят от конститутивной экспрессии антигенов *L. monocytogenes* и специфичности используемых антител. Несмотря на то, что чувствительность и специфичность анализов иммунологических подходов были значительно улучшены за последнее время по-прежнему возникают трудности, которые требуют дальнейшей проверки перед их использованием [86].

Применение иммунологических методов часто ограничивается совместным использованием антигенов клеточной поверхности с другими видами *Listeria spp.*, что не позволяет дифференцировать *L. monocytogenes* от непатогенных видов, часто встречающихся в образцах пищевых продуктов. Для разработки надежных иммунологических тестов требуется использование специфических антигенных маркеров *L. monocytogenes*.

Так, например, была описана система ИФА, которая обеспечивает эффективную идентификацию *L. monocytogenes* с использованием бактериальных лизатов [161]. В данной работе были использованы моноклональные антитела, разработанные против пептидов поверхностного белка р60. Используя моноклональные антитела против производного р60-специфического пептида *L. monocytogenes* PepD, Сапо et al. разработали флуоресцентный сэндвич-иммуноанализ, который позволял проводить анализ в течение 12 ч с пределом обнаружения всего 10^2 КОЕ/мл [21].

К белкам, которые характерны только для *L. monocytogenes*, также относят InlB. InlB принадлежит к семейству интерналиноподобных белков, обнаруженных в *Listeria spp.* [36]. Эти белки имеют сходную структуру, но имеют заметно отличающиеся последовательности, обеспечивающие специфические взаимодействия с различными мишенями [95]. Мы показали, что InlB, присутствующий также у патогенного только для животных *L. ivanovii* обладает низкой гомологией с InlB у *L. monocytogenes*.

В этой работе мы получили очищенные препараты рецептор-связывающего домена InlB – idInlB, характерные для трех клональных комплексов CC1, CC7 и CC9 *L. monocytogenes*. Используя многостадийную схему очистки, получили моноспецифические поликлональные антитела против idInlB из сыворотки крови иммунизированного кролика. Специфичность антител была проверена в ИФА и иммуноблоте на штаммах, принадлежащих к роду *Listeria*, включая патогенные *L. monocytogenes* и

непатогенные для человека *L. ivanovii* и *L. innocua*. Было подтверждено, что антитела связывают полноразмерный InlB.

Для того чтобы оценить уровень экспрессии InlB на поверхности клеток *L. monocytogenes*, мы использовали полученные антитела в иммуноферментном анализе. Показано, что несмотря на различия в уровне экспрессии, все штаммы *L. monocytogenes* продуцируют белок InlB на среде ВНІ, содержащий 0,2 % активированного угля. В целом это подтверждает данные полученные Lathrop в соавт. [79]: на неселективных средах, таких как ВНІ и LB, InlB хорошо экспрессируется у большинства штаммов.

Для быстрой идентификации *L. monocytogenes* в данной работе мы предложили простой метод, который сочетал рост бактерий на неселективной среде, усиливающей продукцию факторов патогенности, и дот-иммуноанализ с использованием антител, специфичных к InlB. Усиление продукции было достигнуто за счет включения в состав среды активированного угля. Ранее в работах нашей лаборатории было показано, что включение в состав богатых питательных сред, таких как ВНІ (Brfain-Heart Infusion) или ГРМ№1 (Оболенск), гидрофобных адсорбентов (активированного угля или Amberlite XAD-4 приводит к активации регулона патогенности *L. monocytogenes*[41, 42]. Активация регулона патогенности связана с активацией центрального регулятора транскрипции этого регулона, белка PrfA. Активность PrfA подавляется в присутствии в среде гидрофобных олигопептидов, как экзогенного, так и эндогенного происхождения [75]. Такой подход как переключение активности регулона патогенности путем включения в среду адсорбента с целью выявления специфических маркеров *L. monocytogenes* был впервые предложен сотрудниками нашей лаборатории в тесте на лецитиназную активность, который был включен в Госстандарт по выявлению *L. monocytogenes* в продуктах питания (Государственный стандарт Российской Федерации Р 51921-2002. Продукты пищевые. Методы выявления и

определения бактерий *Listeria monocytogenes*. Госстандарт России. Москва. 2002. 17 стр.).

Полученными в данной работе результатами было продемонстрировано, что при использовании системы, основанной на выращивании бактерий на среде ВНС, содержащей активированный уголь, и выявлении выросших колоний с использованием специфичных к InlB антител, первые результаты могут быть получены в течение 12 ч. В течение 24 ч. могут быть получены надежные результаты для образцов сырого молока, инокулированных 1-10 КОЕ/мл. Такая высокая скорость получения результата во многом определяется быстрым ростом листерий благодаря прямому нанесению образца на неселективную среду ВНС, которая поддерживает эффективный рост бактерий. Антитела, выработанные против специфического фактора вирулентности *L. monocytogenes*, белка InlB, однозначно дифференцировали *L. monocytogenes* от других бактерий, включая близкородственные виды *Listeria*, что совпадает с данными других авторов, процитированными выше.

Ранее для идентификации патогенных листерий использовали антитела против InlB в различных методах. Tully в соавт. использовали моноклональные InlB-специфические антитела в анализе с использованием квантовых точек [145]. Анти-IgG, разработанный против секретируемой формы InlB, был применен для разработки высокочувствительного иммуноанализа, основанного на электрохимической импедансной спектроскопии [151]. Поликлональные антитела против InlB были использованы для обнаружения клеток *L. monocytogenes* в растворе с использованием поверхностного плазмонного резонанса [80]. Метод позволил обнаружить *L. monocytogenes* в концентрации $1,7 \times 10^5$ КОЕ/мл и был успешно протестирован на образцах пищевых продуктов. В нашем случае мы впервые применили поликлональные моноспецифические антитела против InlB в до-иммуноанализе.

Предлагаемая разработка направлена на решение важной практической задачи – обеспечение аналитическими средствами массового контроля пищевой продукции на присутствие опасного патогена.

С другой стороны, биомедицинский потенциал InlB не ограничивается только использованием как мишени для идентификации *L. monocytogenes*.

