

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О. В. ПАЛЛАДИНА

Манойлов Кирило Юрійович

УДК [577.112.083/616.931]:[577.112.7+581.17+577.352.4+616-006.6]

БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ РЕКОМБІНАНТНИХ ФРАГМЕНТІВ  
МОЛЕКУЛИ ДИФТЕРІЙНОГО ТОКСИНУ

03.00.04 – біохімія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ – 2018

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у відділі молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна Національної Академії Наук України

**Науковий керівник:** доктор біологічних наук, професор,  
провідний науковий співробітник  
**Колибо Денис Володимирович**,  
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,  
завідувач лабораторії імунобіології

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук, с.н.с.,  
**Верьовка Сергій Вікторович**  
Інститут отоларингології  
ім. О.С. Коломійченка НАМН України,  
завідувач лабораторії біохімії

кандидат біологічних наук, с.н.с.,  
**Кропивко Сергій Вікторович**,  
Інститут молекулярної біології і генетики НАН  
України,  
старший науковий співробітник

Захист дисертації відбудеться «17» грудня 2018 року о 14<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.240.01 в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України за адресою: 01030, м. Київ, вул. Леонтовича, 9.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (м. Київ, вул. Леонтовича, 9).

Автореферат розісланий «    » листопада 2018 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради,  
кандидат біологічних наук

Н. П. Карлова

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Дифтерійний токсин (ДТ) привертає значну увагу дослідників, оскільки на його основі проводять розробку засобів для медицини та біологічних досліджень. Сучасні досягнення молекулярної біології зробили можливими дослідження структури і функцій ДТ за допомогою рекомбінантних похідних повнорозмірної форми токсину та його фрагментів. Останнім часом в літературі з'являється велика кількість нових робіт, присвячених саме рекомбінантним аналогам молекули ДТ.

Створення рекомбінантних аналогів та похідних токсину має велике науково-практичне значення. У біологічних дослідженнях нативний ДТ використовують як корисний інструмент для вибіркової клітинної абляції у резистентних до нього організмів (Saito, et al., 2001), субодиниця В токсину (SbB) видається перспективним інструментом доставки деяких поліпептидних ланцюгів у цитозоль клітин.

Важливе значення для медичної практики мають нетоксичні похідні ДТ, що зберігають високу, притаманну нативному токсину, імуногенність. Подібні похідні ДТ використовують у вакцинах як носії для полісахаридів та гаптенів, що дозволяє викликати імунну відповідь на певні полісахариди патогенних мікроорганізмів, до яких в організмі людини утворення антитіл відбувається зазвичай з низькою ефективністю.

Особливий інтерес становлять нетоксичні похідні ДТ, які водночас не втрачають здатності взаємодіяти з рецепторами поверхні клітин. Зокрема, протеїн CRM197 виявився ефективним у пригніченні росту ракових клітин (Miyamoto, et al., 2007; Mekada, et al., 2017). Вважають, що CRM197 виявляє цитостатичний вплив на малігнізовані клітини внаслідок блокування розчинної форми гепарин-зв'язувального ростового фактора, подібного до епідермального фактора росту HB-EGF. Цей ростовий фактор сприяє розвитку ознак малігнізації у клітин, а ген його трансмембранного попередника відповідає за розвиток резистентності до дії протионкологічних препаратів (Wang, et al., 2007). Розробка технології використання нетоксичних похідних ДТ для пригнічення росту і розвитку ракових клітин в організмі людини є дуже актуальним і перспективним завданням сучасної експериментальної і клінічної онкології. CRM197 проходить випробовування для впровадження у медичну практику для лікування онкологічних захворювань у людей (Nam, et al., 2014). Проте як лікувальний агент CRM197 має значні недоліки, що суттєво знижує можливості його застосування. В першу чергу це висока імуногенність даного протеїна для організму людини.

Перспективним напрямком у розробці блокаторів HB-EGF зі зниженою імуногенністю є пошук таких нетоксичних аналогів ДТ, які б зберігали цитостатичну дію і водночас мали меншу кількість імуногенних ділянок. В літературі існує обмаль даних, які б були присвячені пошуку рекомбінантних аналогів CRM197 із зниженою імуногенністю.

Нативний ДТ є бактерійним екзотоксином, що продукується токсигенними штамми *Corynebacterium diphtheriae* і характеризується одним із найменших значень напівлетальної дози  $IC_{50\%}$  для чутливих до нього організмів. Нетоксичні похідні ДТ можна отримувати безпосередньо із нативного токсину шляхом

хімічних модифікацій. Для цього найчастіше використовують частковий протеоліз або обробку формальдегідом. Проте робота з природним ДТ заздалегідь є коштовною і працемісткою процедурою, адже продукування токсину пов'язане з культивуванням клітин патогенних штамів дифтерійної палички у великих кількостях, складними процесами переробки та інактивації культурального середовища *C. diphtheria*, багатостадійним хроматографічним очищенням. Тому перспективним напрямком видається отримання рекомбінантних похідних ДТ.

Одним із найближчих аналогів нативного ДТ є протеїн CRM197, що є точковим мутантом токсину, позбавленим токсичної дії внаслідок заміни залишку Gly в положенні 52 поліпептидного ланцюга на залишок Glu. Цей протеїн отримують шляхом культивування нетоксигенних штамів *C. diphtheria*. Технологія отримання CRM197 також є працемісткою, оскільки, хоча і не пов'язана із небезпекою ураження людей патогенною дифтерійною паличкою, все одно потребує застосування низки складних методичних підходів.

Найдешевшим та порівняно якісним процесом отримання рекомбінантних похідних ДТ є синтез у клітинах кишкової палички *Escherichia coli* за допомогою плазмідних експресійних векторів. Вбудовані в плазмиди генетичні послідовності забезпечують підвищену експресію з високим виходом цільового продукту. Зокрема, в нашій роботі використано плазмідні вектори *pET* та штами *E. coli*, що містять у своїй хромосомі ген РНК-полімерази бактеріофагу T7.

Використання кДНК токсину, коньюгованої з послідовністю, що кодує молекулярну мітку, зокрема 6His-послідовність, дозволяє отримати в *E. coli* значні кількості цільових нетоксичних похідних ДТ та за допомогою афінної хроматографії швидко і якісно провести їх очистку. Це забезпечується використанням 6His-послідовності. Проте синтез рекомбінантних протеїнів в клітинах чужорідних продуцентів, а також наступні процедури очищення і підготування проб, можуть значно змінювати притаманні природному аналогу властивості. Тому синтез і очистка будь-якого рекомбінантного похідного потребує оптимізації протоколів для одержання найбільш подібного до природного аналога рекомбінантного продукту. Згідно отриманим в нашій роботі даним, одержання похідних ДТ в *E. coli* має певні особливості, а властивості кінцевих сполук, отриманих після очищення, можуть істотно відрізнятися від характерних для природного аналога.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Роботу проведено в рамках виконання НДР “Механізми регуляції внутрішньоклітинних сигнальних мереж, міжклітинних та міжмолекулярних взаємодій” (2012–2016 р.), № державної реєстрації 0112U002624 та НДР “Рекомбінантні фрагменти молекули ДТ як потенційний засіб протиракової терапії” (01.08.2016–31.12.2016 р.), № державної реєстрації 0116U006914.

**Мета і завдання дослідження.** Метою дослідження було встановлення особливостей взаємодії рекомбінантних похідних молекули ДТ, синтезованих в клітинах *E. coli*, з клітинами ссавців на етапах зв'язування з рецептором, взаємодії з ліпідними мембранами та ендосомної інтерналізації.

Для досягнення мети було поставлено наступні завдання:

1. Порівняти взаємодію рекомбінантних протеїнів CRM197 та субодиниці В ДТ (SbV), синтезованих в клітинах *E. coli*, і нативного

ДТ, синтезованого клітинами *C. diphtheria*, з рекомбінантним HB-EGF людини та миші *in vitro*.

2. Дослідити зв'язування CRM197 та SbV з клітинами чутливих і резистентних до його дії видів ссавців.
3. Охарактеризувати інтерналізацію CRM197, SbV та його рецепторного домену (Rd) в клітини ссавців.
4. Охарактеризувати іон-провідну функцію CRM197 та SbV у штучних бішарових ліпідних мембранах (БЛМ).
5. Охарактеризувати цитостатичну дію CRM197, SbV та Rd на трансформовані клітини, що походять із організму людини.

**Об'єктом дослідження** є молекулярний механізм реалізації біологічної активності нетоксичних аналогів ДТ.

**Предметом дослідження** є набір синтезованих в клітинах *E. coli* рекомбінантних фрагментів ДТ без або з флуоресцентними мітками.

**Методи дослідження** – при виконанні роботи було використано загальні методи біохімічних та молекулярно-біологічних досліджень: електрофорез в поліакриламідному гелі з використанням додецилсульфату натрію для аналізу проб протеїнів, електрофорез нуклеїнових кислот в агарозному гелі, металоафінна хроматографія для очищення протеїнів що містять полігістидинову мітку, модифікація протеїнів хімічними методами (ковалентне приєднання флуоресцентних міток); мікробіологічні: культивування бактерійних штамів-продуцентів на поживних середовищах, проведення селекції цільових мікроорганізмів з використанням специфічних антибіотиків; методи біотехнології: трансформація прокаріотичних клітин векторними конструкціями, клонування фрагментів кДНК в плазмідні вектори; методи флуориметрії: протокова цитофлуориметрія; мікроскопії: конфокальна мікроскопія; культивування евкаріотичних клітин *in vitro*.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше показано, що рекомбінантні аналоги ДТ виявляють підвищену афінність до рецепторів поверхні клітин резистентних до дії ДТ видів ссавців, що є близькою за значенням до афінності рецепторів чутливих до ДТ видів. Вперше встановлено, що транспортний домен (Td) у складі аналогів ДТ бере участь у реалізації цитостатичної дії на трансформовані клітини людини.

**Практичне значення одержаних результатів.** Результати проведеного дослідження особливостей взаємодії рекомбінантних аналогів молекули ДТ, синтезованих в *E. coli*, з клітинами ссавців на етапах взаємодії з рецептором, ліпідними мембранами та ендосомальної інтерналізації, можуть мати широке прикладне застосування. Виявлені істотні відмінності між нативним токсином та його аналогами, є важливими для розробки технологій онкотерапії та використання рекомбінантних похідних ДТ в біомедицині. Показано, що серед усіх фрагментів ДТ, саме SbV має найбільший терапевтичний потенціал, оскільки Td у складі цього протеїну робить суттєвий внесок у прояв цитостатичної дії. Встановлений факт може виявитися корисним при розробці менш імуногенного, ніж CRM197, засобу, що діє подібним до CRM197 чином.

