

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ**

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

УСЕНКО Марія Олександрівна

УДК 579.69 : 577.112

ДИСЕРТАЦІЯ

**СТВОРЕННЯ ГЕННО-ІНЖЕНЕРНИХ КОН'ЮГАТИВ І ЇХ
ВИКОРИСТАННЯ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ВАЖЛИВИХ
У ТЕРАПЕВТИЧНОМУ ЗНАЧЕННІ БІЛКІВ**

03.00.20 – біотехнологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ М. О. Усенко

Науковий керівник: **Кордюм Віталій Арнольдович**, доктор біологічних наук, професор, член-кореспондент НАН України, академік НАМН України

Київ – 2021

АНОТАЦІЯ

Усенко М.О. Створення генно-інженерних кон'югатів, їх використання для виявлення та очищення важливих у терапевтичному значенні білків. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.20 – «Біотехнологія». – Інститут молекулярної біології і генетики Національної Академії Наук України, Київ, 2021.

Дисертаційна робота присвячена створенню біфункціональних генно-інженерних кон'югатів на основі цільових білків та маркерних молекул, визначенню можливості їх практичного застосування для виявлення та очищення специфічних антитіл, перевірці ефективності отриманих злитих білків для проведення імунологічних досліджень. Антитіла широко застосовуються в сучасних фундаментальних і прикладних медико-діагностичних дослідженнях. Для підвищення ефективності отримання антитіл та їх очищення застосовуються нові підходи. Так, для очищення моноклональних антитіл застосовують афінні сорбенти на основі білка А *Staphylococcus aureus* та G *Streptococcus* sp. Однак, у випадку поліклональних сироваток, відсоток цільових антитіл в яких може коливатися в широких межах, зазначеними методами не можливо виділити високоспецифічні антитіла. Застосування інших хроматографічних підходів, що базуються на фізико-хімічних властивостях антитіл, не може забезпечити необхідного ступеня чистоти, що зумовлює необхідність розробки ефективних методів виділення специфічних антитіл. Ефективним є очищення антитіл на антигені, який іммобілізується через послідовність білка-партнера або афінної мітки, що дозволяє уникнути етапу хімічної модифікації матриці та антигену. Отже, актуальним завданням сучасних біотехнологічних досліджень є створення генно-інженерних кон'югатів на основі цільового антигену та маркерної

молекули для іммобілізації на матриці з метою очищення специфічних поліклональних антитіл.

Перспективним є отримання антитіл до інтерлейкіну-7 людини (hIL-7) – терапевтично важливого імунного цитокіну, що суттєво впливає на дозрівання та гомеостаз Т- і В-лімфоцитів. Визначення його рівня має прогностичне значення для оцінки перебігу різних захворювань, таких, як вірусні інфекції (ВІЛ, цитомегаловірусна інфекція, вірусний гепатит С), розсіяний склероз (РС), ревматоїдний артрит, діабет 1 типу, синдром важкого комбінованого імунодефіциту та інших. Важливим прогностичним показником є рівень одного з ланцюгів рецептора IL-7R (CD127 і розчинної форми sCD127) у плазмі крові. Для діагностики виникає необхідність у високоспецифічних антитілах, що розрізняють різні ізоформи одного білка.

Тому перша частина даного дослідження присвячена отриманню злитих рекомбінантних білків на основі інтерлейкіну 7 людини з С-кінцевим залишком олігогістидину (rhIL7-His) та целюлозозв'язувальним доменом (rhIL-7-CBD). Було створено їх штами-продуценти *E. coli* та визначено умови, що забезпечили отримання цільових білків у формі бактерійних тілець включення. Відтак, оптимізовано методи їх отримання у розчинній функціонально-активній формі ренатурацією *in vitro*. Злитий білок rhIL7-CBD, після іммобілізації на мікрокристалічній целюлозі CC31, та rhIL7-His, після іммобілізації на металоафінному сорбенті, було застосовано для виділення специфічних до IL-7 антитіл з сироваток імунізованих тварин із чистотою понад 95 %.

Перевірку активності rhIL-7 проведено із використанням мононуклеарних клітин периферичної крові (МНПК). Також проведено дослідження впливу IL-7 на МНПК, і показано, що реакція на IL-7 відрізняється для МНПК від різних донорів. Індивідуальна реакція МНПК людини на IL-7 є цінною прогностичною інформацією про стан імунної системи. Ця інформація є корисною для подальшого широкомасштабного дослідження відповіді підгруп Т-клітин на проведення терапії на основі IL-7.

Для отримання rhIL7 з нативним N-кінцем в бактерійній системі синтезу було створено білок CBD-intein(his)-rhIL7. Конструкція з інтеїном дозволила отримувати цільовий білок з високим ступенем чистоти. В проведеному дослідженні встановлено умови індукування синтезу цільового білка, які забезпечили його накопичення формі бактерійних тілець включення. Оптимізовано умови білкового сплайсингу, та отримано очищений білок.

Бажаним є зниження собівартості імунокон'югатів антитіл з ферментами, флуоресцентними мітками, афінними мітками, які, зазвичай, одержують коштовним і малоефективним способом хімічної кон'югації. Сьогодні з використанням сучасних методів генної інженерії можливо створювати аналоги природних антитіл – рекомбінантні антитіла, які можна використовувати як селективні імунореагенти. Для цього розроблено комплексний підхід, який включає в себе методи створення та селекції великих комбінаторних бібліотек кДНК V-генів імуноглобулінів *in vitro* і дозволяє одержувати специфічні імунореагенти проти широкого спектру антигенів, а також забезпечує їхнє продукування в клітинах мікроорганізмів, рослин і дріжджів, що значно знижує їх собівартість. Перспективними є молекули, одержані злиттям рекомбінантних одноланцюгових антитіл (scFv – single-chain fragment variable antibodies), з ферментами, флуоресцентними білками або афінними мітками. Створення та використання таких химерних молекул як імунологічних зондів значно здешевлює проведення імунологічних досліджень порівняно з використанням комерційно доступних моноклональних антитіл, хімічно кон'югованих з ферментом/флуорофором. Це дозволяє говорити про їх перспективність для застосування як у класичних типах імунодіагностики, так і в нових напрямках досліджень молекулярних процесів *in vivo* та *in vitro*.

В даній роботі отримано біфункціональний злитий білок на основі scFv, специфічних до інтерферону бета-1b людини (IFN β -1b) та бактерійної лужної фосфатази із підвищеною каталітичною активністю (BAPmut). Зазначений імунокон'югат scFv(IFN β 1b-BAPmut дозволяє проводити швидку детекцію

наявності IFN β -1b та визначення його концентрації в ELISA. Отриманий плазмідний вектор *pCANTAB-scFv(IFN β 1b)-VAPmut* в подальшому може бути використаний як основа для створення продуцентів scFv різної специфічності кон'югованих з лужною фосфатазою.

Під час роботи з імунними комбінаторними бібліотеками кДНК варіабельних генів імуноглобулінів важливим етапом є їх скринінг. Від його ефективності залежить специфічність отриманих рекомбінантних одноланцюгових антитіл. Тому застосування злитих білків на основі цільового антигену та маркерної молекули забезпечує селективне виділення цільових білків та дозволяє скоротити час проведення самого скринінгу.

В дисертаційному дослідженні сконструювано ген біфункціонального злитого білка rhIL7-VAPmut, плазмідний вектор на його основі та штам-продуцент *E. coli*. Отримано rhIL7-VAPmut, та оптимізовано метод його очистки та ренатурації. Встановлено функціональну активність обох складових рекомбінантного білка та продемонстровано можливість його застосування для скринінгу комбінаторної бібліотеки кДНК варіабельних генів імуноглобулінів.

У випадку аутоімунних хвороб, таких, як розсіяний склероз та ревматоїдний артрит, наразі активно досліджують протеїнкіназу ASK1 (апоптоз сигнал-регулююча кіназа 1). ASK1 активує сигнальні шляхи клітини у відповідь на різні типи стресу. Показано важливість цього ензиму в канцерогенезі шкіри та розвитку раку шлунку. За рахунок участі у сигнальному шляху TLR4-ASK1-p38 ASK1 є мішенню для послаблення нейрозапалення, демієлінізації спинного та зорового нервів. Таким чином, низькомолекулярні інгібітори ASK1 можуть бути важливими сполуками для фармацевтичної індустрії. Створення продуцента рекомбінантного аналога протеїнкінази дозволяє отримати білок для проведення пошуку інгібіторів ASK1. У роботі визначено умови біосинтезу рекомбінантного аналога протеїнкінази ASK1 людини, які забезпечили отримання в препаративній

кількості ферменту з функціональною активністю, співставною з комерційно доступними аналогами.

У дисертаційній роботі створено генно-інженерні кон'югати з доведеною функціональною активністю. На їх основі було розблено імуносорбенти для очищення антитіл до інтерлейкіну 7 людини та методику ефективної одностадійної детекції вказаних антитіл.

Ключові слова: рекомбінантні білки, ренатурація, імуносорбенти, антитіла, афінна хроматографія, інтерлейкін 7 людини (rhIL7), одноланцюгові антитіла scFv, ASK1.

Список публікацій здобувача:

Статті у наукових фахових виданнях

1. **Усенко М.О.**, Горбатюк О.Б., Окунєв О.В., Іродов Д.М., Ковальчук М.В., Кордюм В.А. Отримання рекомбінантного злитого білка rhIL7-CBD. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2020. Т. 26. С. 282–286. DOI: 10.7124/FEEO.v26.1280. *Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, підбір умов синтезу, виділення та очищення білка, перевірка активності, обробка результатів, написання статті та підготування її до друку.*

2. Kovalchuk M.V., Ruban T.A., **Usenko M.O.**, Kordium V.A. Personalized responsiveness of human PBMCs to the action of IL-7. *Biopolymers and Cell*. 2020. Vol. 36. N 4. P. 304–312. DOI: 10.7124/bc.000A33. *Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, участь у підготовці експериментів, участь у написанні статті та підготовці її до друку.*

3. **Усенко М.О.**, Окунєв О.В., Бенціонова К.І., Горбатюк О.Б., Іродов Д.М., Кордюм В.А. Отримання рекомбінантного злитого білка rhIL7-VARmut та його функціональна характеристика. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2019. Т. 25. С. 321-326. DOI: 10.7124/FEEO.v25.1185. *Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, підбір умов синтезу, виділення*

та очищення білка, перевірка активності, обробка результатів, написання статті та підготування її до друку.