Специфические агонисты поверхностных эукариотических рецепторов бактериального происхождения представляют особый интерес в качестве средства терапии. InlB – как один из факторов патогенности и один из основных факторов инвазии и принимает участие в интернализации *L. monocytogenes* в клетки-хозяева. Среди рецепторов, с которыми связывается InlB – c-Met и gC1q-R. Наиболее важным для проникновения в клетки эукариот является c-Met (или HGFR). Для связывания с данным рецептором и активации сигнальных путей необходим и достаточен интерналиновый домен InlB – idInlB (а. о. 36-321). gC1q-R представляет собой белок, который взаимодействует со множеством лигандов клеточного, бактериального и вирусного происхождения.

Мы продемонстрировали, что филогенетически природные изоформы idInlB заметно различались по своим физико-химическим и функциональным свойствам. Природные изоформы idInlB характерны для филогенетически далеких штаммов *L. monocytogenes*, относящихся к разным клональным комплексам (CC) и/или разным филогенетическим линиям [2, 131]. Вариант idInlB_{CC1} (аллель 9) характерен для высоковирулентных штаммов клонального комплекса CC1 филогенетической линии I [2]. В целом, изоформы idInlB продемонстрировали тесную связь с клональными комплексами. idInlB_{CC1} и idInlB_{CC2} отличались пятью аминокислотными заменам, а idInlB_{CC2} и idInlB_{CC3} – одной [131]. Все три перечисленных клональных комплекса связаны со штаммами клинического происхождения [97].

В общей сложности обнаружено 11 аминокислотных замен для изоформ $idInlB_{CC1}$ и филогенетической линии II $idInlB$, использованных в этом исследовании. Предыдущие исследования показали, что семь из этих 11 замен являются консервативными между штаммами линии I и линии II [35]. $idInlB_{CC9}$ филогенетической линии II характерен для данного типа штамма. Штаммы EGDe и CC9, связанные с пищевым происхождением и незначительны среди клинических изолятов, $idInlB_{CC7}$ обнаружен в широком спектре штаммов линии II, принадлежащих к серовару 1/2a и различным клональным комплексам (CC7, CC8, CC14, CC19, CC20, CC21, CC155, CC177 и некоторым другим) [2, 97, 150]. Изоформы $idInlB_{CC9}$ и $idInlB_{CC7}$ отличаются четырьмя аминокислотными заменами.

Наши данные впервые продемонстрировали, что филогенетически определенные замены влияют на функциональные различия между изоформами $idInlB$. Специфичные для филогенетических линий I и II изоформы $idInlB$, различно активировали c-Met-зависимые MAPK- и PI3K/Akt- сигнальные пути и взаимодействовали с белками c-Met и gC1q-R. Было также показано, что природные варианты $idInlB$ по-разному активируют сигнальные процессы внутри эпителиальных клеток. Вариант $idInlB_{CC1}$ (филогенетическая линия I) стимулировал более короткую активацию Erk1/2, киназы MAPK-сигнального пути, и более длинную активацию Akt, киназы PI3k/Akt- сигнального пути, по сравнению с вариантами $idInlB_{CC9}$, $idInlB_{CC7}$ (филогенетическая линия II).

Также изоформы показали различные константы связывания с рецептором c-Met. Наибольшим сродством к данному рецептору характеризовалась изоформа $idInlB_{CC1}$. Константа диссоциации для $idInlB_{CC1}$ (7.4 ± 1.3 нМ) была значительно меньше, чем для $idInlB_{CC9}$ и $idInlB_{CC7}$ (58.7 ± 18.5 нМ, 93.6 ± 11.5 нМ, соответственно).

Вторым очевидным различием между изоформами idInlB был различный потенциал взаимодействия с рецептором gC1q-R, многофункциональным белком млекопитающих, присутствующим в различных компартментах, включая клеточную поверхность. В иммуноферментном анализе gC1q-R связал idInlB_{CC1} лучше, чем idInlB_{CC7} и idInlB_{CC9}, специфичные для линии II. Однако, когда лиганды были взяты в избытке, gC1q-R связывал idInlBs как линии I, так и линии II.

Пытаясь исключить неспецифические взаимодействия между gC1q-R и idInlBs, мы применили конкурентный анализ *in vitro*. Антитела, специфичные к центральной и С-концевой частям, частично ингибировали взаимодействия gC1q-R с idInlB_{CC1}, но не с idInlB_{CC7}.

Для терапевтических приложений мы выбрали вариант InlB_{CC1}, который отличался максимальной активностью *in vitro* при минимальных побочных эффектах, и показали, что idInlB_{CC1} обладает регенеративной активностью при остром химическом повреждении печени, а также и гепатопротективной активностью. В частности, idInlB_{CC1} уменьшает время полного восстановления макроскопических показателей печени и биохимии крови после интрагастрального введения CCl₄. Кроме того, гистологическое исследование показывает уменьшение очагов некротических поражений печени на 17 %

Нами было продемонстрировано, что белок idInlB_{CC1}, который представляет собой лиганд HGFR, полученный из клинического штамма *L. monocytogenes*, является потенциальным индуктором как путей MAPK, так и PI3K/Akt. В соответствии с этими активностями idInlB_{CC1} вызывал митогенный эффект в клетках HepG2. Сигнальные пути MAPK и PI3K/Akt играют центральную роль в HGF/HGFR-зависимой регенерации тканей. Мы продемонстрировали, что белок IdInlB_{CC1}, который имеет бактериальное происхождение, оказывал гепатопротекторное действие на мышинной модели острого повреждения печени CCl₄. Статистически значимое снижение

маркеров острого повреждения в сыворотке крови мыши и уменьшение некротических изменений в печени наблюдались после применения 2 нг/г IdInlBCC1 за 2 ч до токсического повреждения.

Рецептор тирозинкиназы HGFR, также известный как c-Met, имеет центральное значение во время эмбриогенеза, тогда как он, по-видимому, не является важным у взрослых организмов. Тем не менее, HGFR играет ключевую роль в адаптивном ответе печени на повреждение. Роль HGFR в регенерации основана на антиапоптотических и пролиферативных путях трансдукции, которые начинаются с передачи сигналов HGFR/HGF. В частности, активация киназы Erk1/2, которая является центральной в каскаде MAPK, во время регенерации печени зависит от HGFR. Активация пути PI3K/Akt обеспечивает как антиапоптотические, так и пролиферативные сигналы, важные для регенерации печени. Активация HGFR посредством доставки рекомбинантных HGF или HGF-экспрессирующих плазмид и стволовых клеток уменьшает летальную печеночную недостаточность, предотвращает апоптоз гепатоцитов, защищает гепатоциты от окислительного повреждения и уменьшает фиброз печени.