**Особистий внесок здобувача.** Значна частина наукових результатів дисертаційної роботи отримана автором самостійно або за його безпосередньої

участі. Зокрема, автором самостійно проведено підготовку всіх необхідних для проведення експериментальної роботи зразків клітин евкаріотів. Автором даної роботи повністю проведено отримання та очищення проб протеїнів із клітин *E. coli*. Самостійно проведено всі експериментальні процедури, що стосуються аналізу взаємодії рекомбінантних протеїнів із клітинами ссавців.

Деякі результати конфокальної мікроскопії та протокової цитофлуориметрії було отримано за участі співробітника відділу молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, н.с. к.б.н. Лабинцева А. Ю., якому автор щиро вдячний за його допомогу з опанування методу протокової цитофлуориметрії на приладі Beckman Coulter Epics XL. Також автор висловлює велику вдячність А. Ю. Лабинцеву за корисні вказівки та поради щодо застосування низки засобів комп'ютерного програмного забезпечення при обробці отриманих експериментальних даних.

Автор роботи висловлює свою глибоку вдячність с.н.с. к.б.н. Горбатюк О.Б. (Інститут молекулярної біології та генетики НАН України та Державна установа "Інститут генетичної та регенеративної медицини Національної академії медичних наук України") за її допомогу при розв'язанні проблем, пов'язаних з очищенням протеїнів CRM197 та SbV.

Експериментальну роботу із безпосереднього визначення іонної провідності каналів, утворених молекулами рекомбінантних аналогів ДТ у БЛМ, було проведено у співпраці зі співробітником відділу нейрохімії Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, пров. н.с. д.б.н. Шатурським О.Я., якому автор дисертації висловлює глибоку подяку.

Отримання та біотинілювання F(ab)'<sub>2</sub>-фрагментів антитіл антидифтерійної сироватки коня було проведено у співпраці з с.н.с. к.б.н. Олійник О.С. у відділі молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, якій автор також висловлює подяку.

Автор вдячний пров. інж. Криніній О.І. із відділу молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, за участі якої було отримано деякі результати із визначення цитостатичної дії рекомбінантних похідних ДТ на клітини лінії MDA-MB-231.

Автор також вдячний співробітникам Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України н.с. к.б.н. Короткевич Н. В. за допомогу в опануванні базових методів біохімічних та молекулярно-біологічних досліджень, д.б.н., проф. акад. НАН України Костеріну С.О. за допомогу у застосуванні теоретичних принципів оцінки кінетичних параметрів ліганд-рецепторної взаємодії, що були використані при написанні однієї з публікацій автора дисертації, с.н.с. к.т.н. Чуніхіну О.Ю. за підтримку в роботі з протоковим цитофлуориметром, с.н.с. к.ф.-м. н. Карахіму С.О. за підтримку в роботі з конфокальним мікроскопом.

Особливу вдячність автор висловлює науковому керівнику, д.б.н., проф. Колибо Денису Володимировичу та д.б.н. проф. академіку НАН та НАМН України Комісаренку Сергію Васильовичу за участь у плануванні стратегії роботи, аналізі та узагальненні результатів.

**Апробація результатів дисертації.** Основні результати наукових досліджень доповідалися на конференціях: «Біологічні дослідження молодих науковців в Україні» (Київ, Україна, 2012), «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології –

2013» (Київ, Україна, 2013), міжнародних конференціях «XI Український біохімічний конгрес» (Київ, Україна, 2014), «Bridges in Life Sciences – 10<sup>th</sup>» (Вроцлав, Польща, 2015), «X Parnas Conference» (Вроцлав, Польща, 2016), міжнародному з'їзді «7<sup>th</sup> TriNet Meeting» (Будапешт, Угорщина, 2016), на звітах про виконання науково-дослідних робіт «Ендосомальний транспорт рекомбінантних фрагментів молекули ДТ в резистентних та чутливих до токсину клітинах ссавців» (Інституту біохімії ім. О. В. Палладна НАН України, 2015) та «Дослідження рекомбінантних фрагментів молекули ДТ у якості потенційних засобів протиракової терапії» (Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, 2015), на семінарі Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України (розширена доповідь) «Характеристика рекомбінантних протеїнів CRM197 та SbV, як інструмента дослідження ДТ» (2016).

**Публікації.** За результатами роботи опубліковано 13 робіт: 6 статей у фахових журналах та 6 тез доповідей у збірниках матеріалів всеукраїнських та міжнародних конференцій.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів та їх обговорення, які викладено у 4-х розділах, аналізу та узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел (143 найменування). Роботу викладено на 135-ти сторінках друкованого тексту та проілюстровано 33-ма рисунками.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

### Огляд літератури

В **Огляді літератури** систематизовано та проаналізовано класичні та сучасні уявлення щодо молекулярної структури, функцій та механізмів реалізації токсичної дії нативного ДТ. Представлено коротку характеристику окремих структурно-функціональних аналогів молекули ДТ: протеїну CRM197, що містить у своєму складі каталітичний (Cd), транслокаційний (Td) та рецептор-зв'язувальний (Rd) домени, субодиниці В – SbV, що містить домени Td та Rd. Проаналізовано відмінності між цими похідними ДТ та нативним токсином. Подано короткий огляд молекулярної структури та функцій рецептору ДТ, протеїну proHB-EGF клітин ссавців. Проаналізовано проблему механізму резистентності клітин ссавців до дії ДТ, що стосується амінокислотних замін у первинній структурі proHB-EGF клітин чутливих та резистентних видів. На основі експериментальних даних з літературних джерел обґрунтовано використання клітинних ліній Vero як моделі високочутливих до дії токсину клітин і клітин лінії L929 як високорезистентних до дії токсину клітин. Розглянуто деякі особливості зв'язування ДТ із протеїном proHB-EGF ссавців, особливості інтерналізації комплексу ДТ з proHB-EGF у складі ендосом, внутрішньоклітинного везикулярного транспорту в ендосомах. Значна увага приділена іон-провідній функції транслокаційного домену ДТ в ліпідних мембранах та визначенню іон-провідних струмів за допомогою методу штучних бішарових ліпідних мембран (БЛМ). Наприкінці розділу наведено короткий огляд літературних відомостей щодо протипухлинної та цитостатичної дій ДТ та його нетоксичного аналога CRM197.

## Матеріали та методи досліджень

У підрозділі **Методологія досліджень** описано методи роботи та обґрунтовано доцільність їх використання, проаналізовано особливості синтезу рекомбінантних протеїнів в клітинах *Escherichia coli* та підходи для очистки рекомбінантних протеїнів. Проаналізовано можливість використання рекомбінантних аналогів із клітин *E. coli* для дослідження природного ДТ. Охарактеризовано методи оцінки функціональної активності окремих структурних компонентів молекули ДТ, розглянуто клітини лінії Vero та L929, як модельні системи для дослідження взаємодії токсину з рецепторами клітин.

У підрозділі **Методи дослідження**, наведено детальні відомості щодо застосованих в роботі методологічних підходів, таких як синтез рекомбінантних протеїнів в клітинах *E. coli*, отримання і очистки синтезованих в *E. coli* рекомбінантних протеїнів, використання металоафінної хроматографії для очистки рекомбінантних протеїнів, що містять 6His-послідовність, ковалентне приєднання флуоресцеїнізотіоціанату (FITC) до молекул протеїнів, електрофорез з додецилсульфатом натрію (ДСН-ПААГ), імуноферментний аналіз (ІФА), протокову цитофлуориметрію, конфокальну мікроскопію.

*Отримання і очистки цільових рекомбінантних протеїнів із клітин E. coli.* Експресію цільових рекомбінантних молекул проводили у штамі *E. coli* BL21 Rosetta (DE3) (Novagen, США), що містить ген РНК-полімерази бактеріофагу Т7 та плазмиду pRARE, яка кодує низку молекул тРНК, чисельність яких є низькою у *E. coli*, які проте зазвичай необхідні для кодування амінокислотних залишків цільових рекомбінантних протеїнів чужорідних для *E. coli*. Нуклеотидні послідовності, що кодують фрагменти молекули ДТ, були вбудовані у плазмідний вектор *pET-24a(+)* (Novagen, США). Відповідні штами *E. coli* вирощували на середовищі LB з канаміцином при 37°C за інтенсивного перемішування до досягнення суспензією OD<sub>650</sub> від 0,3 до 0,4. Експресію індукували додаванням 1 мМ ізопропіл-β-D-тіогалактопіранозиду. Інкубацію проводили при 30°C протягом 3-х годин, при інтенсивному перемішуванні. Бактеріальні клітини руйнували ультразвуком (для проведення дослідів на клітинах ссавців) або за допомогою ензимів (лізоцим та ДНКаза I) для використання у методі БЛМ. Згідно із аналізом розчинної та нерозчинної у воді фракцій лізатів/гомогенатів бактеріальних клітин, всі досліджувані рекомбінантні похідні молекули ДТ накопичувалися в *E. coli* у неактивному стані у вигляді цитоплазматичних тілець включення. Очистку рекомбінантних аналогів ДТ проводили із використанням металоафінної хроматографії на агарозі з кон'югованою Ni<sup>2+</sup>-нітрилооцтовою кислотою (Ni-NTA) у денатуруючих умовах (8М сечовина та 10 мМ β-меркаптоетанол). Після очистки, до отриманих рекомбінантних аналогів токсину застосовували процедуру штучної ренатурації в умовах *in vitro* (рефолдинг) на колонках з Ni-NTA агарозою з послідовною елюцією у градієнті імідазолу, або за методом розведення у великому об'ємі. Переведення молекул протеїну у необхідний буферний розчин проводили шляхом діалізу протягом 1-ї доби при 5°C.

*Оцінка чистоти кінцевих проб рекомбінантних протеїнів.* Чистоту отриманих протеїнових фракцій аналізували методом ДСН-ПААГ за модифікованою методикою (додавання трицину) (Schägger H. та von Jagov J., 1987). Концентрацію

протеїнів визначали порівнюючи інтенсивність відповідних смуг на сканованих зображеннях отриманих електрофореграмах цільових проб і проб БСА стандартних концентрацій, використовуючи програмне забезпечення ImageJ.