4. **Усенко М.О.**, Окунєв О.В., Бенціонова К.І., Горбатюк О.Б., Іродов Д.М., Ковальчук М.В., Кордюм В.А. Оптимізація умов ренатурації злитого білка rhIL7-VAPmut із тілець включення *Escherichia coli* та його практичне застосування. *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів*. 2019. Т. 17, № 1. С. 39-45. DOI: 10.7124/visnyk.utgis.17.1.1199. *Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, підбір умов очищення та ренатурації білка, перевірка активності, обробка результатів, написання статті та підготування її до друку.*

5. Volynets G.P., Gorbatiuk O.B., Kukharenko O.P., **Usenko M.O.**, Yarmoluk S.M. Production of recombinant human apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 2016. Vol. 126. P. 89-92. DOI: 10.1016/j.pep.2016.05.016. *Особистий внесок здобувача: підбір умов синтезу, виділення та очищення білка, перевірка активності, обробка результатів.*

Патент

6. Патент на корисну модель № 132794 Україна. МПК (2019.01) C12N 15/00. Опубл. 11.03.2019, Бюл. № 5. Модифікований генно-інженерний злитий білок scFv(IFN β 1b)-VAP, продукований бактеріями *E. coli*. Горбатюк О.Б., **Усенко М.О.**, Іродов Д.М., Кордюм В.А. Заявл. 02.10.2018; опубл. 11.03.2019. *Особистий внесок здобувача: підбір умов виділення та встановлення активності білка, обробка результатів, участь у написанні патенту.*

Тези наукових доповідей на конференціях

7. Gorbatiuk O.B., **Usenko M.O.**, Okunev O.V., Bentsionova K. I., Irodov D.M. Optimization of renaturation method of the IL7-VAPmut fusion protein, its characterization and application. Матеріали XII Українського біохімічного

конгресу, м. Тернопіль, 2019. *Медична та клінічна хімія*. Т. 21, № 3 (додаток). С. 266.

8. **Usenko M.**, Gorbatiuk O., Okunev O., Kordium V. High-throughput purification method of the recombinant human IL7. 20th International Summer School on Immunology “Immune System: Genes, Receptors and Regulation”, Hvar, Croatia, 2019. Book of abstracts P. 107.

9. **Usenko M.**, Gorbatiuk O., Okunev O., Kordium V. Obtaining and characterization of a singlechain variable fragment alkaline phosphatase fusion proteins and specific polyclonal antibodies for detection of IFNbeta and interleukin10. 43rd FEBS Congress, Prague, Czech Republic 2018. *FEBS Open Bio*. Vol. 8, N 1. P. 186.

10. **Usenko M.O.**, O.B. Gorbatiuk, O.V. Okunev, V.A. Kordium. Obtaining and characterization of the IL-7-CBD fusion protein. Materials of XII annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Kyiv, 2018. *Biopolym. Cell*. Vol. 34, N 2. P. 163.

11. **Usenko M.O.**, O.B. Gorbatiuk, O.V. Okunev, V.A. Kordium. Production of IL7-His recombinant protein for purification of polyclonal antibodies. XIth Parnas Conference: Young Scientists Forum «Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine» Kyiv, Ukraine, 2018. *Ukr. Biochem. J*. Vol. 90, Special Issue. P. 70.

12. **Usenko M.O.**, Gorbatiuk O.B., Okunev O.V., Kordium V.A. Production of IL7-fusion recombinant proteins and their application for affinity chromatography resin creation. 15th Horizons in Molecular Biology: International PhD Student Symposium, Göttingen, Germany, 2018. Abs. book. P.124.

13. Gorbatiuk O., Volynets G., **Usenko M.**, Yarmoluk S. Efficient method for the obtaining of Recombinant Human Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) in *Escherichia coli*. 45th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separation and Related Techniques, Prague, Czech Republic, 2017. Abs. book. P. 113.

14. **Usenko M.**, Gorbatiuk O., Filipenkova N., Okunev O., Kordium V. Production and characterization of single-chain variable fragment antibodies against interferon beta-1b and interleukin-10. Materials of XI annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Kyiv, 2017. *Biopolym. Cell.* Vol. 33, N 3. P. 236.

15. **Усенко М.О.**, Горбатюк О.Б., Іродов Д.М., Кордюм В.А. Отримання та характеристика одноланцюгових антитіл специфічних до інтерферону- β 1b та інтерлейкіну-10 людини, злитих з бактерійною лужною фосфатазою. Науково-практична конференція з міжнародною участю Інноваційні напрями в генетичній та регенеративній медицині, Київ, 2017 р. *Клітинна та органна трансплантологія.* Т. 5, № 2. С. 246.

SUMMARY

Usenko M.O. Development of genetically engineered conjugates and their use for detection and purification of the therapeutically important proteins. – Qualification scientific work with the manuscript copyright.

Thesis for obtaining the degree of Doctor of Philosophy (PhD) in Biology, specialty 03.00.20 – Biotechnology. – Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2021.

Present Ph.D. thesis highlights the issues of the development of recombinant proteins based on which it is possible to create affinity chromatography media, to obtain monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of target proteins. Antibodies are widely used in modern fundamental and applied biological and medical diagnostic researches. New approaches are being developed to increase the efficiency of antibody production and purification. To obtain monoclonal antibodies one can use affinity sorbents based on proteins A *Staphylococcus aureus* and G *Streptococcus* sp. In the case of obtaining polyclonal antibodies, this approach does not allow to obtain highly specific antibodies that can critically affect the results of enzyme-linked immunosorbent assays. The use of other chromatographic

approaches based on the physicochemical properties of antibodies cannot provide the required degree of purity. In turn, purification of antibodies using an antigen immobilized on the sorbent through a partner protein or affinity tag does not require a chemical modification of the matrix and antigen.

Human interleukin-7 (hIL-7) is a therapeutically important immune cytokine that significantly affects the maturation and homeostasis of T and B lymphocytes. It was selected as the primary target to obtain recombinant proteins in our studies. Numerous studies of IL-7 have shown that its level substantially varies in various diseases, such as viral infections (HIV, cytomegalovirus infection, viral hepatitis C), multiple sclerosis (MS), rheumatoid arthritis, type 1 diabetes, severe combined immunodeficiency syndrome, and others. A valuable prognostic indicator for such diseases is the level of one of the chains of the IL-7R receptor (CD127 and soluble form sCD127) in blood plasma. Monitoring of IL-7 concentration has predictive value for a detailed study of the mechanisms of its influence on the effectiveness of viral and autoimmune disease treatment. Thus, antibodies with high specificity that distinguish between different isoforms of a single protein are necessary for effective diagnosis.

Therefore, the first part of this study concerns the issues of obtaining recombinant fusion proteins rhIL7-His and rhIL-7-CBD. We have developed their producer strains and have demonstrated the production of target proteins in the bacterial inclusion bodies form in *E. coli* cells. Besides, the methods of their production in soluble functionally active form by *in vitro* renaturation were optimized. The rhIL7-CBD fusion protein, after immobilization on microcrystalline cellulose CC31, and rhIL7-His, after immobilization on a metal-affinity sorbent, were used to obtain polyclonal antibodies with specificity for human interleukin 7, with a purity of more than 95 %. The rhIL-7 activity was tested using peripheral blood mononuclear cells (PBMC).

We have also performed a study of the effect of IL-7 on PBMC and have shown that the response to IL-7 differs for PBMC from different donors. The individual response of human PBMC to IL-7 gives valuable information for the immune system

state prediction. This information is necessary for a further large-scale study of the T-cell subgroups' response to IL-7 therapy.

Chemical conjugation for obtaining antibody immunoconjugates with enzymes, fluorescent or affinity labels is costly and inefficient. The actual task is to find methods to reduce the cost of immunoconjugates production. Nowadays, using modern genetic engineering methods, it is possible to create analogs of natural antibodies – recombinant antibodies that can be used as selective immunoreagents. A comprehensive approach has been developed for this purpose, which includes methods of creating and selecting large combinatorial cDNA libraries of V-genes of immunoglobulins *in vitro*. This approach allows obtaining specific immunoreagents against a wide range of antigens. These immunoreagents are produced in the microorganisms, plants, and yeast cells, which significantly reduces their cost. Molecules obtained by fusion of recombinant single-chain fragment variable antibodies (scFv) with enzymes, fluorescent proteins, or affinity tags are promising.

The development of chimeric molecules such as immunological probes significantly reduces the cost of immunological studies compared to the use of commercially available monoclonal antibodies chemically conjugated to an enzyme or fluorophore. It allows us to talk about their potential use in both classical types of immunodiagnostics and in new areas of research of molecular processes *in vivo* and *in vitro*. In this work, a bifunctional scFv(IFN β 1b)–BAP fusion protein was obtained. Such a recombinant analog of monoclonal antibodies as scFv(IFN β 1b) fused with an enzyme protein allows rapid detection of the presence of IFN β -1b and determination of its concentration in ELISA. The resulting plasmid vector *pCANTAB-scFv(IFN β 1b)-BAP* can then be used as a basis for the creation of scFv producers of different specificity conjugated to alkaline phosphatase.

Screening of immunoglobulin variable genes is an important step in working with immune combinatorial cDNA libraries. The specificity of the obtained recombinant single-chain antibodies depends on screening efficiency. Therefore, the use of fusion proteins based on the target antigen and marker molecule provides selective isolation of target proteins and reduces the time of the screening. In the

present research, the gene for bifunctional fusion protein rhIL7-BAPmut, a plasmid vector based on it, and a producer strain of *E. coli* were constructed. RhIL7-BAPmut was obtained, and the method of its purification and renaturation was optimized. The functional activity of both components of the recombinant protein was established and the possibility of its use for screening the combinatorial cDNA library of immunoglobulin variable genes was demonstrated.

One more object of the present investigation is a recombinant ASK1 protein kinase. In the case of autoimmune diseases, such as multiple sclerosis and rheumatoid arthritis, ASK1 protein kinase is currently being actively investigated. ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) activates cell signaling pathways in response to various types of stress. Numerous studies have shown the important role that this enzyme plays in various types of carcinogenesis. Due to participation in the signaling TLR4-ASK1-p38 pathway ASK1 is also a target for the weakening of neuroinflammation in autoimmune diseases. Thus, low molecular weight ASK1 inhibitors may be important compounds for the pharmaceutical industry. Creating a producer strain of a recombinant protein kinase analog allows obtaining a protein for the search for ASK1 inhibitors.

We have developed protocols for the production of *E. coli* producing strain for the human ASK1 protein kinase. As a result, a recombinant analog of ASK1 was obtained in preparative amounts. Its functional activity has been determined depending on synthesis induction conditions.

Key words: recombinant proteins, renaturation, immunosorbents, antibodies, affinity chromatography, human interleukin 7 (rhIL7), single-chain variable fragment (scFv), ASK1.

List of scientific publications published on the topic of the dissertation:

Articles

1. **Usenko M.O.**, Gorbatiuk O.B., Okunev O.V., Irodov D.M., Kovalchuk M.V., Kordium V.A. Obtaining of the recombinant rhIL7-CBD fusion

protein. *Factors in Experimental Evolution of Organisms*. 2020. Vol. 26. P. 282–286. DOI: 10.7124/FEEEO.v26.1280.