Несмотря на его очевидное потенциальное терапевтическое применение, рчHGF ограничен коротким временем жизни в крови, требующим многократных инъекций для выраженного эффекта. Сложность структуры HGF не позволяет получать белок в прокариотической системе, что делает крупномасштабное фармацевтическое производство более дорогостоящим. Чтобы преодолеть эти проблемы, были разработаны препараты на основе HGF, управляемые плазмидой. Клинические испытания I–II фазы продемонстрировали, что внутримышечная инъекция плазмиды, экспрессирующей HGF, безопасна и может обеспечить облегчение симптомов у пациентов с критической ишемией конечностей. Тем не менее, применение HGF-экспрессирующих плазмид может быть ограничено из-за роли HGF и HGFR в онкогенезе [15, 29, 62, 96].

Использование функциональных аналогов HGF является альтернативным подходом в регенеративной медицине. Результаты, полученные в этой работе, продемонстрировали, что белок IdInlB_{CC1} обладает гепатопротекторной активностью, сравнимой с рчHGF, взятым в той же концентрации. Вопрос о том, может ли idInlB_{CC1} оказывать онкогенное действие, еще не изучен. Необходимо протестировать потенциальную опасность ежедневного применения idInlB_{CC1}. Между тем, idInlB_{CC1} не требует посттрансляционных модификаций и может экспрессироваться в прокариотических системах, что делает его производство экономически эффективным и простым в управлении. Ранее в нашей лаборатории было показано, что InlB обладает ранозаживляющим потенциалом *in vivo* на моделях животных [23]. В целом, мы впервые представляем бактериальный белок, который может использоваться как фактор роста и применяться для регенерации печени.

Применение бактериальных белков в терапии заболеваний человека является новым направлением в белковой инженерии. Достигнутое в последние годы глубокое понимание действия бактериальных токсинов привлекает внимание к их использованию в качестве фармакологических инструментов для манипулирования клеточными процессами, которые неправильно функционируют в ситуациях заболевания или которые могут быть нацелены на терапевтическое вмешательство. Особенно интересна область применения бактериальных белков – агонистов эукариотических рецепторов. Несмотря на то, что некоторые бактерии и вирусы используют рецепторы факторов роста (FGFR и EGFR) для адгезии и проникновения [5, 90, 154, 164], ни разу не сообщалось о их белках, которые также можно использовать для регенеративной медицины.

Белки бактериального происхождения ранее были успешно применены для использования в терапии заболеваний. В основном работы в данном направлении связаны с терапией рака [31, 77, 87, 126]. Но есть и другие

применения. Было показано, что ботулинические токсины, нацеленные на рецепторы млекопитающих семейства SNARE, эффективны у пациентов с заболеваниями, которые регулируются вегетативной нервной системой [102, 103]. Бактериальные токсины, связанные с целевой молекулой, подтвердили свою эффективность в качестве нового класса противораковых терапевтических средств [3]. С другой стороны, бактериальные токсины, которые транспортируют белок в цитоплазму клеток-мишеней после связывания с поверхностным рецептором, рассматриваются как перспективная платформа доставки, специфичная для определенной мишени [10]. Наиболее важной проблемой бактериальных белков является их иммуногенность. Дальнейшая разработка менее иммуногенных вариантов ускорит прогресс в клиническом применении бактериальных агонистов клеточных рецепторов.

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 производства 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 CCl_4 с использованием очищенного препарата рекомбинантного белка *L. monocytogenes* idInlB_{CC1} впервые показан потенциал бактериального белка как гепатопротективного и терапевтического средства для регенерации печени.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

а. о. – аминокислотные остатки

ИФА – иммуноферментный анализ

ИПТГ - Изопропилтиогалактозид

п. о. – пар оснований

рчHGF – рекомбинантный человеческий HGF

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ВНИ - Brain Heart Infusion (сердечно-мозговой экстракт)

ВНИС - Brain Heart Infusion (сердечно-мозговой экстракт) + 0,2% активированный уголь

СС – клональный комплекс

dNTP (deoxynucleoside triphosphate) - дезоксинуклеозидтрифосфат

HGF (Hepatocyte growth factor) – фактор роста гепатоцитов

HGFR (Hepatocyte growth factor receptor) – рецептор фактора роста гепатоцитов

ELISA (Enzyme linked immunoadsorbent assay) – твердофазный иммуноферментный анализ

InlB – интерналин В

idInlB – интерналиновый домен InlB (аминокислоты 36-321)