*Непрямий твердофазний ІФА.* Сорбцію рекомбінантних НВ-EGF людини та миші у концентрації 10 мкг/мл в PBS проводили у 96-луночних полістиренових планшетах протягом доби при 5°C. Для негативного контролю використовували 10 мкг/мл БСА. Вільні протеїн-зв'язувальні ділянки сорбційної поверхні блокували 1%-м розчином знежиреного молока. Рекомбінантні аналоги ДТ в присутності 0,04% Tween-20 титрували подвійним розведенням від 10 до 0,156 мкг/мл. Для детекції рекомбінантних похідних ДТ, використовували препарати біотинільованих F(ab)'2-фрагментів антитіл коня до дифтерійного анатоксину та кон'югат стрептавідину з полімерною пероксидазою, робоче розведення яких у присутності 0,04% Tween-20 в PBS визначали для кожного досліду експериментально. Проявлення проводили, додаючи у лунки по 100 мкл розчину який містив 1 мл 0,001% ТМБ в ДМСО, 9 мл фосфатно-цитратного буферного розчину (0,1 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,05 мМ цитрату натрію, рН 5,0) та 2 мкл 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Реакцію проводили протягом 5 хв при 37°C та зупиняли внесенням 50 мкл 1 М розчину сірчаної кислоти. Результати аналізу вимірювали при довжині хвилі 450 нм.

*Ковалентне мічення протеїнів FITC.* Очищений рекомбінантний протеїн переводили у натрій-карбонатний буферний розчин (0,16 М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,33 М NaHCO<sub>3</sub>, рН 9,5) шляхом діалізу, після чого концентрували протеїн за допомогою концентраторів із межею відсічення 10 kDa до кінцевої концентрації близько 0.5 мг/мл. Сконцентровані проби змішували із розчином 1 мг/мл FITC в диметилсульфоксиді (ДМСО) у молярному співвідношенні протеїн/FITC 1:5, після чого інкубували протягом 1 год при кімнатній температурі (20–24 °C) без доступу світла. Незв'язаний FITC видаляли шляхом діалізу протягом 2–3-х діб при 5°C.

*Культитивування евкаріотичних клітин в умовах in vitro.* Клітини ліній L929, Vero та MDA-MB-231 культивували при 37°C та 5% CO<sub>2</sub> у повітрі на поживному середовищі RPMI 1640 з L-глутаміном та антибіотиками: 100 мг/л стрептоміцину, 10 000 U/л пеніциліну G та 250 мг/л амфотерицину B з додаванням 5 або 10% фетальної сироватки великої рогатої худоби.

*Проведення МТТ-тесту.* Клітини вирощували у лунках 96-ти луночних планшетів. Після досягнення конфлюентного стану, проводили інкубацію в присутності досліджуваних агентів протягом 24 год. Для оцінки відсотку живих клітин, проводили інкубацію у культивативному поживному середовищі без додавання антибіотиків та сироватки великої рогатої худоби протягом 3-х год, після чого середовище відбирали та додавали розчин 10% ДСН та 0,6 М HCl в і ДМСО для розчинення утворених за участі життєздатних клітин кристалів формазану. Результати тесту реєстрували при довжині хвилі 570 нм та референтній довжині хвилі 630 нм.

*Протокова цитофлуориметрія.* Клітини Vero та L929 від'єднували від пластикової підложки із застосуванням 30 мМ розчину двоосновної солі етилендіамінтетраоцтової кислоти у фосфатному буферному розчині (PBS) за 37°C. Ендоцитоз в клітинах пригнічували із використанням NaN<sub>3</sub>. Кількість клітин у суспензіях визначали із використанням гемоцитометру. Осадження клітин проводили центрифугуванням впродовж 10 хв при 300 g. Осаджені клітини

ресуспендували у 1–2 мл of 1%-го бичачого сироваткового альбуміну (БСА) та 0,02%  $\text{NaN}_3$  у PBS. Від 300 до 500 тисяч клітин відбирали у перерахунку на кожен пробу та осаджували центрифугуванням 15 секунд при 8000 g. Осаджені клітини знову ресуспендували у 200 мкл інкубаційного розчину, що містив досліджувану концентрацію рекомбінантних аналогів ДТ у 1% БСА та 0,02%  $\text{NaN}_3$  в PBS. Інкубацію проводили впродовж 40 хв за 4°C. Після закінчення інкубації, 1 мл 1%-го БСА та 0,02%  $\text{NaN}_3$  в PBS додавали до кожної проби і ще раз осаджували клітини при 8000 g впродовж 15 секунд. Результуючі клітинні осадки ресуспендували у 1 ml 1%-го БСА та 0,02%  $\text{NaN}_3$  у PBS, після чого переносили у пробірки для протокового цитофлуориметру.

Визначення інтенсивності флуоресценції клітин проводили на протоковому цитофлуориметрі Coulter Epics XL (Beckman Coulter, США). Інтенсивність флуоресценції EGFP та FITC, зв'язаних клітинами, визначали за каналом FL1 (довжина хвилі збудження 515–535 нм), а флуоресценції mCherry – FL3 (довжина хвилі збудження 610–630 нм).

*Конфокальна мікроскопія.* Для приготування препаратів для конфокальної мікроскопії, клітини культивували на покривних скельцях у 24-луночних планшетах. Перед дослідом клітини двічі промивали додаючи по 1 мл середовища RPMI-1640 без фетальної сироватки та антибіотиків на кожен лунку, після чого переводили на 1 мл чистої RPMI-1640 що містила 0,6 мМ вітального ядерного барвника Hoechst 33342 і досліджувану концентрацію відповідних рекомбінантних флуоресцентних протеїнів. Інкубацію проводили протягом набору часових інтервалів від 5 до 75 хв за 37°C. Для демонстрації інгібування ендоцитозу в клітинах, в інкубаційні проби вносили феніларсеноксид (РАО) у кінцевій концентрації 20 мМ. Після інкубації клітини тричі промивали в 1 мл PBS і проводили фіксацію протягом 40 хв за 4°C у 600 мкл 5% розчину параформальдегіду в PBS. Фіксовані клітини промивали у PBS і дистильованій воді, потім монтували на предметних скельцях у середовищі на основі полівінілового спирту із додаванням 2,5% 1,4-діазобіцикло-(2,2,2)-октану для гасіння неспецифічної флуоресценції.

Отримані проби висушували за 5°C протягом двох тижнів та аналізували за допомогою конфокального мікроскопу Carl Zeiss LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Німеччина). Довжина хвилі 488 нм використовувалася для збудження флуорофорів EGFP та FITC, 543 нм – для флуорофору mCherry і 405 нм – для Hoechst 33342. Інтенсивність флуоресценції EGFP та FITC вимірювали за 505–530 нм, mCherry – за 560–615 нм і для Hoechst 33342 – за 420–480 нм.

*Використання БЛМ для дослідження іон-провідних властивостей похідних ДТ.* Для дослідження впливу CRM197 та SbV на ліпідні бішари, використовували БЛМ, сформовані із розчину промислових препаратів фосфатидилетаноламіну та фосфатидилхоліну, суміш яких розчиняли в н-гептані у співвідношенні 1:1 при загальній концентрації ліпідів 20 мг/мл. Отриманий в результаті ліпідний розчин наносили на отвір у тефлоновому стаканчику (об'єм 1 мл) з діаметром 0,6 мм або дельриновому стаканчику (об'єм 1 мл) з діаметром 0,15 мм. Формування ліпідного бішару спостерігали візуально у відображеному світлі за допомогою бінокулярного мікроскопа. Водно-сольовий розчин, який оточував мембрану, містив 10 мМ Tris-HCl (pH 6,0 або 4,8) та задану концентрацію іонів хлориду калію. Різниця

потенціалів прикладалась до мембрани від джерела напруги, що дозволяло отримувати постійну (від  $-150$  мВ до  $150$  мВ) або лінійно змінювану напругу зі швидкістю  $60$  мВ/хв, використовуючи той самий діапазон амплітуд. Напругу, прикладену до мембрани, контролювали за допомогою цифрового вольтметра. Оточуючий мембрану водно-сольовий розчин перемішували магнітною мішалкою. Експерименти проводили при кімнатній температурі ( $20$ – $24^{\circ}\text{C}$ ).

*Визначення впливу рекомбінантних аналогів ДТ на ріст колоній клітин MDA-MB-231.* Клітини лінії MDA-MB-231 культивували на пластикових чашах Петрі. Для отримання окремих колоній, в одну чашу діаметром  $60$  мм вносили  $5,5$  тис клітин. На наступний день, після прикріплення клітин до пластикової основи, вносили поживне середовище, що містило рівні молярні концентрації (близько  $0,253$  мкМ) кожного із досліджуваних рекомбінантних фрагментів молекули ДТ. Кожні  $2$ – $3$  дні проводили заміну поживного середовища на свіже, яке містило досліджувані агенти у тій самій концентрації. Культивування проводили впродовж  $7$  діб, після чого проводили фіксацію та забарвлення клітин барвником генціан-фіолетовий. Проводили аналіз параметрів розміру та форми забарвлених колоній із використанням програмного забезпечення ImageJ.

*Статистична обробка даних.* Середні значення ( $M$ ) розраховували на основі  $3$ -х незалежних експериментів. Планки похибок представляють стандартні квадратичні відхилення ( $SD$ ) від відповідного значення величини  $M$ . В деяких випадках замість  $SD$  було вказано величини стандартних похибок ( $SE$ ). Достовірність відмін між дослідною та контрольною групами оцінювали за допомогою  $t$ -тесту з коефіцієнтом достовірності  $p < 0,05$  за допомогою програмного забезпечення Origin9. Обрахунок кінетичних параметрів взаємодії рекомбінантних похідних ДТ із клітинами Vero та L929 (величини  $K_b$  та  $IC_{50}$ ) проводили із використанням програмного забезпечення Origin8.

## Результати досліджень та їх обговорення

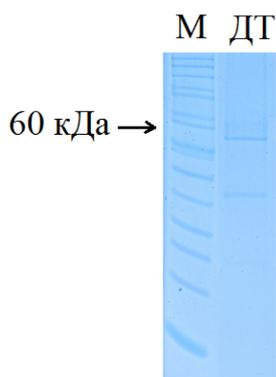
**Взаємодія фрагментів ДТ з рекомбінантними рецепторами в умовах *in vitro*.** Зв'язування нативного дифтерійного токсину та його рекомбінантних похідних CRM197 і субодиниці B, що була мічена зеленим флуоресцентним протеїном EGFP (EGFP-SbB), досліджено за допомогою ІФА по відношенню до рекомбінантного фрагменту рецептору ДТ, протеїну HB-EGF із клітин миші, яка є резистентною до дії токсину, а також – із клітин людини, яка є чутливою до токсину.