2. Kovalchuk M.V., Ruban T.A., **Usenko M.O.**, Kordium V.A. Personalized responsiveness of human PBMCs to the action of IL-7. *Biopolymers and Cell*. 2020. Vol. 36, N 4. P. 304–312. DOI: 10.7124/bc.000A33.

3. **Usenko M.O.**, Okunev O.V., Bentsionova K. I., Gorbatiuk O.B., Irodov D.M., Kordium V.A. Obtaining of the recombinant rhIL7-BAPmut fusion protein and its functional characterization. *Factors in Experimental Evolution of Organisms*. 2019. Vol. 25. P. 321-326. DOI: 10.7124/FEEEO.v25.1185.

4. **Usenko M.O.**, Okunev O.V., Bentsionova K. I., Gorbatiuk O.B., Irodov D.M., Kovalchuk M.V., Kordium V.A. Optimization of the fusion protein rhIL7-BAPmut renaturation process from the *Escherichia coli* inclusion bodies and its practical application. *Visn. ukr. tov. genet. sel.* 2019. Vol. 17, N 1. P. 39-45. DOI: 10.7124/visnyk.utgis.17.1.1199.

5. Volynets G.P., Gorbatiuk O.B, Kukharenko O.P., **Usenko M.O.**, Yarmoluk S.M. Production of recombinant human apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 2016. Vol. 126. P. 89-92. DOI: 10.1016/j.pep.2016.05.016.

Patent

6. Gorbatiuk O.B., **Usenko M.O.**, Irodov D.M., Kordium V.A. Modified genetically engeniored fusion protein scFv(IFN β 1b)-BAP, produced by *E. coli*. Pat.132794 Ukraine, IPC (2019.01) C12N 15/00. 11.03.2019, № 5.

Conference abstracts

7. Gorbatiuk O.B., **Usenko M.O.**, Okunev O.V., Bentsionova K. I., Irodov D.M. Optimization of renatuation method of the IL7-BAPmut fusion protein, its characterization and application. Materials of the XII Ukrainian Biochemical Congress, Ternopil, Ukraine, 2019. *Medical and clinical chemistry*. Vol. 21. № 3 (sup). P. 266.

8. **Usenko M.**, Gorbatiuk O., Okunev O., Kordium V. High-throughput purification method of the recombinant human IL7. 20th International Summer School on Immunology “Immune System: Genes, Receptors and Regulation”, Hvar, Croatia, 2019. Book of abstracts P. 107.
9. **Usenko M.**, Gorbatiuk O., Okunev O., Kordium V. Obtaining and characterization of a singlechain variable fragment alkaline phosphatase fusion proteins and specific polyclonal antibodies for detection of IFNbeta and interleukin10. 43rd FEBS Congress, Prague, Czech Republic, 2018. *FEBS Open Bio*. Vol. 8, N 1. P.186.
10. **Usenko M.O.**, O.B. Gorbatiuk, O.V. Okunev, V.A. Kordium. Obtaining and characterization of the IL-7-CBD fusion protein. Materials of XII annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine, 2018. *Biopolym. Cell*. Vol. 34, N 2. P. 163.
11. **Usenko M.O.**, O.B. Gorbatiuk, O.V. Okunev, V.A. Kordium. Production of IL7-His recombinant protein for purification of polyclonal antibodies. XIth Parnas Conference: Young Scientists Forum «Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine» Kyiv, Ukraine, 2018. *Ukr. Biochem. J.* Vol. 90, Special Issue. P. 70.
12. **Usenko M.O.**, Gorbatiuk O.B., Okunev O.V., Kordium V.A. Production of IL7-fusion recombinant proteins and their application for affinity chromatography resin creation. 15th Horizons in Molecular Biology: International PhD Student Symposium, Göttingen, Germany, 2018. Abs. book. P.124.
13. Gorbatiuk O., Volynets G., **Usenko M.**, Yarmoluk S. Efficient method for the obtaining of Recombinant Human Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) in *Escherichia coli*. 45th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separation and Related Techniques, Prague, Czech Republic, 2017. Abs. book. P. 113.
14. **Usenko M.**, Gorbatiuk O., Filipenkova N., Okunev O., Kordium V. Production and characterization of single-chain variable fragment antibodies against interferon beta-1b and interleukin-10. Materials of XI annual Conference of Young

Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine, 2017. *Biopolym. Cell.* Vol. 33, N 3. P. 236.

15. **Usenko M.**, Gorbatiuk O., Irodov D., Kordium V. Production and characterization of single-chain variable fragment antibodies against interferon beta-1b and interleukin-10 fused with alkaline phosphatase. «Conference Innovative trends in genetic and regenerative medicine», Kyiv, Ukraine, 2017. *Cell and organ transplantology.* Vol. 5, N 2. P. 246.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	18
ВСТУП	20
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	27
1.1. Структура і функції hIL-7 і його рецептора	27
1.2. Сигнальні шляхи IL-7	30
1.3. IL-7/IL-7R при різних захворюваннях	32
1.4. Оцінка чутливості Т-клітин до IL-7	35
1.5. Протизапальна роль інтерферона- β	37
1.6. Кіназа ASK1 – мішень для інгібування	42
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	49
2.1. Матеріали та обладнання	49
2.2. Середовища та буферні розчини	50
2.2.1. Поживні середовища для культивування клітин <i>E. coli</i>	50
2.2.2. Середовища для культивування клітин МНКП	51
2.2.3. Буферні розчини	51
2.3. Генно-інженерні маніпуляції з ДНК	52
2.4. Приготування компетентних клітин	53
2.5. Трансформація клітин плазмідною ДНК	54
2.6. Конструювання цільових плазмідних векторів	54
2.7. Індукція синтезу цільових білків	56
2.8. Лізис бактеріальних клітин	56
2.9. Електрофоретичне розділення білків у ПААГ	57
2.10. Очищення бактерійних тілець включення	57
2.11. Очищення білків rhIL7-His, rhIL7-CBD, rhIL7-VAPmut	57
2.12. Ренатурація білка rhIL7-His	58
2.13. Виділення периферичних клітин крові	59
2.14. Біоаналіз IL-7 та оптимізація аналізу	60
2.15. Побудова графіків та статистичний аналіз	61
2.16. Ренатурація білка rhIL7-CBD	62
2.17. Імунізація тварин rhIL7	62
2.18. Отримання загальної фракції IgG з сироваток імунізованих тварин	63

2.19. Створення афінних сорбентів на основі rhIL7-His, rhIL7-CBD для очищення специфічних	63
2.20. Ренатурація білка rhIL7-VAPmut	64
2.21. Дот-блот аналіз білка rhIL7-VAPmut	65
2.22. Визначення оптимальних умов роботи VAPmut у складі злитого білка rhIL7-VAPmut в ELISA	65
2.23. Скринування бібліотеки кДНК методом реплік колоній	66
2.24. Очищення та індукція білкового сплайсингу протеїна CBD-intein(his)-IL7	66
2.25. Встановлення наявності IL7 з білка CBD-intein(his)-IL7 в супернатанті та його очищення	67
2.26. Отримання рекомбінантного білка ScFv(IFN β 1b)-VAPmut	67
2.27. Перевірка активності рекомбінантного білка ScFv(IFN β 1b)-VAPmut	67
2.28. Очистка білка ASK1	68
2.29. Перевірка активності білка ASK1	68
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	70
3.1. Синтез рекомбінантних білків на основі hIL7 в <i>E. coli</i>	70
3.2. Ренатурація і перевірка активності rhIL7-His	75
3.3. Ренатурація і перевірка активності rhIL7-CBD	80
3.4. Ренатурація і перевірка активності rhIL7-VAPmut	85
3.5. Отримання рекомбінантного білка CBD-intein(his)-IL7	92
3.6. Отримання рекомбінантного білка scFv(IFN β 1b)-VAPmut	96
3.7. Отримання рекомбінантного аналога протеїнкінази ASK1 людини	100
3.8. Персоналізована відповідь мононуклеарних клітин периферичної крові людини (МНПК) на дію IL-7	104
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	109
ВИСНОВКИ	116
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	118

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ASK1 – апоптоз сигнал-регулююча кіназа 1 (apoptosis signal-regulating kinase 1)

BAP – бактерійна лужна фосфатаза (bacterial alkaline phosphatase)

CBD – целюлозо-зв'язувальний домен із целюлозолітичного комплексу *Clostridium thermocellum* (cellulose binding domain)

E. coli – *Escherichia coli*

ELISA – ферментний імуносорбентний аналіз (enzyme-linked immunosorbent assay)

Erk – кіназа, що регулюється позаклітинними сигналами (extracellular signal regulated kinase)

GSSG – окиснена форма глутатіону

GSH – відновлена форма глутатіону

IFN β -1b – інтерферон бета-1b (interferon beta-1b)

IFNAR – рецептор до інтерферону альфа (interferon alpha receptor)

rhIL-7 – рекомбінантний інтерлейкін 7 людини (recombinant human interleukine 7)

JNK – c-Jun аміно-термінальна кіназа (c-Jun N-terminal kinase)

МАРК – протеїнкінази, що активуються мітогенами (mitogen-activated protein kinases)

PI3K – фосфатидил-інозитол-3-кіназа (phosphatidylinositol 3 kinase)

ScFv – одноланцюгові антитіла (single-chain fragment variable antibodies)

STAT – передавач сигналу та активатор транскрипції (signal transducer and activator of transcription proteins)

6His-tag – послідовність (His)₆ афінної мітки білка

БАС – бічний аміотрофічний склероз

ГГХ – гуанідин гідрохлорид

ДСН-ПААГ – поліакриламідний гель з додецилсульфатом натрію

ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота

ІМАХ – іммобілізаційна металафінна хроматографія

ІПТГ – ізопропіл- β -D-тіогалактопіранозид

кДНК – комплементарна ДНК

МНПК – моноклеарні клітини периферійної крові

МОГ – мієліновий олігодендроцитарний глікопротеїн

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

РС – розсіяний склероз

ТФ – транскрипційні фактори

ФБС – сироватка бичача фетальна

ФГА – фітогемаглютинін

ВСТУП

Актуальність теми. Застосування імунологічних підходів у сучасних фундаментальних і прикладних медико-діагностичних дослідженнях передбачають широке використання антитіл проти цільових мішеней. Антитіла використовують як потужний інструмент встановлення характеристик біомолекул у фундаментальних та прикладних дослідженнях. З кожним роком розширюється сфера застосування антитіл, що ставить додаткові вимоги до їхніх характеристик. Зростають вимоги до чистоти білкових препаратів.