kb (kilobase) – тысяча пар оснований

LRR (leucine-rich repeat) – лейцин богатые повторы

рчHGF – рекомбинантный человеческий фактор роста гепатоцитов

RTK (Receptor tyrosine kinase) – тирозинкиназный рецептор

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Карпова Т. И., Фирсова Т. Е., Родина Л. В. и др. Типирование *Listeria monocytogenes* на основе полиморфизма генов факторов патогенности Typing of *Listeria monocytogenes* on the Basis of Polymorphism of Genes // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2003. № 3 (5). С. 251–258.
2. Adgamov R. et al. Genetically Related *Listeria Monocytogenes* Strains Isolated from Lethal Human Cases and Wild Animals InTech, 2012. P. 235–250.
3. Akbari B. et al. Immunotoxins in cancer therapy: Review and update // <https://doi.org/10.1080/08830185.2017.1284211>. 2017. № 4 (36). P. 207–219.
4. Alberts B. et al. Essential Cell Biology / Alberts B., H. Johnson, L. Raff, R. Walter, 2009. 731 p.
5. Azimi S. et al. A role for fibroblast growth factor receptor 1 in the pathogenesis of *Neisseria meningitidis* // Microbial pathogenesis. 2020. (149).
6. Azinheiro S. et al. Next-day detection of viable *Listeria monocytogenes* by multiplex reverse transcriptase real-time PCR // Food Control. 2022. (133). P. 108593.
7. Aznar R., Alarcón B. On the Specificity of PCR Detection of *Listeria monocytogenes* in Food: a Comparison of Published Primers // Systematic and Applied Microbiology. 2002. № 1 (25). P. 109–119.
8. Barbuddhe S. B. et al. Rapid identification and typing of *Listeria* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry // Applied and Environmental Microbiology. 2008. № 17 (74). P. 5402–5407.
9. Beauchamp S. et al. A new competitive fluorescence immunoassay for detection of *Listeria monocytogenes* // Analytical Methods. 2012. № 12 (4). P. 4187–4192.
10. Beilhartz G. L., Sugiman-Marangos S. N., Melnyk R. A. Repurposing bacterial toxins for intracellular delivery of therapeutic proteins // Biochemical Pharmacology. 2017. (142). P. 13–20.
11. Bergmann B. et al. InlA- but not InlB-mediated internalization of *Listeria monocytogenes* by non-phagocytic mammalian cells needs the support of other internalins // Molecular Microbiology. 2002. № 3 (43). P. 557–570.
12. Beumer R. R., Hazeleger W. P. *Listeria monocytogenes*: diagnostic problems // FEMS Immunology & Medical Microbiology. 2003. № 3 (35). P. 191–197.

13. Bhunia A. K., Johnson M. G. Monoclonal antibody specific for *Listeria monocytogenes* associated with a 66-kilodalton cell surface antigen. // *Applied and environmental microbiology*. 1992. № 6 (58). P. 1924–9.
14. Bierne H., Cossart P. InlB, a surface protein of *Listeria monocytogenes* that behaves as an invasin and a growth factor. // *Journal of cell science*. 2002. № 17 (115). P. 3357–67.
15. Birchmeier C., Gherardi E. Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase // *Trends in Cell Biology*. 1998. № 10 (8). P. 404–410.
16. Bladt F. et al. Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud // *Nature*. 1995. P. 768–771.
17. Bowden G. A., Georgiou G. Folding and aggregation of beta-lactamase in the periplasmic space of *Escherichia coli*. // *The Journal of biological chemistry*. 1990. № 28 (265). P. 16760–6.
18. Bradford MM A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analytical biochemistry*. 1976. № 1–2 (72). P. 248–254.
19. Braun L., Ghebrehiwet B., Cossart P. gC1q-R/p32, a C1q-binding protein, is a receptor for the InlB invasion protein of *Listeria monocytogenes*. // *The EMBO journal*. 2000. № 7 (19). P. 1458–66.
20. Bundidamorn D., Supawasit W., Trevanich S. Taqman® probe based multiplex RT-PCR for simultaneous detection of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods // *LWT*. 2021. (147). P. 111696.
21. Capo A., D’Auria S., Lacroix M. A fluorescence immunoassay for a rapid detection of *Listeria monocytogenes* on working surfaces // *Scientific Reports* 2020 10:1. 2020. № 1 (10). P. 1–12.
22. Cesare A. De et al. Automated ribotyping using different enzymes to improve discrimination of *Listeria monocytogenes* isolates, with a particular focus on serotype 4b strains // *Journal of Clinical Microbiology*. 2001. № 8 (39). P. 3002–3005.
23. Chalenko Y. et al. Topical treatment with the bacterium-derived c-Met agonist InlB321/15 accelerates healing in the abrasion wound mouse model // *Archives of Dermatological Research*. 2018. № 10 (310). P. 849–856.
24. Chalenko Ya. M. et al. Natural variants of *Listeria monocytogenes* internalin B with different ability to stimulate cell proliferation and cytoskeleton rearrangement

in HEp-2 cells // *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2017. № 2 (32). P. 80–86.

25. Chan W. P. W. et al. Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging // *Current Opinion in Biotechnology*. 2002. № 1 (13). P. 40–46.

26. Chen J. et al. Prevalence and methodologies for detection, characterization and subtyping of *Listeria monocytogenes* and *L. ivanovii* in foods and environmental sources // *Food Science and Human Wellness*. 2017. P. 1–15.

27. Chen M. et al. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* sequence type 121 strains using a novel multiplex PCR assay // *LWT*. 2019. (116). P. 108474.

28. Chiba S. et al. Listerial invasion protein internalin B promotes entry into ileal Peyer's patches in vivo // *Microbiology and Immunology*. 2011. № 2 (55). P. 123–129.

29. Cioce V. et al. Hepatocyte growth factor (HGF)/NK1 is a naturally occurring HGF/scatter factor variant with partial agonist/antagonist activity. // *The Journal of biological chemistry*. 1996. № 22 (271). P. 13110–5.

30. Cocolin L. S., Rantsiou K. *Listeria: Detection* Elsevier Inc., 2015. P. 556–560.

31. Corsalini M. et al. Botulinum Neurotoxins (BoNTs) and Their Biological, Pharmacological, and Toxicological Issues: A Scoping Review // *Applied Sciences* 2021, Vol. 11, Page 8849. 2021. № 19 (11). P. 8849.

32. Corso S., Comoglio P. M., Giordano S. Cancer therapy: can the challenge be MET? // *Trends in molecular medicine*. 2005. № 6 (11). P. 284–92.

33. Destro M. T. et al. Use of Molecular Typing Methods To Trace the Dissemination of *Listeria monocytogenes* in a Shrimp Processing Plant // *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. 1996. № 2 (62). P. 705–711.

34. Dhar G., Faull K. F., Schneewind O. Anchor Structure of Cell Wall Surface Proteins in *Listeria monocytogenes*† // *Biochemistry*. 2000. № 13 (39). P. 3725–3733.

35. Disson O., Moura A., Lecuit M. Making Sense of the Biodiversity and Virulence of *Listeria monocytogenes* // *Trends in Microbiology*. 2021. № 9 (29). P. 811–822.

36. Domínguez-Bernal G. et al. A spontaneous genomic deletion in *Listeria ivanovii* identifies LIPI-2, a species-specific pathogenicity island encoding

sphingomyelinase and numerous internalins // *Molecular Microbiology*. 2006. № 2 (59). P. 415–432.

37. Donnelly C. W. Detection and Isolation of *Listeria monocytogenes* from Food Samples: Implications of Sublethal Injury // *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. 2002. № 2 (85). P. 495–500.