Нативний ДТ, виділений із культиваційного середовища *C. diphtheria* штаму PW8, що був використаний в роботі, характеризувався типовими для проб нативного ДТ електрофореграмами за методом ДСН-ПААГ (рис. 1).

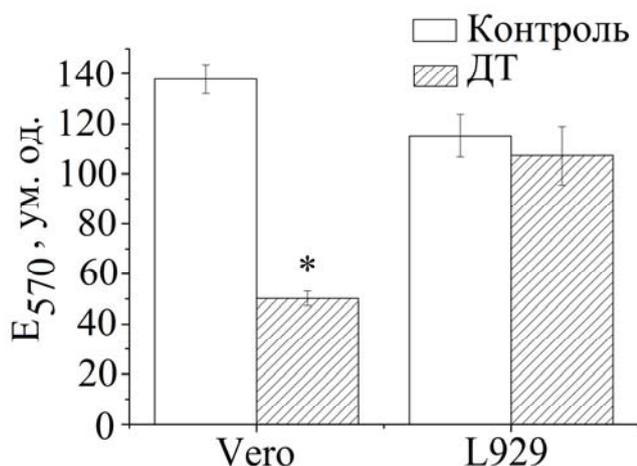
У концентрації  $5$  нМ, нативний ДТ із використаних проб призводив до суттєвої загибелі клітин Vero, що є чутливими до токсину, і водночас не викликав загибелі клітин L929, які є резистентними до дії токсину (рис. 2). Отже, використані в роботі проби ДТ зберігали основні властивості нативного токсину який продукує природний організм-продуцент.

Встановлено, що у порівнянні із досліджуваними рекомбінантними похідними нативний ДТ, синтезований у клітинах природного продуцента *C. diphtheria*,

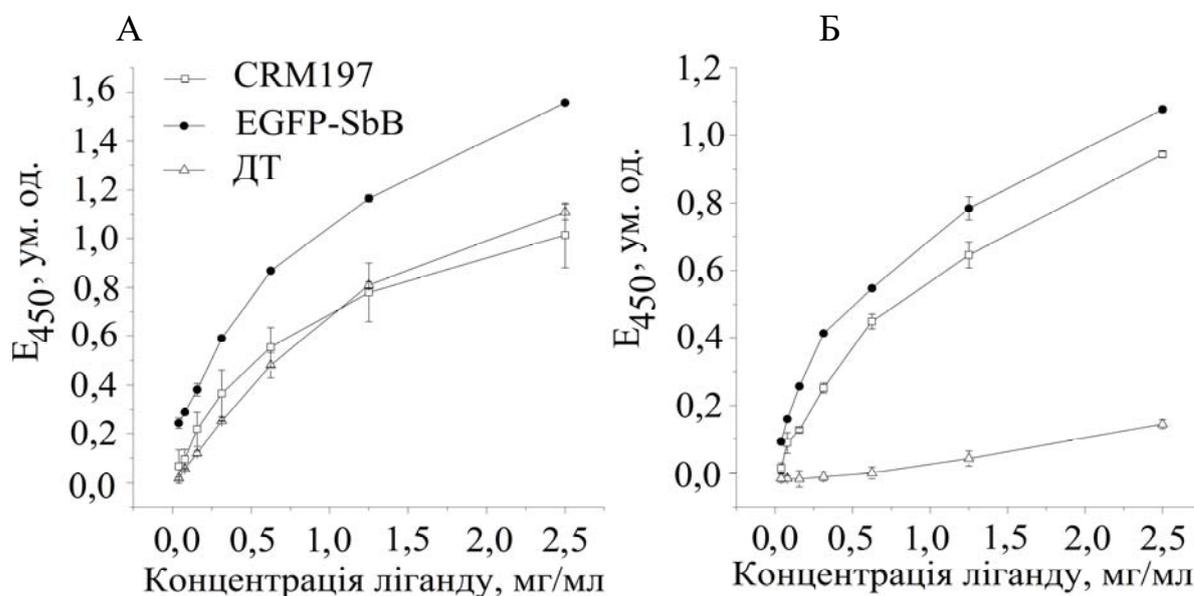
набагато менш ефективно зв'язується з рекомбінантним НВ-EGF миші. За аналогічних умов, похідні ДТ взаємодіяли з рекомбінантним НВ-EGF миші так само ефективно, як і з рекомбінантним НВ-EGF людини (рис. 3).



**Рис. 1.** Електрофореграма нативного ДТ, використаного в роботі, за методом ДСН-ПААГ. М – маркери молекулярної маси



**Рис. 2.** Гістограми, що характеризують рівень життєздатності клітин Vero та L929 за дії 0,3 мкг/мл нативного ДТ за умов експерименту, у порівнянні із контролем ( $M \pm SD$ ,  $N = 3$ ; \* – різниця є достовірною,  $p < 0,05$ ). За даними МТТ-тесту;  $E_{570}$  – оптична густина за довжини хвилі 570 нм

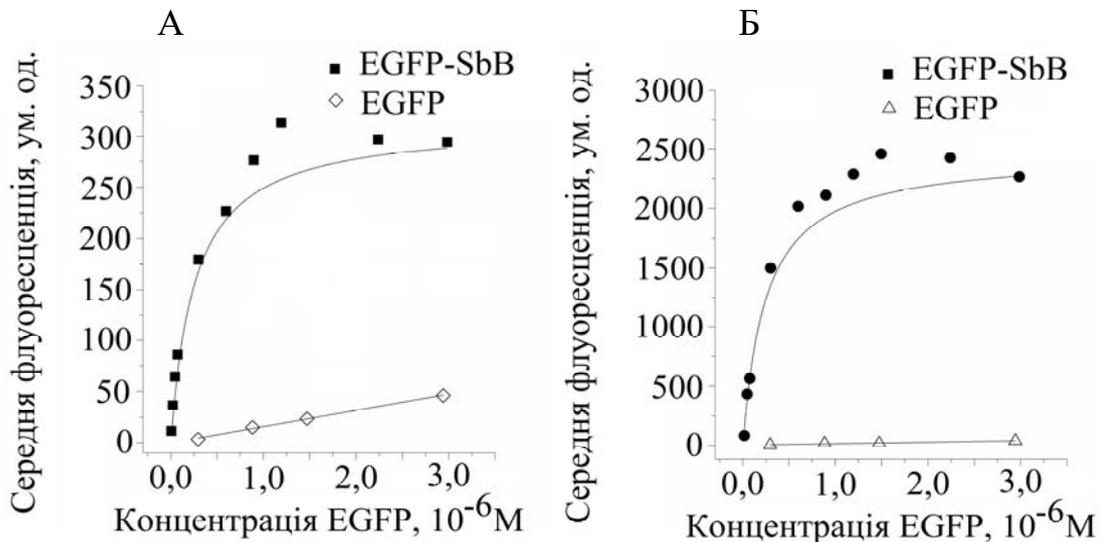


**Рис. 3.** Порівняння взаємодії ДТ та його рекомбінантних похідних зНВ-EGF миші (А) та людини (Б), проведений з використанням ІФА.  $\Delta E_{450}$  – різниця оптичного поглинання при 450 нм між дослідними та контрольними (БСА) пробами ( $M \pm SD$ ,  $N = 3$ )

Отже рекомбінантні аналоги ДТ, синтезовані в клітинах *E. coli*, можуть також виявляти підвищену здатність до зв'язування з рецептором токсину proHB-EGF резистентних до дії ДТ організмів.

**Взаємодія аналогів ДТ із рецепторами на поверхні чутливих та резистентних до токсину видів ссавців.** За допомогою методу протокової цитофлуориметрії, кінетичні параметри взаємодії EGFP-SbB та CRM197 були визначені по відношенню до proHB-EGF на поверхні чутливих до токсину клітин Vero і резистентних до токсину клітин L929.

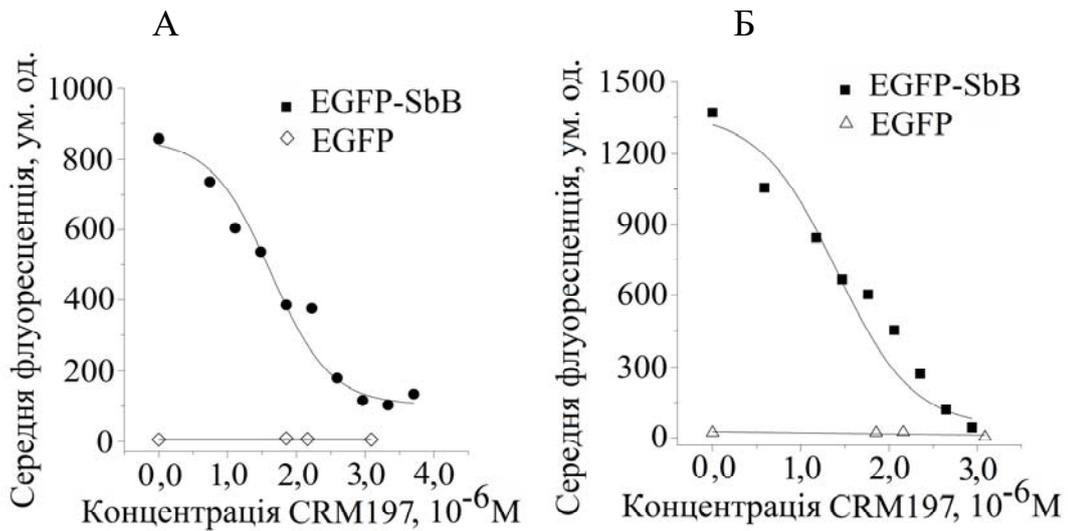
Побудовані ізотерми Лангмюра, що характеризують зв'язування субодиниці В із поверхнею клітин Vero та L929 (рис. 4), на основі яких були обраховані величини відповідних констант зв'язування ( $K_b$ ). Виявилось, що отримані  $K_b$  для EGFP-SbB ДТ і proHB-EGF на клітинах Vero та L929, є величинами одного порядку: 0,372 мкМ ( $R^2 = 0,958$ , SE = 0,065) для клітин Vero, та 0,269 мкМ ( $R^2 = 0,978$ , SE = 0,037) для клітин L929.