Для очищення моноклональних антитіл найчастіше використовують афінні сорбенти на основі білка А *Staphylococcus aureus* та/або білка G *Streptococcus* sp. [1, 2]. Якщо йдеться про поліклональні сироватки, в яких відсоток цільових антитіл коливається, зазвичай, в широких межах, то методом афінної сорбції не можливо виділити високоспецифічні антитіла. Це в подальшому може критично вплинути на результати імуноферментних аналізів. Застосування інших хроматографічних підходів, заснованих на фізико-хімічних властивостях антитіл, не може забезпечити необхідного ступеня чистоти. А отже, необхідно розробляти ефективні методи виділення специфічних антитіл. Таким методом може бути очищення антитіл на антигені, що іммобілізується через послідовність білка-партнера або афінної мітки. Так можна уникнути етапу хімічної модифікації матриці та антигену.

Основним об'єктом наших досліджень було обрано інтерлейкін-7 людини (hIL-7) – терапевтично важливий імунний цитокін, що суттєво впливає на дозрівання та гомеостаз Т- і В-лімфоцитів. Оскільки він тісно вплетений у роботу всієї лімфоїдної системи, то не дивно, що він сам і його рецептори задіяні у патогенезі захворювань різної етіології (онкологічних, вірусних, аутоімунних), пов'язаних з порушеннями регуляції лімфоїдної функції. IL-7 чинить багато різноманітних впливів на імунну та кровотворну системи. На сьогоднішній день ведуться активні дослідження

рекомбінантного ІЛ-7 як засобу для відновлення імунної системи людей, які перенесли трансплантацію кісткового мозку, високоактивну антиретровірусну терапію та хіміотерапію [3]. Біологічні ефекти ІЛ-7 опосередковані через рецепторний комплекс ІЛ-7 (ІЛ-7R). Рівні ІЛ-7 і одного з ланцюгів рецептора ІЛ-7R (CD127 і розчинної форми sCD127) у плазмі крові є важливими прогностичними показниками у ряді захворювань, таких як ВІЛ-інфекція, діабет, розсіяний склероз, тощо. Тому важливим завданням є детекція мембранозв'язаних та розчинних рецепторів ІЛ-7 шляхом застосування злитих білків на основі ІЛ-7 та маркерних молекул.

Для діагностики необхідні високоспецифічні антитіла, що розрізняють різні ізоформи одного білка. До того ж бажаним є зниження собівартості імунокон'югатів антитіл з ферментами, флуоресцентними мітками, афінними мітками тощо, які одержують коштовним і малоефективним способом хімічної кон'югації [4]. Сьогодні з використанням сучасних методів генної інженерії можливо створювати аналоги природних антитіл – рекомбінантні антитіла, які можна використовувати як селективні імунореагенти. Для цього розроблено комплексний підхід, який включає в себе методи створення та селекції великих комбінаторних бібліотек кДНК V-генів імуноглобулінів *in vitro* і дозволяє одержувати специфічні імунореагенти проти широкого спектру антигенів, а також забезпечує їхнє продукування в клітинах мікроорганізмів, рослин і дріжджів, що значно знижує їх собівартість. Перспективними є молекули, одержані злиттям рекомбінантних одноланцюгових антитіл (scFv – single-chain fragment variable antibodies), з ферментами, флуоресцентними білками або афінними мітками [5, 6]. Створення та використання таких химерних молекул як імунологічних зондів значно здешевлює проведення імунологічних досліджень порівняно з використанням комерційно доступних моноклональних антитіл, хімічно кон'югованих з ферментом/флуорофором. Крім того, можливо проводити модифікації послідовностей scFv з метою зниження імуногенності антитіл, підвищення їхньої афінності та стабільності. Все це дозволяє говорити про їх перспективність для застосування як у

класичних типах імунодіагностики, так і в нових напрямках досліджень молекулярних процесів *in vivo* та *in vitro*.

Під час роботи з імуноними комбінаторними бібліотеками кДНК варіабельних генів імуноглобулінів важливим етапом є їх скринінг. Від його ефективності залежить специфічність отриманих рекомбінантних одноланцюгових антитіл scFv. Тому застосування злитих білків на основі цільового антигену та маркерної молекули забезпечує селективне виділення цільових білків та дозволяє скоротити час проведення самого скринінгу [7, 8]. Застосування злитих білків на основі IL-7 та маркерних молекул є перспективним для отримання антитіл, специфічних до IL-7.

Однією з валідованих молекулярних мішеней у канцерогенезі, а також у патогенезі таких аутоімуних хвороб, як розсіяний склероз та ревматоїдний артрит, є протеїнкіназа ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) [9]. Вона активує сигнальні шляхи клітини у відповідь на різні типи стресу. Створення продуцента рекомбінантного аналога протеїнкінази дозволяє отримати білок для проведення пошук низькомолекулярних інгібіторів ASK1.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація виконана в рамках наукових проектів відділу регуляторних механізмів клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України: «Отримання генно-інженерних імунокон'югатів і їх застосування для імуноафінної хроматографії та виявлення цільових антигенів», державна реєстрація № 0115U005022, 2015-2019 рр; «Вивчення біологічних особливостей альтернативних станів МСК желе Вартона пуповини людини», державна реєстрація № 0117U3913, 2018-2022 рр.

Мета і завдання дослідження. Метою даної роботи є створення біфункціональних генно-інженерних кон'югатів на основі цільових білків та маркерних молекул, визначення можливості їх практичного застосування для виявлення та очищення специфічних антитіл, перевірка ефективності отриманих злитих білків для проведення імунологічних досліджень.

Відповідно до мети роботи було поставлено такі завдання:

1. Сконструювати гени біфункціональних білків rhIL7-His, rhIL7-CBD, плазмідні вектори на їх основі та штами-продуценти *E. coli*, оптимізувати методи отримання злитих білків у розчинній функціонально-активній формі ренатурацією *in vitro*.

2. Показати можливість афінного очищення специфічних антитіл із сироваток імунізованих тварин на сорбентах з іммобілізованими rhIL7-His та rhIL7-CBD.

3. Сконструювати ген біфункціонального білка rhIL7-VAPmut, плазмідний вектор на його основі та штам-продуцент *E. coli*, оптимізувати метод отримання злитого білка та проаналізувати можливість застосування rhIL7-VAPmut для скринінгу імунних комбінаторних бібліотек кДНК варіабельних генів імуноглобулінів.

4. Отримати біфункціональний білок scFv(IFN β 1b)-VAPmut та встановити можливість його застосування для виявлення інтерферону бета-1b людини.

5. Розробити схему отримання рекомбінантного аналога протеїнкінази ASK1 людини в біологічно активній формі для подальшого підбору її ефективних низькомолекулярних інгібіторів *in vitro*.

6. Провести дослідження варіабельності індивідуальних реакцій мононуклеарних клітин периферичної крові людини на rhIL7, як важливого прогностичного показника стану імунної системи для подальших імунологічних досліджень.

Об'єкт дослідження даної роботи – рекомбінантні злиті білки, отримані синтезом в *E. coli*.

Предметом дослідження є розробка методів очищення та ренатурації рекомбінантних білків rhIL7-His, rhIL7-CBD, rhIL7-VAPmut, scFv(IFN β 1b)-VAPmut, ASK1 для їх отримання у функціонально-активній формі, їх застосування для створення імуноафінних сорбентів, скринінгу імунних комбінаторних бібліотек та для проведення імунологічних досліджень.

Методи дослідження – мікробіологічні (наращування і культивування бактерій, трансформація бактерій), генно-інженерні (полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), виділення і рестрикційний аналіз плазмідної ДНК, конструювання рекомбінантних ДНК, електрофорез ДНК, секвенування ДНК), молекулярно-біологічні (експресія рекомбінантних білків), імунохімічні (ферментний імуносорбентний аналіз (ELISA), імуноблотинг), біохімічні (виділення і хроматографічне очищення білків, електрофорез білків), біоінформаційні (аналіз послідовностей нуклеотидів та амінокислот, робота з базами даних генів).

Наукова новизна одержаних результатів. Розроблено ефективні методи отримання функціонально-активних рекомбінантних білків rhIL7-His, rhIL7-CBD, rhIL7-VAPmut, scFv(IFN β 1b)-VAPmut та ASK1. Продемонстровано можливість використання rhIL7-His та rhIL7-CBD для створення імуноафінних сорбентів. Із білком rhIL7-CBD вперше створено хроматографічний сорбент за принципом орієнтованої іммобілізації rhIL-7 через CBD на целюлозі. Сорбент на основі rhIL7-His розроблено з використанням Ni-NTA агарози як носія. Розроблені сорбенти застосовано для виділення специфічних до IL-7 антитіл з сироваток імунізованих тварин із чистотою понад 95%. Отриманий вперше злитий білок rhIL7-VAPmut застосовано для скринінгу імунних комбінаторних бібліотек кДНК варіабельних генів імуноглобулінів. Вперше отримано злитий білок scFv(IFN β 1b)-VAPmut, який дозволяє виявляти інтерферон бета людини в діагностичних дослідженнях.

Практичне значення одержаних результатів. Оптимізовано методи отримання препаративної кількості рекомбінантних злитих білків rhIL7-His, rhIL7-CBD, rhIL7-VAPmut в системі синтезу E. coli. Для кожного з зазначених білків оптимізовано метод його ренатурації із бактерійних тілець включення. На основі rhIL7-His та rhIL7-CBD створено хроматографічні сорбенти, які використано для отримання високоспецифічних поліклональних антитіл. Застосування rhIL7-VAPmut забезпечило проведення ефективного скринінгу

імунних комбінаторних бібліотек кДНК варіабельних генів імуноглобулінів для отримання scFv(IL-7) з високими показниками афінності та специфічності. Отримані білки можуть бути перспективними кандидатами для виявлення розчинної форми рецептора sIL7R α , рівень якого потребує моніторингу при багатьох патологічних станах організму. Отримано імунокон'югат scFv(IFN β 1b)–VAPmut і показано його ефективність для швидкого виявлення концентрацій інтерферона бета-1b людини в діагностичних дослідженнях. Розроблено схему отримання рекомбінантного аналога протеїнкінази ASK1 людини в активній формі з метою подальшого пошуку її ефективних інгібіторів. Запропоновані методичні підходи можна запроваджувати у технологію виробництва рекомбінантних білків, подібних за структурою та функціональними особливостями до описаних у роботі.

Особистий внесок здобувача. Всі представлені експерименти було виконано особисто здобувачем або за його безпосередньої участі. Зокрема, автором самостійно одержано та охарактеризовано продуценти рекомбінантних білків rhIL7-His, rhIL7-CBD, rhIL7-VAPmut та scFv(IFN β 1b)–VAPmut. Проведено роботу по очищенню і ренатурації цільових білків методами діалізу, гельфільтрації та розведенням. Очищено поліклональні антитіла на створених на основі білків rhIL7-His, rhIL7-CBD імуносорбентів. Відібрано за допомогою білка rhIL7-VAPmut фрагменти моноклональних антитіл scFv(IL-7). Отримано експресований в *E. coli* білок ASK1 людини.