38. Drevets D. A., Bronze M. S. *Listeria monocytogenes* : epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion // *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2008. № 2 (53). P. 151–165.

39. Duffy G. et al. The development of a combined surface adhesion and polymerase chain reaction technique in the rapid detection of *Listeria monocytogenes* in meat and poultry // *International Journal of Food Microbiology*. 1999. № 3 (49). P. 151–159.

40. Ebbes M. et al. Fold and Function of the InlB B-repeat // *Journal of Biological Chemistry*. 2011. № 17 (286). P. 15496–15506.

41. Ermolaeva S. et al. Isolation and characterization of a *Listeria monocytogenes* mutant strain hyperproducing virulence factors // *FEMS Microbiology Letters*. 1997. № 2 (150). P. 189–195.

42. Ermolaeva S. et al. Negative control of *Listeria monocytogenes* virulence genes by a diffusible autorepressor // *Molecular Microbiology*. 2004. № 2 (52). P. 601–611.

43. Ermolaeva S. et al. Negative control of *Listeria monocytogenes* virulence genes by a diffusible autorepressor // *Molecular Microbiology*. 2004. № 2 (52). P. 601–611.

44. Farber J. M., Speirs J. I. Potential use of continuous cell lines to distinguish between pathogenic and nonpathogenic *Listeria* spp. // *Journal of clinical microbiology*. 1987. № 8 (25). P. 1463–6.

45. Ferraris D. M. et al. Ligand-Mediated Dimerization of the Met Receptor Tyrosine Kinase by the Bacterial Invasion Protein InlB // *Journal of Molecular Biology*. 2010. № 3 (395). P. 522–532.

46. Firstenberg-Eden R., Shelef L. A. A new rapid automated method for the detection of *Listeria* from environmental swabs and sponges // *International Journal of Food Microbiology*. 2000. № 2–3 (56). P. 231–237.

47. Fleming D. W. et al. Pasteurized Milk as a Vehicle of Infection in an Outbreak of Listeriosis // *New England Journal of Medicine*. 1985. № 7 (312). P. 404–407.

48. Fredriksson-Ahomaa M., Malig R. *Listeria monocytogenes* contamination pattern in pig slaughterhouses Cite this paper Related papers Tracking of *Listeria monocytogenes* in Smoked Fish Processing Plants.
49. Fu W. ming et al. Staphylococcal enterotoxin C2 promotes osteogenesis and suppresses osteoclastogenesis of human mesenchymal stem cells // *Experimental Cell Research*. 2014. № 1 (322). P. 202–207.
50. Gaballa A. et al. Cross Talk between SigB and PrfA in *Listeria monocytogenes* Facilitates Transitions between Extra- and Intracellular Environments // *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 2019. № 4 (83).
51. Gaillard J. L. et al. In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2 // *Infection and Immunity*. 1987. № 11 (55). P. 2822–2829.
52. Gaillard J. L. The *inlAB* locus mediates the entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes in vivo // *Journal of Experimental Medicine*. 1996. № 2 (183). P. 359–369.
53. Gaillard J.-L. et al. Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci // *Cell*. 1991. № 7 (65). P. 1127–1141.
54. Gangar V. et al. VIDAS enzyme-linked immunofluorescent assay for detection of *Listeria* in foods: collaborative study. // *Journal of AOAC International*. № 4 (83). P. 903–18.
55. Garandeau P. et al. The sortase *srtA* of *Listeria monocytogenes* is involved in processing of internalin and in virulence // *Infection and Immunity*. 2002. № 3 (70). P. 1382–1390.
56. Gasanov U., Hughes D., Hansbro P. M. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: A review // *FEMS Microbiology Reviews*. 2005. T. 29. № 5. P. 851–875.
57. Gillespie I. A. et al. Human listeriosis in England, 2001-2007: association with neighbourhood deprivation. // *Euro surveillance : bulletin européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2010. № 27 (15). P. 7–16.
58. Gray M. J. et al. *Listeria monocytogenes* isolates from foods and humans form distinct but overlapping populations // *Applied and Environmental Microbiology*. 2004. № 10 (70). P. 5833–5841.
59. Gray M. L. et al. A NEW TECHNIQUE FOR ISOLATING LISTERELLAE FROM THE BOVINE BRAIN.

60. Gu H., Xu K., Xu B. Biofunctional magnetic nanoparticles for protein separation and pathogen detection 2006. P. 941–949.
61. Harvey J., Gilmour A. Application of Multilocus Enzyme Electrophoresis and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis to the Typing of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Raw Milk, Nondairy Foods, and Clinical and Veterinary Sources // APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. 1994. P. 1547–1553.
62. Hernandez J., Zarnegar R., Michalopoulos G. K. Characterization of the effects of human placental HGF on rat hepatocytes // Journal of Cellular Physiology. 1992. № 1 (150). P. 116–121.
63. Higuchi O., Nakamura T. Identification and change in the receptor for hepatocyte growth factor in rat liver after partial hepatectomy or induced hepatitis // Biochemical and Biophysical Research Communications. 1991. № 2 (176). P. 599–607.
64. Jackson B. R. et al. Implementation of Nationwide Real-time Whole-genome Sequencing to Enhance Listeriosis Outbreak Detection and Investigation // Clinical Infectious Diseases. 2016. № 3 (63). P. 380–386.
65. Jacquet C. et al. A molecular marker for evaluating the pathogenic potential of foodborne *Listeria monocytogenes* // Journal of Infectious Diseases. 2004. № 11 (189).
66. Jacquet C., Rocourt J., Reynaud A. Study of *Listeria monocytogenes* contamination in a dairy plant and characterization of the strains isolated // International Journal of Food Microbiology. 1993. № 1 (20). P. 13–22.
67. Jadhav S. R., Shah R. M., Palombo E. A. Maldi-tof ms: A rapid methodology for identifying and subtyping *Listeria monocytogenes* // Methods in Molecular Biology. 2021. (2220). P. 17–29.
68. Jaymie R. S., Schlom J., Kashmiri S. V. S. The effects of induction conditions on production of a soluble antitumor sFv in *Escherichia coli* // Protein Engineering, Design and Selection. 1994. № 11 (7). P. 1401–1406.
69. Jerabek-Willemsen M. et al. Molecular Interaction Studies Using Microscale Thermophoresis // ASSAY and Drug Development Technologies. 2011. № 4 (9). P. 342–353.
70. Johannes L. Application of Protein Toxins as Cell Biological and Pharmacological Tools // Toxins 2022, Vol. 14, Page 242. 2022. № 4 (14). P. 242.
71. Kadota Y. et al. Mesenchymal stem cells support hepatocyte function in engineered liver grafts. // Organogenesis. 2014. № 2 (10). P. 268–77.