**Рис. 4.** Залежність інтенсивності флуоресценції клітин L929 (А) та Vero (Б) від концентрації протеїнів EGFP-SbB та EGFP; за даними типового експерименту. Кожна точка на графіку відповідає середній інтенсивності флуоресценції клітин у пробі за даними протокової цитофлуориметрії. Суцільні лінії на графіках представляють залежності, отримані шляхом апроксимації експериментальних даних до рівняння ізотерми Лангмюра із використанням програмного забезпечення Origin8

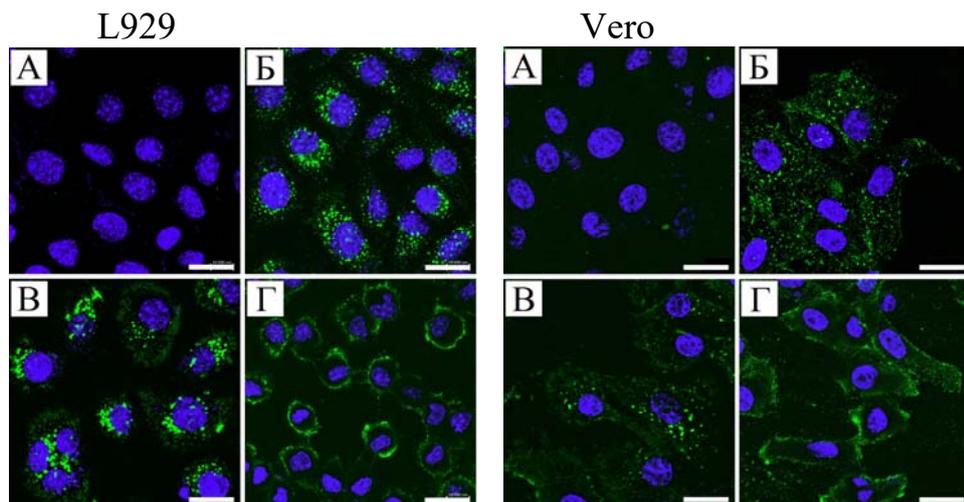
За допомогою аналізу конкурентного зв'язування EGFP-SbB і протеїну CRM197 із proHB-EGF на поверхні клітин (рис. 5), показано, що величини 50%-го витіснення протеїну EGFP-SbB протеїном CRM197 із комплексу з proHB-EGF, також близькі за значенням для клітин Vero та L929: 1,35 мкМ ( $R^2 = 0,975$ , SE = 0,146) для клітин лінії Vero та 1,59 мкМ ( $R^2 = 0,956$ , SE = 0,107) для клітин L929.

Отже, зв'язування рекомбінантних аналогів ДТ CRM197 та EGFP-SbB із proHB-EGF на клітинах Vero та L929 характеризується близькими значеннями константи афінності, що узгоджується із даними ІФА. Відповідно, специфічність взаємодії нативного ДТ із proHB-EGF резистентних клітин суттєво відрізняється від аналогічної специфічності взаємодії його відповідних рекомбінантних похідних.



**Рис. 5.** Залежності інтенсивності флуоресценції клітин ліній Vero (А) та L929 (Б) від концентрації протеїна CRM197 у пробі в присутності 3 мкМ EGFP-SbB, за даними типового експерименту. Точки на графіку – експериментальні дані, одержані за допомогою протокового цитофлуориметра. Суцільні лінії на графіках представляють залежності, отримані шляхом апроксимації експериментальних даних до рівняння конкурентного зв'язування двох лігандів із одним спільним сайтом взаємодії, розраховані за допомогою програмного забезпечення Origin8.

**Дослідження інтерналізації рекомбінантних похідних ДТ в клітини.** Інтерналізацію рекомбінантних похідних ДТ досліджували за допомогою методу конфокальної мікроскопії, який дозволяє вивчати внутрішньоклітинний розподіл досліджуваних протеїнів що містять флуоресцентну мітку (рис. 6).

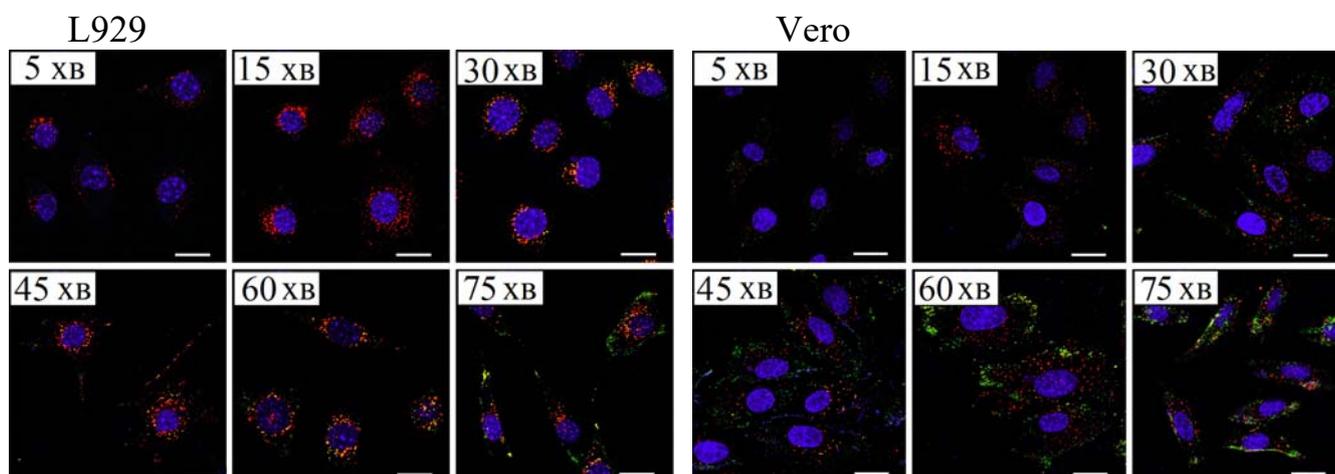


**Рис. 6.** Конфокальні знімки клітин L929 та Vero після інкубації з протеїнами EGFP та EGFP-SbB у концентрації 0,746 мкМ. EGFP та EGFP-SbB позначено зеленим кольором, Hoechst 33342 – синім. Оптичний зріз проходить приблизно через середину клітин. А – інкубація 60 хв з протеїном EGFP; Б – інкубація 15 хв з EGFP-SbB; В – інкубація 60 хв з EGFP-SbB; Г – інкубація з EGFP-SbB 60 хв у присутності 10 мкМ РАО. Бар складає 20 мкм

Показано, що інгібітор утворення клатринових пухирців PAO пригнічує інтерналізацію EGFP-SbB та міченого FITC протеїну CRM197 в клітини Vero та L929, отже, поглинання даних похідних в клітини є активним рецептор-залежним процесом, що регулюється саме клатрин-залежним ендцитозом (рис. 6, L929, Г та Vero, Г).

Дослідження впливу T-домену на інтерналізацію рекомбінантних аналогів ДТ в клітини. На основі даних конфокальної мікроскопії були обраховані такі параметри інтерналізації, як кількість ендосом в клітинах, їх загальна площа на поперечних оптичних секціях та площа окремих ендосом. Аналіз даних параметрів давав змогу оцінювати приблизний вміст флуоресцентних протеїнів, що інтерналізуються клітинами в ендосомах, для кожного із часових проміжків інкубації.

Даний підхід було застосовано також для порівняльного аналізу інтерналізації клітинами Vero та L929 протеїнів EGFP-SbB та протеїну Rd, що був мічений червоним флуоресцентним протеїном mCherry (mCherry-Rd) у часі (рис. 7).



**Рис. 7.** Конфокальні знімки клітин L929 та Vero інкубованих за одночасної присутності протеїнів EGFP-SbB та mCherry-Rd за концентрації, коли вони зв'язуються з клітинами у еквівалентних молярних кількостях. EGFP-SbB показаний у вигляді зеленого каналу флуоресценції, а mCherry-Rd – червоного. Ядра клітин забарвлені вітальним барвником Hoechst 33342 – синій канал. Оптичний зріз проходить приблизно через середину клітин. Бар складає 20 мкм

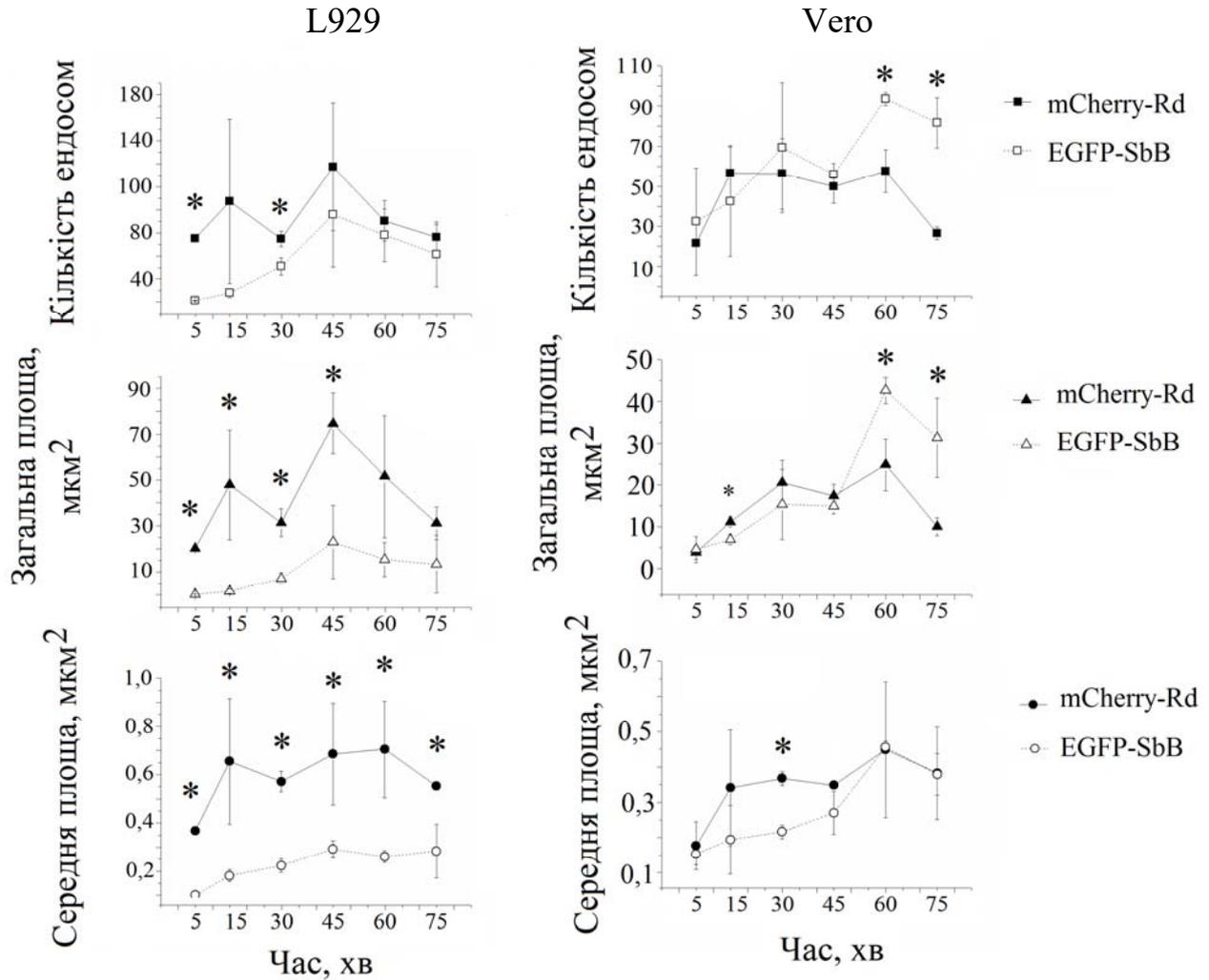
Було встановлено, що резистентні до токсину клітини лінії L929 поглинають більшу кількість молекул протеїну mCherry-Rd ніж EGFP-SbB, а чутливі до токсину клітини Vero поглинають більшу кількість EGFP-SbB ніж mCherry-Rd (рис. 8).