Роботи, пов'язані із клонуванням генів рекомбінантних білків rhIL7-His, rhIL7-CBD, rhIL7-VAPmut, scFv(IFN β 1b)–VAPmut проведено спільно з к.б.н. О.В. Окунєвим, розрахунок схем конструювання плазмідних векторів проведено з м.н.с. Д.М. Іродовим. Роботи, пов'язані із перевіркою активності IL7-His на МНПК проведено спільно з к.б.н. М.В. Ковальчук та к.б.н. Т.П. Рубан. Дослідження, що стосувалися отримання рекомбінантної протеїнкінази ASK1 людини проведено спільно з к.б.н. Г.П. Волинець. Постановку та вирішення задач, аналіз і обговорення одержаних результатів досліджень

проведено разом із к.б.н. О.Б. Горбатюк та науковим керівником д.б.н., проф., член-кор. НАН України, акад. НАМН України В.А. Кордюмом.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень доповідались на конференціях і з'їздах: XII Український біохімічний конгрес (Тернопіль, Україна, 2019), 20th International Summer School on Immunology “Immune System: Genes, Receptors and Regulation” (Hvar, Croatia, 2019), 43rd FEBS Congress, (Prague, Czech Republic, 2018), XII Відкрита конференція молодих вчених ІМБГ НАН України (Київ, Україна, 2018), XIth Parnas Conference: Young Scientists Forum «Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine» (Kyiv, Ukraine, 2018), 15th Horizons in Molecular Biology: International PhD Student Symposium (Göttingen, Germany, 2018), XI Відкрита конференція молодих вчених ІМБГ НАН України (Київ, Україна, 2017), 45th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separation and Related Techniques, (Prague, Czech Republic, 2017), Науково-практична конференція з міжнародною участю Інноваційні напрями в генетичній та регенеративній медицині (Київ, Україна, 2017), а також на наукових семінарах відділу регуляторних механізмів клітини ІМБГ НАН України.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 15 праць, з яких 5 статей у наукових фахових журналах, 1 патент, тези 9 доповідей у збірниках матеріалів з'їздів та конференцій.

Структура та обсяг роботи. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел, який охоплює 152 найменувань. Дисертацію викладено на 137 сторінках друкованого тексту та проілюстровано 30 рисунками і 6 таблицями.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Структура і функції hIL-7 і його рецептора

Інтерлейкін 7 людини (hIL-7) – є терапевтично важливим цитокином, що залучений у процеси розвитку та дозрівання лімфоцитів, забезпечує їх гомеостаз [10, 11, 12, 13]. Вперше цитокін був ідентифікований Наменом та ін. за його здатністю стимулювати В-лімфопоез [14]. IL-7 разом з IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 та IL-21 належить до родини цитокінів, однією з субодиниць рецептора яких є загальний γ ланцюг (γ c, CD132) [15]. В людини цитокін кодується геном, що розташований на 8q12-q13 хромосомі, білок має масу 17,4 кДа і складається із 177 амінокислотних залишків. Після глікозилювання по трьом сайтам, а саме Asn95, Asn116 та Asn141, маса глікопротеїна досягає 25 кДа. Білок складається з чотирьох α -спіралей, стабілізованих за допомогою дисульфідних зв'язків, які забезпечуються наявністю шістьох залишків Cys (Cys34-Cys129, Cys47-Cys141 і Cys2-Cys92). Гідрофобне ядро IL-7 утворюється спіралями A (складається з амінокислот L16, M17, I20, L23, L24), B (F55, L56, A59, L63, F66), C (L79, V82, T86, L89, T93) та D (L128, L131, L135, I138, W142) [16]. Молекула IL-7 є стабільною в широкому діапазоні значень рН, від 2 до 8, а при додаванні β -меркаптоетанолу втрачає свою біологічну активність внаслідок розриву дисульфідних зв'язків [17]. Ген IL-7 людини містить 6 екзонів та 5 інтронів, його довжина становить 33 тис пар основ. Було описано 6 ізоформ інтерлейкіна, що утворюються внаслідок альтернативного сплайсингу, в яких бракувало 3, 4 або 5 екзонів, та їх подвійних комбінацій [18].

IL-7 контролює розвиток та активацію різних імунних клітин. Експресія цього цитокіну в первинних та вторинних лімфоїдних органах тісно пов'язана з його численними функціями. У кістковому мозку IL-7 впливає на розвиток

В-клітин, визначаючи специфічність певної В-клітинної лінії та регулюючи V(D)J-рекомбінацію генів імуноглобуліну [19]. IL-7 відіграє критичну роль у модуляції функцій Т-клітин *in vivo* [20, 21] У тимусі IL-7 служить ключовим фактором виживання та дозрівання тимоцитів [22]. IL-7 у вторинних лімфоїдних органах забезпечує антиапоптичний та проліферативний вплив на Т-клітини, впливає на В лімфоцити та структурну організацію мікросередовища крайової зони лімфатичних вузлів в селезінці [23]. Інтерлейкін 7 впливає на розвиток дендритних клітин, НК-клітин [24, 25].

Окрім прямого впливу на імунні клітини, IL-7 також впливає на формування вторинних лімфоїдних органів. Наприклад, під час розвитку лімфатичних вузлів IL-7 продукується стромальними мезенхімальними клітинами VCAM1⁺ ICAM1⁺. IL-7 стромальних клітин сприяє виживанню клітин-індукторів лімфоїдної тканини, які ініціюють утворення середовища лімфовузла, залежне від рецептора лімфотоксину- β [26]. Важливість IL-7 у розвитку та дозріванні лімфовузлів ілюструється також відсутністю більшості периферичних вузлів у мишей з дефіцитом рецепторів до IL-7 [27].

В первинному лімфоїдному органі – тимусі – найважливішими клітинами, які відповідають за синтез IL-7 є епітеліальні клітини, що несуть головний комплекс гістосумісності другого класу (MHC II). Додатковими сайтами продукції IL-7 є інтестинальний епітелій, кератиноцити, ембріональна печінка, печінка дорослих, дендритні клітини та фолікулярні дендритні клітини [28]. Функціонування усіх Т-клітин критично залежить від IL-7, самі ж лімфоцити його не продукують [29, 30]. Отже, IL-7 це цитокін тканинного походження, первинними джерелами продукції якого є стромальні та епітеліальні клітини в різних тканинах, а вторинними є дендритні клітини кісткового мозку. Було показано, що IL-7 здатний приєднуватись до позаклітинного матрикс-асоційованого глікозамінглікану – гепарансульфату, а також до фібронектину, що грає важливу роль у локальній тканинній регуляції та IL-7-індукованій сигналізації в мікросередовищі [31]. Крім того, численні дослідження

продемонстрували, що IL-7 може виступати ефективним ад'ювантом, що може модулювати імунні відповіді для виникнення захисного імунітету [32, 33].

Регуляція дії IL-7 залежить від рецепторів IL-7 (IL-7R) на клітинах. Рецептором IL-7 (IL-7R) є гетеродимерний білок, що складається з ланцюгів IL-7R α (CD127) та γ c (IL-2R γ , CD132). γ c є глікопротеїном, з масою близько 64 кДа. Позаклітинний домен складається з 232 а.к., трансмембранний з 29, цитоплазматичний 86 амінокислотних залишків. В ектодомені наявний Trp-Ser-Glu-Trp-Ser мотив. Щодо ланцюга IL-7R α , то він формує L-подібну структуру, має три дисульфідні зв'язки. Його ектодомен з 219 амінокислотних залишків складається у два домени типу фібронектину III. В D2 домені наявна консервативна послідовність Trp-Ser-X-Trp-Ser, притаманна першому класу рецепторів цитокінів. Також наявний трансмембранний домен з 25 та цитоплазматичний хвіст зі 195 амінокислот. Має шість сайтів (Asn29, Asn45, Asn131, Asn162, Asn212, Asn213), глікозилювання яких може впливати на утворення комплексу IL-7/IL-7R α із γ c [34]. IL-7R α також здатен формувати рецепторний комплекс із рецептором тимічного стромального лімфопоетину. Окрім мембранозв'язаної форми білок може також існувати і у розчинній формі (soluble IL7R α) [35]. sIL7R α циркулює в наномолярних концентраціях в плазмі людини, його функції досі погано досліджені [36]. Розчинна форма утворюється внаслідок альтернативного сплайсингу, у ній відсутній 6 екзон [37].

Функціонування IL-7R має деякі особливості. Після активації T-клітин активується цитокіновий рецептор γ c і втрачається експресія α -ланцюга IL-7R на ефекторних клітинах, і відновлюється тоді, коли ефекторні клітини диференціюються у клітини пам'яті [38, 39]. Було показано, що відмінності в біологічних реакціях можуть бути пов'язані не тільки з відносним розподілом імунних клітин, але і з абсолютною кількістю молекул IL-7R на окремих клітинах, яка може варіюватися від 18 тис до 61 тис у мононуклеарних клітин периферичної крові (МНПК) від здорових донорів [40]. Кількість експресованих в клітині рецепторів IL-7 регулюється за рахунок інтерналізації

рецепторів та за допомогою супресорів сигнальних білків цитокінів. Період напівжиття IL-7R α зменшується з 24 годин до приблизно 3 годин після взаємодії з IL-7 [41, 42]. Насамкінець, немає лінійної залежності концентрації IL-7 від кількості продукуючих його клітин, адже він міцно зв'язується з гепарансульфат протеогліканами у позаклітинному матриксі *in vivo* [43]. Разом ці дані дозволяють припустити, що сигнальна вісь IL-7/IL-7R бере участь у багатьох функціях імунної системи та порушення цього шляху викликають порушення імунітету.

1.2. Сигнальні шляхи IL-7

Приєднання IL-7 до IL-7R α та γ c веде до гетеродимеризації цих компонентів та взаємодії внутрішньоклітинних сигнальних молекул Jak1 (Janus kinase 1) та Jak3 (рис.1.1) [44]. Фосфорилування тирозинових залишків внутрішньоплазматичного домену IL-7R α та молекули Jak1 призводить до активації багатьох каскадів, включаючи STAT5a (signal transducer and activator of transcription proteins) та STAT5b, PI3-кіназу (phosphoinositide 3-kinase, PI3K), та Src кінази. Крім того, сигнали IL-7 підсилюють експресію гена Bcl-2, тим самим блокуючи процес апоптозу. Bcl-2 регулює загибель клітин, контролюючи проникність мітохондріальної мембрани, інгібує каспази за рахунок запобігання виходу цитохрому C з мітохондрій та зв'язування активуючого апоптоз фактора APAF1 [45, 46].