72. Kanayama Y. et al. Listeriolysin O, but not Murine E-cadherin, is Involved in Invasion of *Listeria monocytogenes* into Murine Liver Parenchymal Cells // *The Open Microbiology Journal*. 2015. № 1 (9). P. 81–83.
73. Kerdahi K. F., Istafanos P. F. Rapid Determination of *Listeria monocytogenes* by Automated Enzyme-Linked Immunoassay and Nonradioactive DNA Probe // *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. 2000. № 1 (83). P. 86–88.
74. Kim J. Y., Kim Y. G., Lee G. M. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential // *Applied Microbiology and Biotechnology* 2011 93:3. 2011. № 3 (93). P. 917–930.
75. Kryptou E. et al. Control of Bacterial Virulence through the Peptide Signature of the Habitat // *Cell Reports*. 2019. № 7 (26). P. 1815-1827.e5.
76. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. // *Nature*. 1970. № 5259 (227). P. 680–5.
77. Lai P. K. et al. Molecular mechanisms and potential clinical applications of *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2016. № FEB (6). P. 9.
78. Lalonde M. E., Durocher Y. Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells // *Journal of Biotechnology*. 2017. (251). P. 128–140.
79. Lathrop A. A., Banada P. P., Bhunia A. K. Differential expression of InlB and ActA in *Listeria monocytogenes* in selective and nonselective enrichment broths // *Journal of Applied Microbiology*. 2008. № 3 (104). P. 627–639.
80. Lebreton A., Cossart P. RNA- and protein-mediated control of *Listeria monocytogenes* virulence gene expression // *RNA biology*. 2017. № 5 (14). P. 460–470.
81. Lecuit M. et al. A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes* // *The EMBO Journal*. 1999. № 14 (18). P. 3956–3963.
82. Lecuit M. et al. A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. // *Science (New York, N.Y.)*. 2001. № 5522 (292). P. 1722–5.
83. Levin R. E. Application of the Polymerase Chain Reaction for Detection of *Listeria monocytogenes* in Foods: A Review of Methodology // <http://dx.doi.org/10.1081/FBT-120023074>. 2007. № 2 (17). P. 99–116.

84. Li F. et al. Real-time PCR identification of *Listeria monocytogenes* serotype 4c using primers for novel target genes obtained by comparative genomic analysis // *LWT*. 2021. (138). P. 110774.
85. Lin M. et al. Monoclonal antibodies binding to the cell surface of *Listeria monocytogenes* serotype 4b // *Journal of Medical Microbiology*. 2006. № 3 (55). P. 291–299.
86. Lingnau A. et al. Expression of the *Listeria monocytogenes* EGD *inlA* and *inlB* genes, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by PrfA-dependent and -independent mechanisms. // *Infection and immunity*. 1995. № 10 (63). P. 3896–903.
87. Lingwood C. Therapeutic Uses of Bacterial Subunit Toxins // *Toxins* 2021, Vol. 13, Page 378. 2021. № 6 (13). P. 378.
88. Liu A. et al. A sandwich-type ELISA for the detection of *Listeria monocytogenes* using the well-oriented single chain Fv antibody fragment // *Food Control*. 2017. (79). P. 156–161.
89. Liu S. et al. Removal of endotoxin from recombinant protein preparations // *Clinical biochemistry*. 1997. № 6 (30). P. 455–463.
90. Luczak S. E. T. et al. The *Chlamydia pneumoniae* Adhesin Pmp21 Forms Oligomers with Adhesive Properties // *The Journal of Biological Chemistry*. 2016. № 43 (291). P. 22806.
91. Mabilat C. et al. Automated RNA probe assay for the identification of *Listeria monocytogenes* // *International Journal of Food Microbiology*. 1996. № 3 (28). P. 333–340.
92. Machner M. P. et al. Aromatic amino acids at the surface of *InlB* are essential for host cell invasion by *Listeria monocytogenes* // *Molecular Microbiology*. 2003. № 6 (48). P. 1525–1536.
93. Magliulo M. et al. A rapid multiplexed chemiluminescent immunoassay for the detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* pathogen bacteria. // *Journal of agricultural and food chemistry*. 2007. № 13 (55). P. 4933–9.
94. Malorny B. et al. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens // *International Journal of Food Microbiology*. 2003. № 1 (83). P. 39–48.
95. Marino M. et al. A framework for interpreting the leucine-rich repeats of the *Listeria internalins* // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000. № 16 (97). P. 8784–8788.