Встановлено, що характер колокалізації EGFP-SbB та mCherry-Rd мав різний характер в клітинах досліджуваних ліній: у L929 колокалізація відбувалась майже повністю на перших етапах обраного часового проміжку інкубації, після чого коефіцієнт колокалізації майже не змінювався, а у Vero колокалізація відбувалась поступово на всьому обраному часовому проміжку (рис. 9).

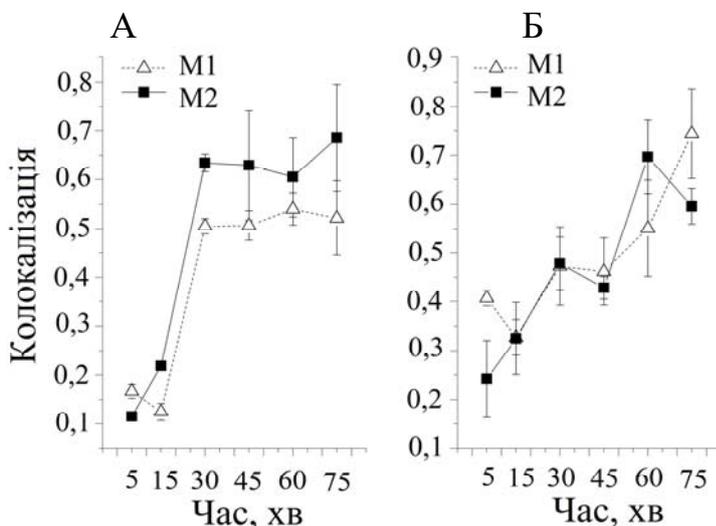
На основі отриманих результатів було сформульовано припущення, що встановлені відміни у внутрішньоклітинному транспорті субодиниці В та

рецепторного домену в резистентних та чутливих до токсину клітинах можуть бути обумовлені взаємодією транслокаційного домену із певними факторами клітин ссавців, які залучені до регуляції внутрішньоклітинного везикулярного транспорту.

Можливо, до цих факторів належить коатомерний комплекс I (COP1), на взаємодію якого із Td ДТ існують вказівки у літературі (Murphy J., 2011).



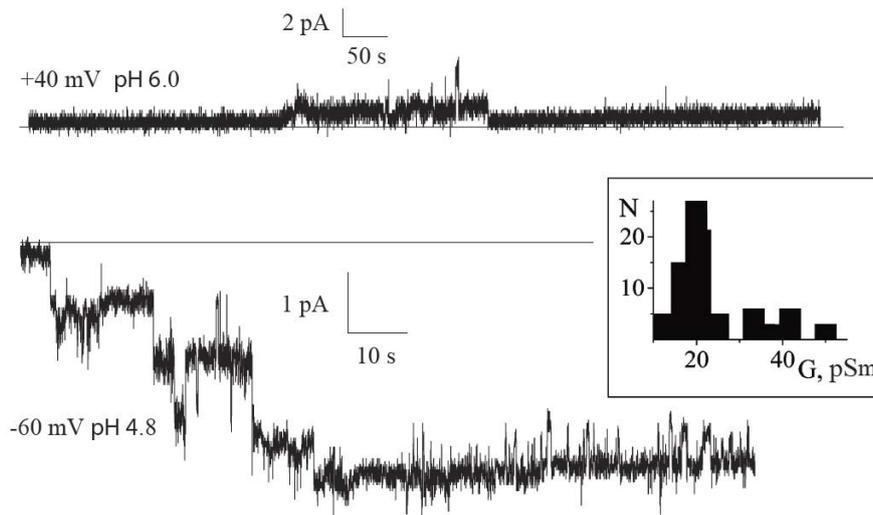
**Рис. 8.** Залежність ендосомальних параметрів клітин L929 та Vero від часу інкубації за одночасної присутності протеїнів EGFP-SbB та mCherry-Rd;  $M \pm SD$ ,  $N = 3$ , \* – відміни між двома групами є достовірними ( $p < 0,05$ )



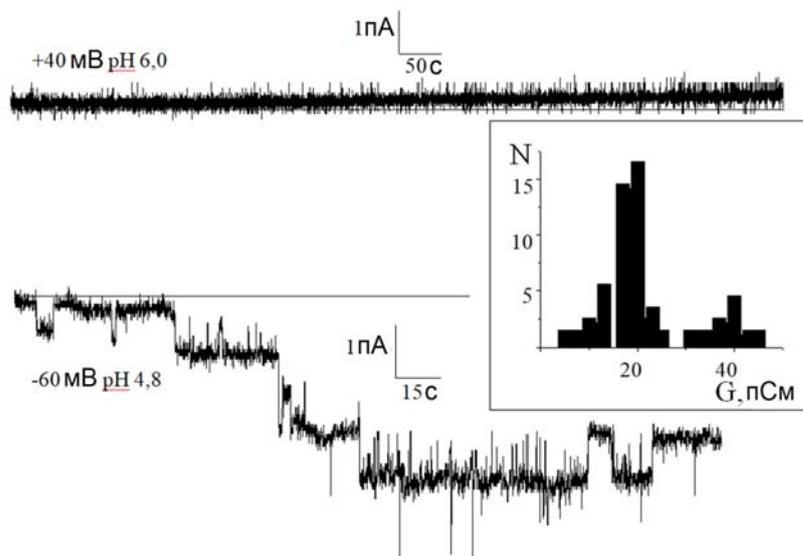
**Рис. 9.** Колокалізація протеїнів EGFP-SbB та mCherry-Rd впродовж інкубації, обрахована за коефіцієнтами Мандерса M1 і M2, у клітинах L929 (А) та Vero (Б);  $M \pm SD$ ,  $N = 3$

**Дослідження іон-провідної функції рекомбінантних похідних ДТ у штучних ліпідних мембранах.** Рівень функціональної активності Тd оцінювали за утворенням іон-провідних каналів з використанням БЛМ. Було показано, що поодинокі канали, утворені CRM197 та SbV в БЛМ, мали провідність 20 пСм, як і нативний ДТ (рис. 10 та 11).

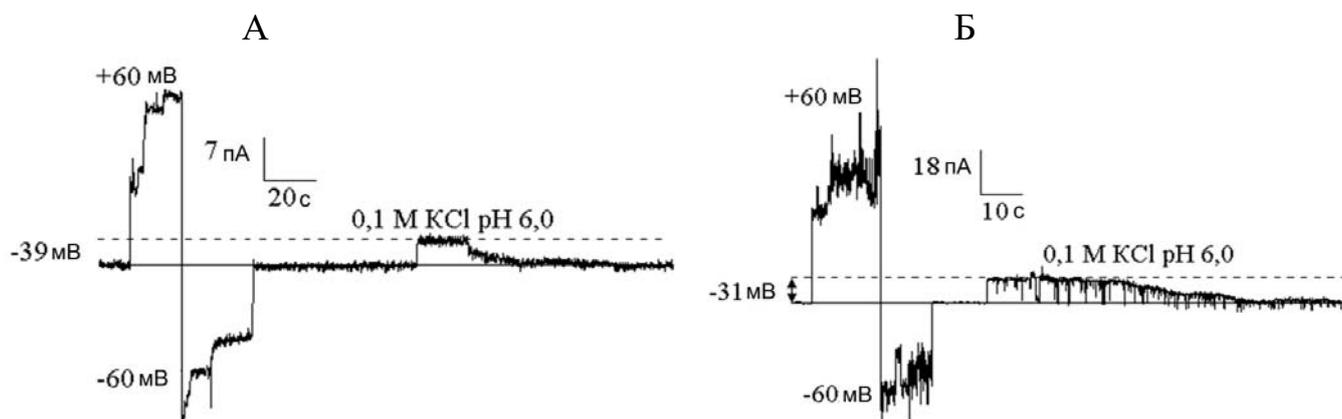
Досліджувані протеїни також відтворювали такі характеристики нативного токсину, як потенціало- та рН-залежність вбудовування і відкривання даних каналів. Аналіз макроскопічних струмів через БЛМ, з якими взаємодіяли CRM197 або SbV, показав, що досліджувані Тd-вмісні похідні ДТ повністю відтворюють характерні для природного ДТ вольт-амперні залежності (рис.12).