Аналіз продуктів експресії гену bcl-2 виявив ціле сімейство bcl-2 білків, що включає як анти-апоптозні (Bcl-2 і Bcl-x1), так і проапоптозні (Bcl-xs, Bax, Bad, Bag) протеїни. Протеїни Bax і Bad формують гетеродимери з Bcl-2 і Bcl-x1 *in vitro*. Для антиапоптичної активності Bcl-2 і Bcl-x1 повинні сформувати димери з протеїном Bax, у той час як димери з протеїном Bad посилюють апоптоз. Це дозволило зробити висновок про те, що молекули родини Bcl-2 є ключовими детермінантами виживання чи загибелі клітин [47].

Передача сигналу IL-7 залучає тирозинкіназні шляхи, що пов'язані з цитоплазматичним доменом рецептора. Сюди входять Jak/STAT шлях, PI3-кіназа та Src родина тирозин-кіназ [48, 49]. Активуючи PI3K-Акт шлях, IL-7 пригнічує інгібітор циклін-залежної кінази p27^{kip1}, відтак посилюючи експресію цикліну D1, що сприяє прогресії клітинного циклу і переходу клітини зі стадії G1 до S-фази [50]. Однією з важливих мішеней серин/треонінової кінази Akt є родина транскрипційних факторів (ТФ) Forkhead box (FoxO). Фосфориллювання Akt білків FoxO створює сайти для зв'язування FoxO з білками 14-3-3, так 14-3-3 контролюють транскрипційну активність FoxO. Akt регулює виживання клітини через Bcl-2 та Bcl-xL, та фосфориллюючи інгібує Bad, що залишається в неактивному стані у цитозолі [51].

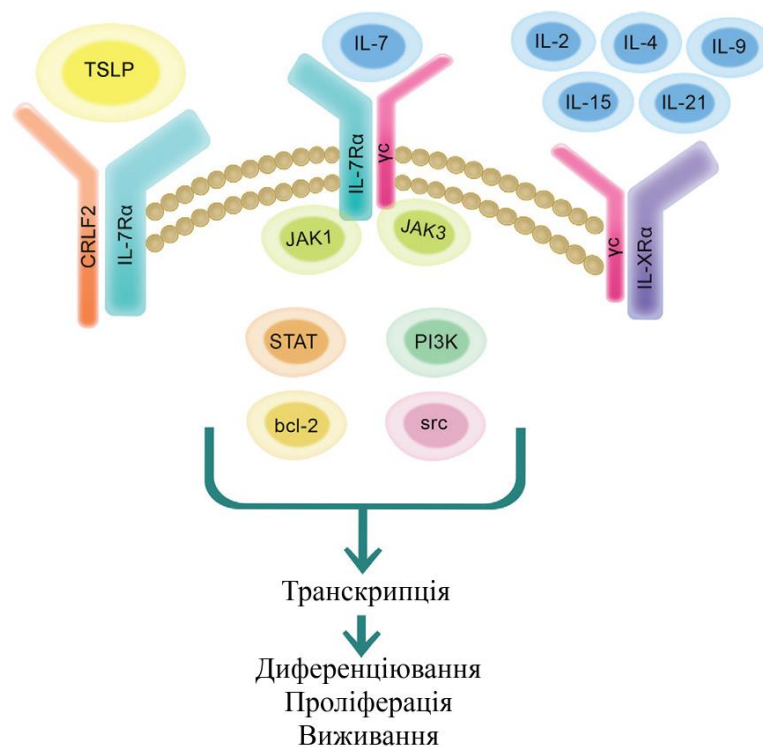


Рис. 1.1. Схема сигнальної трансдукції з IL-7R. Потрійний комплекс IL-7, IL-7Rα та γс запускає сигнальний шлях Jak/STAT. Подальша активація PI3K, Bcl-2 та Src призводить до транскрипції генів. IL-7Rα також здатен формувати рецепторний комплекс із рецептором тимічного стромального лімфопоетину - cytokine receptor-like factor 2 (CRLF2). Адаптовано з [44].

MAPK/Erk (mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase) шлях також залучається при активації IL-7R. У випадку делеції генів кіназ Erk1/2, або при обробці пре-В клітин інгібіторами Erk спостерігали спотворення формування пре-В клітинного рецептора (pre-BCR), при цьому блокувався перехід від про-В клітин до пре-В. Так Erk відіграє роль у їх виживанні і проліферації [52, 53]. Порушення сигнальних шляхів IL-7 запобігає формуванню популяції клітин, що експресують пре-BCR. Активовані білки Erk транслокуються до ядра, де вони фосфорилують різні транскрипційні фактори, включаючи Elk та CREB. В свою чергу ТФ індукують експресію асоційованих з проліферацією Pif2, Mef2c, Mef2d та мус [54]. Вважається, що SH2 адапторний білок ShcA, що є адапторним для Ras активації в лімфоцитах і мієлоїдних клітинах, є важливим медіатором у MAPK/Erk каскаді. ShcA фосфорилується при активації IL-7R у про-В клітинах.

1.3. IL-7/IL-7R при різних захворюваннях

Дослідження IL-7 і IL-7R показали, що їх рівні варіюють у різних захворюваннях, таких, як вірусні інфекції (ВІЛ, цитомегаловірусна інфекція, вірусний гепатит С), розсіяний склероз (РС), ревматоїдний артрит, діабет 1 типу, синдром важкого комбінованого імунодефіциту та інших [55]. Крім того, зниження здатності імунної системи до опору інфекційним хворобам таким, як пневмонія, грип, менінгіт, інфекції сечовивідних шляхів тощо, може бути наслідком її старіння. У похилому віці підвищується схильність до розвитку онкологічних захворювань, аутоімунних, наприклад, ревматоїдного артрити, тиреоїдиту, розсіяного склерозу. Існують дослідження, які відводять IL-7 значну роль у підтримці здоров'я у похилому віці, і визначають IL-7 та пов'язані з ним білки, як біомаркери успішного старіння [44].

IL-7R впливає на розвиток $\gamma\delta$ Т-клітин, що першими з'являються в зонах запального ураження за РС [56]. Дослідження показали, що зміна

співвідношення розчинної і мембрано-зв'язаної форм IL-7R α пов'язується із підвищеним ризиком розвитку РС [57]. Проводяться також дослідження кореляції рівнів інтерферону- β (IFN β), що застосовується як первинна ланка лікування РС, та рівнів IL-7, IL-7R α , нейтралізуючих антитіл [58].

Оскільки ланцюг IL-7R α може існувати в мембранозв'язаній та розчинній ізоформах, то у роботі [59] зроблено припущення, що певні концентрації розчинної ізоформи IL-7R α можуть сприяти прискоренню відновлення CD4⁺ Т-хелперів у хворих на ВІЛ після початку комбінованої антиретровірусної терапії, до складу якої входить IL-7. Докладний механізм, за допомогою якого це відбувається, залишається невідомим.

Комплекс доклінічних випробувань на декількох моделях пухлин довів, що IL-7 може застосовуватись для регресії пухлин. При карциномі молочної залози у мишей введення IL-7 та IL-15 після радіочастотної абляції призводило до виживання без рецидивів, було продемонстровано пригнічення метастатичних вузлів у легенях [60]. Адаптивна імунотерапія, при якій специфічні для пухлини цитотоксичні Т лімфоцити активуються *in vitro* за допомогою бріостатину та іономіцину, та вводяться назад у тіло тварин, дає більший регрес меланоми та карцином молочної залози *in vivo*, якщо клітини культивували з IL-7 та IL-15, а не з одним IL-2 [61, 62]. Внутрішньопухлинна ін'єкція дендритних клітин трансфікованих IL-7 в аденовірусному векторі, призвела до повної регресії пухлини в моделі раку легенів [63]. Також було показано, що цілоклітинна вакцина, що продукує IL-7, викликає ефективну протипухлинну імунну відповідь, опосередковану, імовірно, клітинами NK1.1⁺ для підшкірного раку передміхурової залози [64], тоді як вакцина, що продукує GM-CSF, добре справляється з пухлинною простати [65]. У клінічних випробуваннях, про які повідомлялося в 2006, 2008 і 2010 роках, пацієнтам з такими видами раку, як меланома або саркома, вводили підшкірно різні дози IL-7. Рівні циркуляції як CD4⁺, так і CD8⁺ Т-клітин значно зростали, а кількість Treg зменшувалась. Різноманітність набору рецепторів Т-клітин

(TCR) зросла після терапії ІЛ-7. Але протипухлинна активність ІЛ-7 була недостатньо оцінена [66].

Понад 400 пацієнтів отримували лікування ІЛ-7, з невеликою кількістю токсичних ефектів [44]. У перших випробуваннях із використанням неглікозильованого ІЛ-7 були виявлені антитіла до ІЛ-7, але ця реакція була полегшена за допомогою глікозильованого ІЛ-7 (препарат «Revimmune»). Було показано, що ІЛ-7-Fc («NeoImmune Tec»/«Genexine») добре переноситься та збільшує кількість Т-клітин у здорових пацієнтів [67]. Він проходить випробування у поєднанні з темозоломідом при гліобластомі та атезоліумабом (анти-PD-L1, моноклональні антитіла до ліганду запрограмованої клітинної смерті-1) при меланомі, нейроендокринній карциномі та плоскоклітинному раку шкіри. ІЛ-7-Fc також проходить випробування з пемброліумабом (анти-PD-1) при потрійному негативному раку молочної залози. ІЛ-7-Fc у поєднанні з терапією Т-клітинами з химеризованими антигенними рецепторами (CAR-T) буде застосовано у дослідженні при гострому лімфобластному лейкозі, а в досліді буде поєднуватися ІЛ-7 «Revimmune» з атезоліумабом при уротеліальній карциномі (NCT03513952) [68]. Проходили випробування ІЛ-7 при трансплантації пуповинної крові (RevImmune / MD Anderson NCT03600896) [69].

Проводяться дослідження по застосуванню терапії ІЛ-7 при лімфопенії, що спостерігається у пацієнтів із тяжким перебігом коронавірусної хвороби COVID-19, (NCT04442178, NCT04379076) [70, 71]. Призначення ІЛ-7 були зроблені на основі успішних результатів випробувань терапії для пацієнтів із септичним шоком, у яких спостерігалися схожі лімфопенічні показники [72]. Після імуномодуляції, спрямованої на пригнічення цитокинової відповіді, призначення rhIL-7 вже на 4 добу призводило до збільшення кількості лімфоцитів, при цьому не спостерігалось збільшення концентрації ІЛ-6 чи TNF- α [73, 74].