96. Matsumoto K. et al. HGF–Met Pathway in Regeneration and Drug Discovery // *Biomedicines*. 2014. № 4 (2). P. 275–300.
97. Maury M. M. et al. Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity // *Nature Genetics* 2016 48:3. 2016. № 3 (48). P. 308–313.
98. Maury M. M. et al. Hypervirulent *Listeria monocytogenes* clones' adaption to mammalian gut accounts for their association with dairy products // *Nature Communications* 2019 10:1. 2019. № 1 (10). P. 1–13.
99. McLauchlin J., Taylor A. G. The use of monoclonal antibodies in the characterization and purification of cell surface antigens of *Listeria monocytogenes* serogroup 4. // *Acta microbiologica Hungarica*. 1989. № 4 (36). P. 459–65.
100. Mendonça M. et al. Highly specific fiber optic immunosensor coupled with immunomagnetic separation for detection of low levels of *Listeria monocytogenes* and *L. ivanovii* // *BMC Microbiology*. 2012. (12).
101. Michalska K. et al. Functional plasticity of antibacterial EndoU toxins // *Molecular Microbiology*. 2018. № 4 (109). P. 509–527.
102. Mittal S. O. et al. Botulinum Toxin in Parkinson Disease Tremor // *Mayo Clinic Proceedings*. 2017. № 9 (92). P. 1359–1367.
103. Motegi S. et al. Efficacy of Botulinum Toxin B Injection for Raynaud's Phenomenon and Digital Ulcers in Patients with Systemic Sclerosis // *Acta Dermato Venereologica*. 2017. № 7 (97). P. 843–850.
104. Mounier J. et al. Intracellular and cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes* involves interaction with F-actin in the enterocytelike cell line Caco-2 // *Infection and Immunity*. 1990. № 4 (58). P. 1048–1058.
105. Moura A. et al. Emergence and global spread of *Listeria monocytogenes* main clinical clonal complex // *bioRxiv*. 2020. P. 2020.12.18.423387.
106. Müller D., Bayer K., Mattanovich D. Potentials and limitations of prokaryotic and eukaryotic expression systems for recombinant protein production – a comparative view // *Microbial Cell Factories* 2006 5:1. 2006. № 1 (5). P. 1–2.
107. Niemann H. H. et al. Structure of the Human Receptor Tyrosine Kinase Met in Complex with the *Listeria* Invasion Protein InlB // *Cell*. 2007. № 2 (130). P. 235–246.
108. Norton D. M. Polymerase Chain Reaction-Based Methods for Detection of *Listeria monocytogenes*: Toward Real-Time Screening for Food and

- Environmental Samples // Journal of AOAC INTERNATIONAL. 2002. № 2 (85). P. 505–515.
109. Odumeru J. A. et al. Evaluation of Accuracy and Repeatability of Identification of Food-Borne Pathogens by Automated Bacterial Identification Systems // Journal of Clinical Microbiology. 1999. № 4 (37). P. 944–949.
110. Organ S. L., Tsao M.-S. An overview of the c-MET signaling pathway. // Therapeutic advances in medical oncology. 2011. (3). P. S7–S19.
111. Orsi R. H., Bakker H. C. den, Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics // International Journal of Medical Microbiology. 2011. № 2 (301). P. 79–96.
112. Painset A. et al. LiSEQ – whole-genome sequencing of a cross-sectional survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and human clinical cases in Europe // Microbial Genomics. 2019. № 2 (5).
113. Peng H., Shelef L. A. Automated simultaneous detection of low levels of listeriae and salmonellae in foods // International Journal of Food Microbiology. 2001. № 3 (63). P. 225–233.
114. Pentecost M. et al. *Listeria monocytogenes* internalin B activates junctional endocytosis to accelerate intestinal invasion. // PLoS pathogens. 2010. № 5 (6). P. e1000900.
115. Piffaretti J. C. et al. Genetic characterization of clones of the bacterium *Listeria monocytogenes* causing epidemic disease. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1989. № 10 (86). P. 3818–22.
116. Poyart C. et al. The zinc metalloprotease of *Listeria monocytogenes* is required for maturation of phosphatidylcholine phospholipase C: direct evidence obtained by gene complementation // Infection and Immunity. 1993. № 4 (61). P. 1576–1580.
117. Psareva E. K. et al. Diversity of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Food Products in the Central European Part of Russia in 2000–2005 and 2019–2020 // Foods. 2021. № 11 (10). P. 2790.
118. Radoshevich L., Cossart P. *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis // Nature Reviews Microbiology 2017 16:1. 2017. № 1 (16). P. 32–46.
119. Ragon M. et al. A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution // PLoS Pathogens. 2008. № 9 (4).

120. Rodrigues G. A., Park M. Autophosphorylation modulates the kinase activity and oncogenic potential of the Met receptor tyrosine kinase. // *Oncogene*. 1994. № 7 (9). P. 2019–27.
121. Sandvig K. et al. Endocytosis and retrograde transport of Shiga toxin // *Toxicon*. 2010. № 7 (56). P. 1181–1185.
122. Scallan E. et al. Foodborne illness acquired in the United States--unspecified agents. // *Emerging infectious diseases*. 2011. № 1 (17). P. 16–22.
123. Scheu P. M., Berghof K., Stahl U. Detection of pathogenic and spoilage micro-organisms in food with the polymerase chain reaction // *Food Microbiology*. 1998. № 1 (15). P. 13–31.
124. Schlech W. F. et al. Epidemic Listeriosis — Evidence for Transmission by Food // *New England Journal of Medicine*. 1983. № 4 (308). P. 203–206.
125. Schmidt C. et al. Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. // *Nature*. 1995. № 6516 (373). P. 699–702.
126. Schmidt G., Papatheodorou P., Aktories K. Novel receptors for bacterial protein toxins // *Current Opinion in Microbiology*. 2015. (23). P. 55–61.
127. Schoder D., Medicine V. *Listeria : Listeriosis* / D. Schoder, V. Medicine, 1-e изд., Elsevier Ltd., 2016. 561–566 p.
128. Severino P. et al. Comparative transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* strains of the two major lineages reveals differences in virulence, cell wall, and stress response // *Applied and Environmental Microbiology*. 2007. № 19 (73). P. 6078–6088.
129. Shen Y. et al. InIB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. // *Cell*. 2000. № 3 (103). P. 501–510.
130. Sheng J. et al. A multiplex PCR detection method for milk based on novel primers specific for *Listeria monocytogenes* 1/2a serotype // *Food Control*. 2018. (86). P. 183–190.
131. Sobyenin K. et al. Naturally occurring InIB variants that support intragastric *Listeria monocytogenes* infection in mice // *FEMS Microbiology Letters*. 2017. № 3 (364). P. fnx011.
132. Sriubolmas N. et al. Localization and characterization of inclusion bodies in recombinant *Escherichia coli* cells overproducing penicillin G acylase // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1997. № 4 (47). P. 373–378.