**Рис. 10.** Поодинокі канали CRM197 у БЛМ. Верхня доріжка: CRM197 у концентрації 2 нМ, потенціал  $-40$  мВ. Нижня доріжка: CRM197 у концентрації 2 нМ, потенціал  $+60$  мВ. Прямая лінія – нульовий потенціал. Мембрана оточена 1 М розчином KCl, рН з боку додавання CRM197 – 6,0; потенціали прикладали із боку додавання, а вимірювали з протилежного. Вставка: розподіл провідності поодиноких каналів CRM197 із 80-ти незалежних вимірів. N – кількість каналів; G – іонна провідність



**Рис. 11.** Канали SbV у БЛМ. Схема експерименту і позначення – як на рис. 12



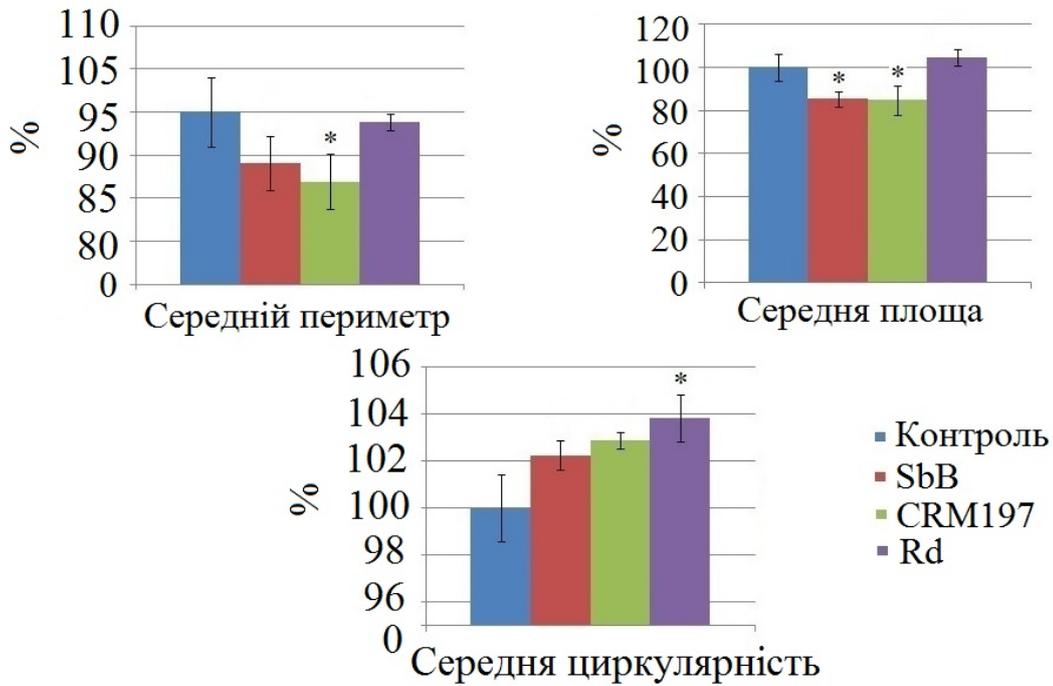
**Рис. 12.** Запис струму через багатоканальну БЛМ, модифіковану рекомбінантним протеїном CRM197 (А) та SbV (Б). Безперервною лінією позначено нульовий струм. Пунктиром і подвійною стрілкою позначено потенціал Нернста. Напругу прикладали з сторони БЛМ, яка протилежна тій з якої додавали протеїн. Значення рН і концентрації KCl відповідають тим, що існували з боку додавання протеїнів після заміни розчину 1М KCl (рН 6,0). У відділенні комірки, до якої протеїн не додавався, 1М KCl (рН 6,0) залишався незмінним у всіх випадках

Отримані дані свідчать на користь того, що Td у складі досліджуваних рекомбінантних протеїнів у повній мірі зберігав функції, притаманні нативному Td у складі ДТ. Отже, досліджувані аналоги ДТ можуть бути використані в подальшому для дослідження іон-провідної функції Td токсину.

**Цитостатична дія рекомбінантних аналогів молекули ДТ.** Проводили аналіз росту колоній клітин лінії раку грудної залози людини лінії MDA-MB-231 за присутності цілої молекули CRM197, а також фрагментів молекули токсину SbV та Rd. Було показано, що ті нетоксичні аналоги ДТ, які містили у своєму складі Td, пригнічували ріст колоній більш ефективно, ніж Rd (рис. 13). Rd практично не змінював розмір колоній MDA-MB-231, проте за його впливу форма колоній мала набагато більш високий показник циркулярності, що характеризує форму колоній. Це може свідчити про зменшення інтенсивності міграції клітин на поверхні прикріплення і, можливо, про менш виражену здатність до міграції поза межі пухлини в організмі.

Було висунуте припущення, що нетоксичні аналоги ДТ справляють свою цитостатичну дію не лише шляхом блокування розчинного HB-EGF за рахунок Rd, але і також за рахунок дії Td. Враховуючи високу пороформуючу активність досліджуваних аналогів ДТ у БЛМ, можна також припустити, що саме утворення іон-провідних каналів в ендосомах робить внесок у прояв цитостатичної дії.

Отримані результати свідчать, що Td та Rd у складі похідних токсину здатні пригнічувати розвиток пухлин, проте SbV є найменшим нетоксичним структурним фрагментом ДТ, що може повною мірою відтворювати механізм дії CRM197 за умов впливу на малігнізовані клітини *in vitro*. Останній результат містить у собі наукову новизну та є суттєвим практичним значенням проведеної роботи, зважаючи на очікувану меншу імуногенність SbV у порівнянні із імуногенністю цілої молекули CRM197.



**Рис. 13.** Середні значення показників розміру, загальної площі, периметру та циркулярності колоній клітин MDA-MB-231, що змінювались за умов досліду під впливом протеїнів CRM197, SbB та Rd; значення досліджуваних параметрів, виражені у відсотках по відношенню до контрольної проби  $M \pm SD$ ,  $N = 3$ , \* – відміни між двома групами є достовірними ( $p < 0,05$ )

## ВИСНОВКИ

На основі проведених досліджень було зроблено загальний висновок, що рекомбінантні аналоги ДТ, синтезовані в клітинах *E. coli*, можуть, на відміну від нативного ДТ, взаємодіяти з рецептором резистентних до токсину видів, що робить їх важливою моделлю для вивчення протипухлинних ефектів аналогів ДТ на лабораторних тваринах. Крім того, показано, що Td у складі аналогів ДТ є необхідним для прояву їх цитостатичної дії на клітини, тому такі рекомбінантні протеїни можуть бути застосовані для пригнічення росту малігнізованих клітин із гіперекспресією proHB-EGF та HB-EGF.

1. Вперше показано, що рекомбінантні аналоги ДТ CRM197 та EGFP-SbB, синтезовані в клітинах *E. coli*, виявляють підвищену здатність до зв'язування з рекомбінантним рецептором HB EGF резистентних до дії токсину видів ссавців, в той час як нативний ДТ виявляє низьку здатність до такого зв'язування.
2. Вперше показано, що зв'язування рекомбінантних протеїнів CRM197 та EGFP-SbB із токсин-чутливими клітинами Vero та токсин-резистентними клітинами L929 характеризуються значеннями константи афінності одного порядку ( $K_b = 0,372-0,296$  мкМ).
3. Доведено, що клітини L929 та Vero характеризуються відмінним кількісним співвідношенням і внутрішньоклітинним розподілом інтерналізованих молекул SbB та Rd ДТ.

4. Показано, що Td у складі рекомбінантних CRM197 та SbB зберігає здатність до формування іонних каналів у БЛМ, із характеристиками, близькими до каналів нативного ДТ.
5. Вперше показано, що Td у складі рекомбінантних CRM197 та SbB бере участь у реалізації цитостатичного впливу на проліферацію клітин раку грудної залози людини MDA-MB-231.

## СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Labyntsev A.J., Korotkevych N.V., **Manoilov K.J.**, Kaberniuk A.A., Kolybo D.V., Komisarenko S.V. Recombinant fluorescent models for studying the diphtheria toxin. Russ J Bioorg Chem. 2014; 40(4): 401–9. doi:10.1134/S1068162014040086 (*Особистий внесок здобувача: проведено оцінку цитотоксичної дії протеїну CRM197 по відношенню до клітин лінії Vero із використанням МТТ-тесту*).
2. **Manoilov K.Y.**, Labyntsev A.J., Korotkevych N.V., Kolibo D.V., Komisarenko S.V. Interaction of recombinant diphtheria toxoids with cellular receptors *in vitro*. Biotechnologia Acta. 9(3): 44–51. doi:10.15407/biotech9.03.044. (*Особистий внесок здобувача: проведено індукцію синтезу протеїнів CRM197 та EGFP-SbB в клітинах E. coli, отримання протеїнів CRM197 та EGFP-SbB із клітин E. coli після синтезу та очистку із використанням металоафінної хроматографії. За допомогою ІФА-аналізу досліджено зв'язування протеїнів CRM197, EGFP-SbB та нативного ДТ із рекомбінантним HB-EGF людини та миші. Проведено обробку і аналіз отриманих даних*).
3. **Манойлов К.Ю.**, Горбатюк О.Б., Усенко М.О., Шатурський О.Я., Борисова Т.О., Колибо Д.В. Охарактеризування очищеного рекомбінантного протеїну CRM197 як інструмента дослідження дифтерійного токсину. Допов. Нац. акад. наук Укр. 2016; (9):124–33. doi:10.15407/dopovid2016.09.124. (*Особистий внесок здобувача: проведено індукцію синтезу протеїну CRM197 в клітинах E. coli, отримання із клітин E. coli після синтезу та очистку протеїну CRM197 із використанням металоафінної хроматографії. Проведено культивування клітин ліній Vero та L929. Проведено аналіз взаємодії протеїну CRM197 із клітинами методом протокової цитофлуориметрії. Проведено мічення препарату CRM197 FITC, досліджено взаємодію міченого FITC CRM197 із клітинами методом конфокальної мікроскопії. Проведено обробку і аналіз частини отриманих даних*).
4. **Манойлов К.Ю.**, Горбатюк О.Б., Усенко М.О., Шатурський О.Я., Борисова Т.О., Колибо Д.В., et al. Характеризація очищеної рекомбінантної субодиниці В дифтерійного токсину як інструмента його дослідження. Допов. Нац. акад. наук Укр. 2017; (2):88–99. doi:10.15407/dopovid2017.02.088 (*Особистий внесок здобувача: проведено індукцію синтезу протеїну SbB в клітинах E. coli, отримання SbB із клітин E. coli після синтезу із використанням металоафінної хроматографії. Проведено культивування клітин ліній Vero та L929. Проведено аналіз взаємодії флуоресцентної SbB із клітинами методом протокової цитофлуориметрії. Проведено обробку і аналіз частини отриманих даних*).
5. **Manoilov K.Y.**, Labyntsev A.J., Korotkevych N.V., Kolibo D.V. Enhancement of internalization of diphtheria toxin recombinant fragments in sensitive cells mediated by toxin's T-domain. Ukr. Biochem. J. 2017; 89(5):96–105. doi:10.15407/ubj89.05.096. (*Особистий внесок здобувача: проведено індукцію синтезу протеїнів EGFP-SbB та mCherry-Rd в клітинах E. coli. Проведено отримання та очистку протеїнів EGFP-SbB та mCherry-Rd із клітин E. coli після синтезу за допомогою металоафінної хроматографії. Проведено культивування клітин ліній Vero та L929, та приготування проб для конфокальної мікроскопії. Проведено обробку і аналіз отриманих даних*).