1.4. Оцінка чутливості Т-клітин до ІЛ-7

В даний час ІЛ-7 широко досліджується як терапевтичний засіб при різних імунних розладах. У зв'язку з цим, необхідними стають біомаркери, що мають відношення до реакцій імунних клітин на ІЛ-7, які можуть застосовуватись для моніторингу імунного статусу, індивідуальних фармакологічних реакцій на лікування ІЛ-7. Кров для аналізу біомаркерів є зразком, що отримується малоінвазивним способом. Тим не менше, цитокіни діють як паракринним так і аутокринним способом, оскільки вони вивільняються та діють локально, поряд з місцем перебігу імунної реакції. Тому в периферичній крові здорової людини їх можна виявити на низькому рівні 2–20 пг [75]. Виникає питання: чи можуть відповіді МНПК на ІЛ-7 бути показником стану імунної системи, фармакологічних реакцій на лікування препаратом ІЛ-7 на клітинному рівні, або показником наявності рецепторів ІЛ-7. Повідомлялося, що функціональна активність рецепторів ІЛ-7 може оцінюватися по здатності екзогенного ІЛ-7 стимулювати життєздатність (виживання + та/або індуковане ІЛ-7 інгібування апоптозу + проліферацію) свіжоізольованих імунних клітин. Такі біоаналізи функціонально оцінюють безпосередню клітинну відповідь на цитокіни. Активація Т-лімфоцитів відбувається в лімфоїдній тканині і спричинює міграцію різних функціональних груп ефektorних Т-клітин у різні ділянки тканини [76]. На жаль, оцінити наявність імунних клітин у лімфоїдних чи ушкоджених тканинах людського організму досить важко. Отже, виникає питання, які саме типи імунних клітин, що циркулюють в організмі, можуть реагувати на екзогенний ІЛ-7 під час біологічного аналізу *in vitro*. Загалом, аналіз підгруп Т клітин крові CD4⁺ та CD8⁺, як основних реагуючих на ІЛ-7, показав, що серед них є наївні клітини, остаточно диференційовані ефektorні Т-клітини пам'яті (Тemra), клітини центральної пам'яті (Тcm), котрі мігрують у лімфоїдну тканину, та клітин ефektorної пам'яті (Тem), які мігрують до нелімфоїдних сайтів [77].

Проте слід зазначити, що кілька підгруп Т-клітин периферичної крові залишаються нечутливими до стимуляції виключно ІЛ-7 протягом усього періоду культивування [78, 79]. З цих причин існує кілька способів вивчити реакцію клітин на ІЛ-7 за допомогою Т-клітин. Деякі системи *in vitro* можуть відтворювати моделі *in vivo*, відтворюючи пов'язану з ІЛ-7 модуляцію гомеостазу периферичних Т-клітин, або імунні процеси у локальних ділянках з високим рівнем ІЛ-7. Для оцінки чутливості Т-клітин до ІЛ-7 переважно використовують два основні типи дослідження. Оскільки збереження гомеостазу та проліферація Т-клітин залежать від сигналів з TCR, а також від активації ІЛ-7 його рецепторів, то в літературі представлений так званий одноетапний аналіз костимуляції з ФГА та ІЛ-7. Клітини людини при цьому стимулюються мітогеном лейкоаглютиніном ФГА-Л для забезпечення проліферативної реакції на ІЛ-7 [78, 80]. З іншого боку, існує схема поетапної стимуляції для оцінки ефекту ІЛ-7. Першим кроком є стимуляція культури ФГА. Лише незначна частина лімфоцитів периферичної крові ділиться спонтанно *in vitro*, а більшість входить в клітинний цикл після стимуляції лектином. Активовані ФГА Т-клітини промивають у середовищі, що не містить цитокінів. Потім клітини повторно культивують у середовищі, що містить rhIL-7.

Такі дослідження можуть бути застосовані як для аналізу відповідей МНПК на інтерлейкін 7, так і для оцінки якості інтерлейкіну 7 за реакцією МНПК на внесений цитокін. Для діагностичного застосування важливим є отримання високоспецифічних антитіл до rhIL-7. Застосування рекомбінантних злитих білків на основі ІЛ-7 та маркерних молекул є перспективним для отримання сорбенту для виділення специфічних до ІЛ-7 антитіл.

1.5. Протизапальна роль інтерферона- β

Інтерферон-бета є цитокіном, що належить до інтерферонів першого типу, секретується фібробластами та деякими епітеліальними клітинами у відповідь на вторгнення вірусів, бактерій. Має імуномодулюючу, протизапальну та противірусну дію. Інтерферон- β може впливати на фактор росту нервової тканини, обмежувати міграцію лейкоцитів через гематоенцефалічний бар'єр, впливаючи на адгезивні молекули. Зменшує вивільнення прозапальних цитокінів IL-12, IL-23, IL-1 β і збільшує продукцію протизапального IL-10 мієлоїдними і плазмоцитоїдними дендритними клітинами, відтак пригнічується дія Т-хелперів 1, 17.

Терапія рекомбінантним інтерфероном наразі є одним з широковикористовуваних шляхів вповільнення розвитку рецидивно-ремітуючої форми розсіяного склерозу [81, 82]. Розсіяний склероз (РС) – це захворювання, яке характеризується імунно-опосередкованим руйнуванням мієлінової оболонки нервових клітин центральної нервової системи (ЦНС). При цьому відбувається активація імунних клітин, збільшується їх кількість в ЦНС. Клінічним проявом подальших демієлінізації та ушкодження нейронів і загибелі олігодендроцитів, спричинених аутоімунними атаками Т і В клітин, є зменшення нервової провідності. У 80% випадків розвиток захворювання починається з рецидивно-ремітуючої форми, для якої характерним є зміна періодів загострення та відновлення. При цьому висока частота загострень не дозволяє повністю відновити функції нейрорегуляції. На теперішній час не вдалося скласти повну і незаперечну картину механізму виникнення та розвитку РС. Бактеріальні і вірусні інфекції, генетична схильність, гормональний статус організму, екологія, кліматичні умови – будь-яка з цих факторів може сприяти виникненню РС. Нестача відомостей про етіологію захворювання призводить до відсутності ефективної терапії.

При лікуванні РС застосовуються рекомбінантні аналоги IFN β – інтерферон β -1a та інтерферон β -1b [83, 84]. Порівняно з IFN β -1a, що

отримується в культурі клітин CHO, IFN β -1b містить амінокислотну заміну Cys17 на Ser, делецію Met1, отримується шляхом синтезу в *E. coli* і не є глікозильованим [85].

Молекулярний механізм дії IFN β при патології та лікуванні РС є складним та багатофакторним, він ще не з'ясований до кінця, але, безумовно, включає імуномодулюючі ефекти, які опосередковуються через взаємодію зі специфічними рецепторами, що знаходяться на поверхні клітин. Це, в свою чергу, індукує експресію генів, які обумовлюють його біологічну активність. Варіації біологічної активності інтерферона є наслідком різниці в процесах передачі сигналу, викликаних зв'язуванням з рецепторами. Біологічні ефекти IFN β ініціюються через його зв'язування з гетеродимерним рецептором на поверхні клітини. Інтерферон- α/β рецептор (IFNAR) має дві субодиниці, IFNAR-1 та IFNAR-2, які складаються з внутрішньоклітинного, трансмембранного та екстрацелюлярного доменів [86]. IFN β запускає сигнальний шлях JAK/STAT. Субодиниці рецептора підлягають ауто- або перехресному фосфорилуванню завдяки своїй внутрішній ферментативній активності. Фосфорилування рецепторної субодиниці та активація JAK1 і тирозинкінази TYK2 шляхом аутофосфорилування здійснюються після зв'язування IFN β з гетеродимерним комплексом IFNAR1–IFNAR2. IFNAR-1 та IFNAR-2 пов'язані з сигнальними молекулами TYK2 та JAK1, відповідно. Коли ліганд зв'язується з рецептором, він запускає кіназну активність і призводить до транс-фосфорилування JAK1 і TYK2. Потім активована JAK1 фосфорилує залишок тирозину в цитоплазматичному домені IFNAR2. Отже, фосфорильовані субодиниці IFNAR та залишки тирозину слугують сайтом взаємодії інших регуляторних факторів, таких як білки STAT [87]. Білки STAT фосфорилуються на одному тирозині білками JAK1 та TYK2. Фосфорильовані STAT2 і STAT1 утворюють комплекс, який переміщується до клітинного ядра. Цей комплекс, асоційований з ДНК-зв'язаним білком IRF9 (interferon regulatory factor 9), в свою чергу, формує транскрипційний комплекс

ISGF3 (interferon stimulated gene factor 3). Насамкінець, комплекс ISGF3 зв'язується із ISRE (IFN-stimulated response element) різних генів (рис. 1.2) [88].

Противірусні, протизапальні та протипухлинні властивості $IFN\beta$ є кінцевими результатами його впливу на численні гени (> 1000), відомі як IFN -стимульовані гени, які включають $IRF-1$, $IRF-2$, $IFN\beta$, $2'$, $5'$ OAS , та MxA , які регулюються комплексом ISGF3 [89]. Для повної транскрипційній активації ISRE комплексом ISGF3 потрібний р38 MAP-кіназний шлях. Крім того, $IFN\beta$ також індукує утворення гомодимера $STAT1-STAT1$, що активує сайт зв'язування GAS (gamma activation sequence), який містить гени $SOCS1$ та $IRF1$, задіюючи для цього комплекс GAF (IFN-gamma-activated factor). Група білкових комплексів STAT індукує інші канонічні шляхи, які мають перехресні зв'язки зі шляхом JAK/STAT (наприклад, PI3K, NF- κ B, MAPK).