133. Stessl B. et al. Performance testing of six chromogenic ALOA-type media for the detection of *Listeria monocytogenes* // *Journal of Applied Microbiology*. 2009. № 2 (106). P. 651–659.
134. Subramanaya S. *Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems*. 2008.
135. Sun Q. et al. A novel multiplex PCR method for simultaneous identification of hypervirulent *Listeria monocytogenes* clonal complex 87 and CC88 strains in China // *International Journal of Food Microbiology*. 2022. (366). P. 109558.
136. Swiech K., Picanço-Castro V., Covas D. T. Human cells: New platform for recombinant therapeutic protein production // *Protein Expression and Purification*. 2012. № 1 (84). P. 147–153.
137. Szturz P. et al. Understanding c-MET signalling in squamous cell carcinoma of the head & neck // *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2017. (111). P. 39–51.
138. Tajima H., Matsumoto K., Nakamura T. Regulation of cell growth and motility by hepatocyte growth factor and receptor expression in various cell species. // *Experimental cell research*. 1992. № 2 (202). P. 423–31.
139. Teo A. Y. L., Ziegler G. R., Knabel S. J. Optimizing Detection of Heat-Injured *Listeria monocytogenes* in Pasteurized Milk // *Journal of Food Protection*. 2001. № 7 (64). P. 1000–1011.
140. Tilney L. G., Portnoy D. A. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. // *The Journal of cell biology*. 1989. № 4 Pt 1 (109). P. 1597–1608.
141. Travier L., Lecuit M. *Listeria monocytogenes* ActA: a new function for a ‘classic’ virulence factor // *Current Opinion in Microbiology*. 2014. № 1 (17). P. 53–60.
142. Trusolino L., Bertotti A., Comoglio P. M. MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. // *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2010. № 12 (11). P. 834–48.
143. Trusolino L., Pugliese L., Comoglio P. M. Interactions between scatter factors and their receptors: hints for therapeutic applications // *The FASEB Journal*. 1998. № 13 (12). P. 1267–1280.
144. Tu Z. et al. Identification and characterization of species-specific nanobodies for the detection of *Listeria monocytogenes* in milk // *Analytical Biochemistry*. 2016. (493). P. 1–7.

145. Tully E. et al. The development of rapid fluorescence-based immunoassays, using quantum dot-labelled antibodies for the detection of *Listeria monocytogenes* cell surface proteins // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2006. № 1–3 (39). P. 127–134.
146. Tully E., Higson S. P., O’Kennedy R. The development of a «labelless» immunosensor for the detection of *Listeria monocytogenes* cell surface protein, Internalin B // *Biosensors and Bioelectronics*. 2008. № 6 (23). P. 906–912.
147. Uehara Y. et al. Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. // *Nature*. 1995. № 6516 (373). P. 702–705.
148. Veiga E., Cossart P. *Listeria* InlB takes a different route to met. // *Cell*. 2007. № 2 (130). P. 218–9.
149. Vlaemynck G., Lafarge V., Scotter S. Improvement of the detection of *Listeria monocytogenes* by the application of ALOA, a diagnostic, chromogenic isolation medium // *Journal of Applied Microbiology*. 2000. № 3 (88). P. 430–441.
150. Voronina O. L. ; et al. Diversity and Pathogenic Potential of *Listeria monocytogenes* Isolated from Environmental Sources in the Russian Federation // *International Journal Of Modern Engineering Research*. 2015. № 3 (5). P. 5–15.
151. Wang L. et al. Development and application of a simple loop-mediated isothermal amplification method on rapid detection of *Listeria monocytogenes* strains // *Molecular Biology Reports*. 2012. № 1 (39). PP. 445–449.
152. Waters S., Neujahr H. Y. A Fermentor Culture for Production of Recombinant Phenol Hydroxylase // *Protein Expression and Purification*. 1994. № 6 (5). P. 534–540.
153. West J. L., Halas N. J. Applications of nanotechnology to biotechnology: Commentary // *Current Opinion in Biotechnology*. 2000. № 2 (11). P. 215–217.
154. Wiedemann A. et al. Identification of the epidermal growth factor receptor as the receptor for *Salmonella* Rck-dependent invasion // *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2016. № 12 (30). P. 4180–4191.
155. Wiedmann M. Molecular Subtyping Methods for *Listeria monocytogenes* // *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. 2002. № 2 (85). P. 524–532.
156. Wiedmann M. ADSA Foundation Scholar Award—An Integrated Science-Based Approach to Dairy Food Safety: *Listeria monocytogenes* as a Model System // *Journal of Dairy Science*. 2003. № 6 (86). P. 1865–1875.

157. Wu R. et al. Development of Double Loop-Mediated Isothermal Amplification to Detect *Listeria monocytogenes* in Food // *Current Microbiology* 2014 69:6. 2014. № 6 (69). P. 839–845.
158. Wu T. et al. Staphylococcal enterotoxin C2 promotes osteogenesis of mesenchymal stem cells and accelerates fracture healing // *Bone and Joint Research*. 2018. № 2 (7). P. 179–186.
159. Yalow R. S., Berson S. A. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man // *The Journal of clinical investigation*. 1960. № 7 (39). P. 1157–1175.
160. Yang Q. H. et al. Low concentration of inducer favors production of active form of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase in *Escherichia coli*. // *Protein expression and purification*. 1997. № 3 (10). P. 320–4.
161. Yu K. Y. et al. Use of monoclonal antibodies that recognize p60 for identification of *Listeria monocytogenes* // *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2004. № 3 (11). P. 446–451.
162. Zarnegar R. et al. Identification and partial characterization of receptor binding sites for HGF on rat hepatocytes. // *Biochemical and biophysical research communications*. 1990. № 3 (173). P. 1179–85.
163. Zhang L. [и др.. [Application and evaluation of loop-mediated isothermal amplification method for detecting of *Listeria monocytogenes* in food]. // *Zhonghua yu fang yi xue za zhi* [Chinese journal of preventive medicine]. 2014. № 3 (48). P. 213–7.
164. Zheng K., Kitazato K., Wang Y. Viruses exploit the function of epidermal growth factor receptor // *Reviews in medical virology*. 2014. № 4 (24). P. 274–286.
165. Zhu H., Naujokas M. a, Park M. Receptor chimeras indicate that the met tyrosine kinase mediates the motility and morphogenic responses of hepatocyte growth/scatter factor. // *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*. 1994. № 4 (5). P. 359–66.
166. Ziegler H. K., Orlin P. A. Analysis of *Listeria monocytogenes* antigens with monoclonal antibodies. // *Clinical and investigative medicine. Medecine clinique et experimentale*. 1984. № 4 (7). P. 239–42.