6. **Manoilov K.Y.**, Krynina O.I., Labyntsev A.J., Romaniuk S.I., Kolybo D.V. Necessity of translocation domain in non-toxic derivatives of diphtheria toxin for realisation of their cytostatic effect. *Biotechnologia Acta*. 11(2):64–71. doi:10.15407/biotech11.02.064 (*Особистий внесок здобувача: проведено індукцію синтезу протеїнів CRM197, SbB та Rd в клітинах E. coli. Проведено отримання та очистку цих протеїнів із клітин E. coli після синтезу за допомогою метало афінної хроматографії. Проведено культивування клітин раку грудної залози людини лінії MDA-MB-231 за умов присутності протеїнів CRM197, SbB та Rd в культивуванні середовищі. Проведено обробку і аналіз отриманих даних.*)

7. **Манойлов К.Ю.**, Короткевич Н.В., Лабинцев А.Ю. Механізми резистентності до дифтерійного токсину клітин нечутливих видів ссавців // Біологічні дослідження молодих науковців в Україні: всеукр. конф. студ., асп. та мол. наук., 14–16 лист. 2012 р.: тези доп. – Київ, 2012. – С. 31.

8. **Манойлов К.Ю.**, Короткевич Н.В., Лабинцев А.Ю. Взаємодія флуоресцентного похідного дифтерійного токсину з резистентними до його дії клітинами миші (*Mus musculus* L) лінії L929 // Актуальні проблеми біохімії та біотехнології: міжгалуз. конф. мол. наук., 6–7 черв. 2013 р.: тези доп. – Київ, 2013. – С. 142.

9. **Manoilov K.Yu.**, Labyntsev A.Ju., Korotkevych N.V., Maksymovych I.S., Kolybo D.V., Komisarenko S.V. Interaction of diphtheria toxin B-subunit with mammalian cells: potential for biomedical application // 7<sup>th</sup> TriNet Meeting: int. meeting., 6–9 Oct., 2016.: abstr. – Budapest, 2016. – P. 92.

10. **Манойлов К.Ю.**, Лабинцев А.Ю., Короткевич Н.В., Колибо Д.В., Комісаренко С.В. Закономірності інтерналізації субодиниці В та R-домену дифтерійного токсину резистентними до токсину клітинами лінії L929 // XI Український біохімічний конгрес: міжн. конф., 6–10 жов. 2014 р.: тези доп. – Київ, 2014. – С. 105.

11. **Manoilov K.Yu.**, Labyntsev A.Ju., Korotkevych N.V., Chudina T.A., Kolybo D.V., Komisarenko S.V. Interaction of diphtheria toxin B-subunit with mammalian cells: potential for biomedical application // Bridges in Life Sciences 10-th Annual Scientific Conference: int. conf., 16–19 Apr., 2015 p.: abstr. – Wroclaw, 2015. – P. 73.

12. **Manoilov K.Y.**, Shatursky O.Ya., Gorbatiuk O.B., Kolibo D.V., Borisova T.A., and Komisarenko S.V. Characterization of recombinant protein CRM197 expressed in *E. coli* for studying the diphtheria toxin // X Parnas Conference: int. conf., 10–12 Jul., 2016: abstr. – Wroclaw, 2016. – P. 28.

13. Характеристика рекомбінантних протеїнів CRM197 та субодиниці В, як інструмента дослідження дифтерійного токсину / Шатурський О.Я., **Манойлов К.Ю.** // Науковий семінар Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України «Актуальні проблеми сучасної біохімії»: наук. семінар., 14 чер. 2016 р.: тези доп. – Київ, 2016.

## АНОТАЦІЯ

**Манойлов К.Ю.** “Біологічні властивості рекомбінантних фрагментів молекули дифтерійного токсину”. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна Національної академії наук України, Київ, 2018.

Дисертація присвячена дослідженню біологічних проявів взаємодії нетоксичних рекомбінантних аналогів дифтерійного токсину (ДТ) із клітинами, що експресують рецептор токсину proHB-EGF. Встановлено, що на відміну від нативного ДТ, його рекомбінантні аналоги CRM197 та субодиниця В (SbV) набагато ефективніше зв'язуються з рекомбінантним фрагментом рецептору ДТ, протеїном HB-EGF, резистентної до токсину миші (*Mus musculus* L). При цьому зв'язування нативного ДТ, CRM197 і SbV із рекомбінантним HB-EGF чутливої до ДТ людини, виявилось однаково ефективним. Показано також однакову розмірність констант афінності CRM197 та SbV до рецептору proHB-EGF резистентних до ДТ клітин миші лінії L929 та чутливих до токсину клітин зеленої мавпи (*Cercopithecus aethiops* L) лінії Vero. Встановлено, що за тих самих умов коли клітини Vero поглинають в ендосомах більше молекул SbV ніж рекомбінантного рецептор-зв'язувального домену (Rd) ДТ, клітини L929 поглинають більшу кількість молекул Rd ніж SbV. Характер колокалізації SbV та Rd відрізнявся в клітинах цих ліній. Отримані результати вказують на можливий вплив транслокаційного домену (Td) ДТ на процеси інтерналізації та ендосомального транспорту. Продемонстровано наявність та проведено охарактеризування іон-провідних властивостей CRM197 та SbV у штучних бішарових ліпідних мембранах (БЛМ). Встановлено, що Td у складі нетоксичних аналогів ДТ залучений у реалізацію цитостатичної дії. Відповідно рекомбінантні нетоксичні аналоги ДТ можуть бути використані для пригнічення росту пухлин у резистентних до токсину організмів ссавців, а аналоги ДТ, що не містять у своєму складі субодиниці А та містять Td, можуть потенційно мати найбільш виражену протипухлинну дію та найменшу кількість побічних ефектів при введенні в організм тварин та людини.

**Ключові слова:** дифтерійний токсин, ендоцитоз, інтерналізація, токсод, proHB-EGF

## АННОТАЦІЯ

**Манойлов К.Ю. "Биологические свойства рекомбинантных фрагментов молекулы дифтерийного токсина". – Рукопись.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 – биохимия. – Институт биохимии имени А.В. Палладина Национальной академии наук Украины, Киев, 2018.

Диссертация посвящена исследованию биологических проявлений взаимодействия нетоксичных рекомбинантных аналогов дифтерийного токсина (ДТ) с клетками, экспрессирующими рецептор токсина proHB-EGF. Установлено, что в отличие от нативного ДТ, его рекомбинантные аналоги CRM197 и субъединица В (SbV) намного эффективнее связываются с рекомбинантным фрагментом рецептора ДТ, протеином HB-EGF, резистентной к токсину мыши (*Mus musculus* L). При этом связывание нативного ДТ, CRM197 и SbV с рекомбинантным HB-EGF чувствительного к токсину человека, оказалось одинаково эффективным. Показано также одинаковую размерность констант аффиности CRM197 и SbV к рецептору proHB-EGF резистентных к ДТ клеток мыши линии L929 и чувствительных к токсину клеток зелёной мартышки (*Cercopithecus aethiops* L) линии Vero. Установлено, что при тех же самых условиях когда клетки Vero

поглощают в эндосомах большее количество молекул SbB чем рекомбинантного рецептор-связывающего домена (Rd) ДТ, клетки L929 поглощают большее количество молекул Rd чем SbB. Характер колокализации SbB и Rd отличался в клетках этих линий. Полученные результаты указывают на возможное влияние транслокационного домена (Td) ДТ на процессы интернализации и эндосомального транспорта. Продемонстрировано наличие и проведено характеризацию ион-проводящих свойств CRM197 и SbB в искусственных двуслойных липидных мембранах (БЛМ). Установлено, что Td в составе нетоксичных производных ДТ вовлечён в реализацию цитостатического действия. Следовательно рекомбинантные нетоксичные аналоги ДТ могут быть использованы для угнетения роста опухолей у резистентных к токсину организмов млекопитающих, а аналоги ДТ, которые не содержат в своем составе субъединицы А и содержат Td, могут потенциально иметь наиболее выраженное противоопухолевое действие и наименьшее количество побочных эффектов при введении в организм животных и человека.

**Ключевые слова:** дифтерийный токсин, эндоцитоз, интернализация, токсид, proHB-EGF

## SUMMARY

**Manoilov K.Yu. "Biological properties of recombinant fragments of diphtheria toxin molecule". – Manuscript.**

A dissertation for the scientific degree of candidate of biological sciences by specialty 03.00.04 – Biochemistry. – A.V. Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2018. Dissertation is devoted to the study of biological responses resulted from the interaction of nontoxic derivatives of diphtheria toxin (DT) with cells which express the toxin receptor proHB-EGF. It was found that unlike the native DT, its recombinant analogs CRM197 and subunit B (SbB) much more effectively bind the recombinant fragment of DT receptor, protein HB-EGF, of resistant to toxin mouse (*Mus musculus* L). At the same time, binding of native DT, CRM197 and SbB to recombinant HB-EGF of human, which is sensitive to toxin, was found to be equally effective. Also, the same order of affinity constants was demonstrated for CRM197 and SbB binding to receptor proHB-EGF of resistant to toxin murine L929 cells and sensitive to toxin African green monkey (*Cercopithecus aethiops* L) Vero cells. It was found that under the conditions when Vero cells internalize in endosomes more molecules of SbB than of the recombinant receptor-binding domain (Rd) of DT, L929 cells internalize more molecules of Rd than SbB. The pattern of colocalization of SbB and Rd was different in these cell lines. Obtained results indicate the possible participation of the translocation domain (Td) of DT in processes of internalization and endosomal transport. Ion-conductive properties of CRM197 and SbB were demonstrated and characterized in black lipid membranes (BLM). It was found that Td, as a part of nontoxic DT derivatives, is involved in realization of cytostatic effect. Therefore, recombinant nontoxic analogs of DT can be used for suppression of tumor growth in toxin-resistant mammalian species, and DT analogs, which do not contain subunit A and contain the Td, potentially can possess the most pronounced antitumor action and the least number of side effects when administered to animals and human.

**Keywords:** diphtheria toxin, endocytosis, internalization, toxoid, proHB-EGF