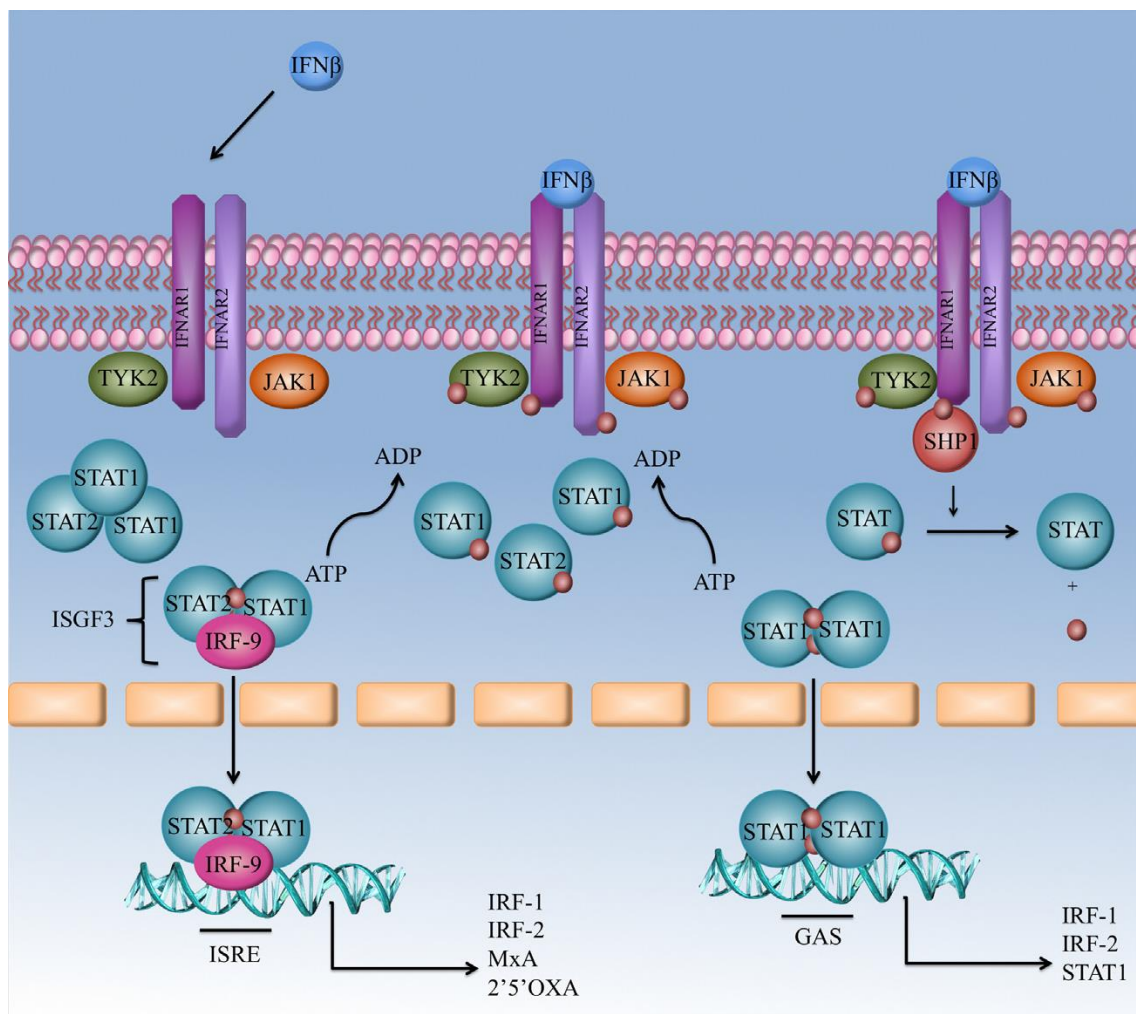


Рис. 1.2. Сигнальний шлях $IFN\beta$. Докладні пояснення наведено в тексті.

Адаптовано з [88].

Системою негативного контролю сигнального шляху JAK/STAT є дефосфорилювання тирозинкінази. Фосфатаза SHP1 зв'язується із субодиницею IFNAR-1 та дефосфорилює білок JAK1 [90, 91].

IFN β також активує кілька інших сигнальних шляхів. У відповідь на IFN β IRS-1 (insulin receptor substrate) та IRS-2 зв'язуються з активованим рецептором, а потім вони фосфорилюються на залишках тирозину, утворюючи більше сайтів зв'язування для PI3-кінази, та активують PI3K/Akt шлях. Vav, фактор обміну для Rac1 ГТФази, фосфорилюється шляхом активації Tyk2, що призводить до активації декількох MAPK, ERK 1 і 2, p38 та JNK. Також було показано, що IFN β активує Rap1 ГТФазу, а також Raf-1/ERK, p38 MAP кіназний каскад та сигнальні шляхи NF- κ B [92]. Дослідження показують, що IFN β також може специфічно зв'язуватись з IFNAR1 незалежно від IFNAR2, що призводить до стимулювання експресії унікального набору генів. Сигнальний шлях, що запускається IFNAR1–IFN β , є критичним при різних запальних станах, при токсичній дії ліпополісахаридів.

Ефективність лікування хворих на РС пов'язують з різними імуномодулюючими ефектами IFN β -1b, такими, як вплив на активацію Т-клітин, що включає зниження рівня експресії МНС II та костимулюючих молекул, зниження регуляції стійкості аутореактивних Т-клітин до апоптозу. Крім того, спостерігається зменшення проникнення Т-лімфоцитів через гематоенцефалічний бар'єр, завдяки зниженню експресії адгезивних молекул, хемокінів та їх рецепторів, а також інгібуванню матриксних металопротеїназ та CD73 протеїнів. Також IFN β відповідає за зміщення балансу активності Т-хелперів в бік Т-хелперів 2, з пригніченням Т-хелперів 1, відтак, зменшується продукція прозапальних цитокінів, протизапальних – збільшується. Дія IFN β на ЦНС полягає в опосередкованому індукуванні диференціації та підтримці проліферації стовбурових клітин нервової системи. Інтерферон β також може впливати на зміни експресії мікроРНК та на регулювання метаболізму вітаміну D [93, 94, 95].

В той же час, від 30% –50% пацієнтів з РС не реагують на IFN- β . Більше того, молекулярні механізми, за допомогою яких IFN- β спричинює протизапальну дію, залишаються не до кінця з'ясованими. У зв'язку з цим у дослідженні [96] було припущено, що IFN- β пригнічує вироблення IL-1 за двома різними механізмами. Перший механізм полягає в тому, що сигналінг IFN- β через STAT1 пригнічує активність білків NLRP1 та NLRP3 інфламасом, тим самим пригнічуючи вироблення залежного від каспази-1 IL-1 β . Другий механізм базується на тому, що сигналінг IFN- β через STAT1 індукує експресію IL-10. Аутокринний IL-10 за допомогою активації фактора транскрипції STAT3 зменшує кількість про-IL-1 α та про-IL-1 β . Дослідження також зазначало, що моноцити пацієнтів з РС, які проходили лікування IFN- β , виробляли істотно знижений рівень IL-1 β , ніж моноцити, отримані від здорових донорів [96]. Незважаючи на те, що ці спостереження можуть забезпечити розуміння дії IFN- β при лікуванні запальних захворювань, не до кінця з'ясованим є зв'язок між ефекторними білками, що опосередковують протизапальну дію IFN- β . Крім того, покращене розуміння як такі ефекторні білки проявляють свою протизапальну дію, може підвищити якість терапевтичного контролю [97].

Одним з факторів, що можуть знижувати ефективність лікування IFN β -1b є наявність високих титрів нейтралізуючих антитіл до IFN β -1b, що було показано в численних дослідженнях [98, 99]. Збільшення концентрації нейтралізуючих антитіл часто розвивається протягом 6–12 місяців після початку терапії IFN β -1b, пік їх концентрації спостерігається впродовж другого року лікування. При продовженні лікування титри знижуються, і багато пацієнтів, 25–50%, повертаються до негативного статусу нейтралізуючих антитіл [100, 101, 102].

Важливою є розробка нових і більш ефективних терапевтичних методик для лікування РС. Наприклад, було запропоновано протокол генної терапії РС із використанням IFN β -секретуючих мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку людини [103]. Дослідження проводяться в рамках створення

підходів індивідуальної персоналізованої медицини, щоб полегшити ведення пацієнтів з РС, та приймати обґрунтовані рішення щодо їх лікування. Однією з важливих цілей персоналізованої медицини є лікування, призначене відповідно до кількісно вимірюваних індивідуальних молекулярних параметрів.

Для терапевтичних та діагностичних досліджень важливим є швидкий моніторинг концентрації IFN β -1b. Такий рекомбінантний аналог моноклональних антитіл, як scFv(IFN β 1b) злитий з ферментним білком дозволяє проводити швидко детекцію наявності IFN β -1b та визначення його концентрації в ELISA.

1.6. Кіназа ASK1 – мішень для інгібування

Протеїнкіназа ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1), ще відома як MAP3K5 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5), входить до родини MAP3K, яка відіграє істотну роль в апоптозі клітин, активується різними типами хімічних і фізичних стресів, такими, як оксидативний, викликаний прозапальними цитокінами, або стресом ендоплазматичного ретикулуму [104, 105]. Серинові/треонінові протеїнкінази каскаду MAPK залучені до такого ланцюга перетворень: MAP3K фосфорилує і тим самим активує MAP2K, а MAP2K, у свою чергу, фосфорилує та активує MAPK. MAPK регулює діяльність молекул-мішеней та індукує широкий спектр фізіологічних та патофізіологічних реакцій [106, 107]. Родина MAP3K залучена у сигнальні шляхи МКК4/МКК7-JNK та МКК3/МКК6-p38 [108]. p38 MAPK (MAPK14, 11, 12, 13/P38 α , β , γ , δ) та c-Jun N-термінальна кіназа (MAPK8, 9, 10/JNK1, 2, 3), після активації внаслідок оксидативного стресу, зміщують рівновагу перебігу процесів у клітині в бік апоптозу. Також вони залучені у процеси гомеостазу і виживання клітини, що робить їх проблемними мішенями для інгібування [109, 110]. Що стане наслідком активності P38 та JNK, виживання клітини чи її загибель, в значній мірі залежать від тривалості активації білків.

Короткочасна активація індукує клітинні механізми репарації, тоді як тривале фосфорилування P38/JNK ініціює процеси, що призводять до апоптозу [111, 112]. Альтернативним терапевтичним підходом є вибір мішені, що знаходиться раніше в ланці регулювання і яка здатна регулювати обидва шляхи P38 та JNK. Відтак, відкрита у 1997 Ichijo та ін. [113] ASK1 є мішенню для запобігання загибелі клітини, зумовленої стресовими чинниками, вона відповідає цим критеріям, адже є висхідною ланкою для P38/JNK. Активація ASK1 контролюється окисно-відновними реакціями білків-партнерів, оксидоредуктазами, що містять сайт зв'язування дитіолової природи, тіоредоксину (TRX), глутаредоксину (GRX) та пероксиредоксину 1 (PRX1) (рис. 1.3) [114]. TRX, GRX та PRX1 мають окисно-відновні активні ділянки, що складаються з двох залишків цистеїну, які діють як молекулярні перемикачі [115]. Коли клітина редокс-нейтральна, TRX, GRX і PRX1 залишаються у відновленому стані, зв'язаними з ASK1, інактивуючи її. TRX і PRX1 зв'язуються в N-кінцевим доменом ASK1, а GRX – з C-кінцевим [116].

Зв'язаний ASK1 є субстратом для убіквітинування та деградації [117]. Клітинний окиснювальний дисбаланс індукує інактивацію TRX, GRX та PRX1 шляхом утворення дисульфідних зв'язків між залишками цистеїну, і комплекс оксидоредуктаз з ASK1 дисоціює. ASK1 активується шляхом аутофосфорилування гомо-олігомеру, ініціюється запуск каскадів сигналів P38 і JNK [118]. Важливо, що ASK1 сприяє тривалій проапоптотичній активації P38 і JNK, не впливаючи на їх короткочасну активність. Отже, інгібування ASK1 не має впливати на гомеостатичну активність P38 та JNK. Ця гіпотеза підтверджується життєздатністю Ask1 нокаутних мишей, які є здоровими та не виявляють відхилень у розвитку [119].

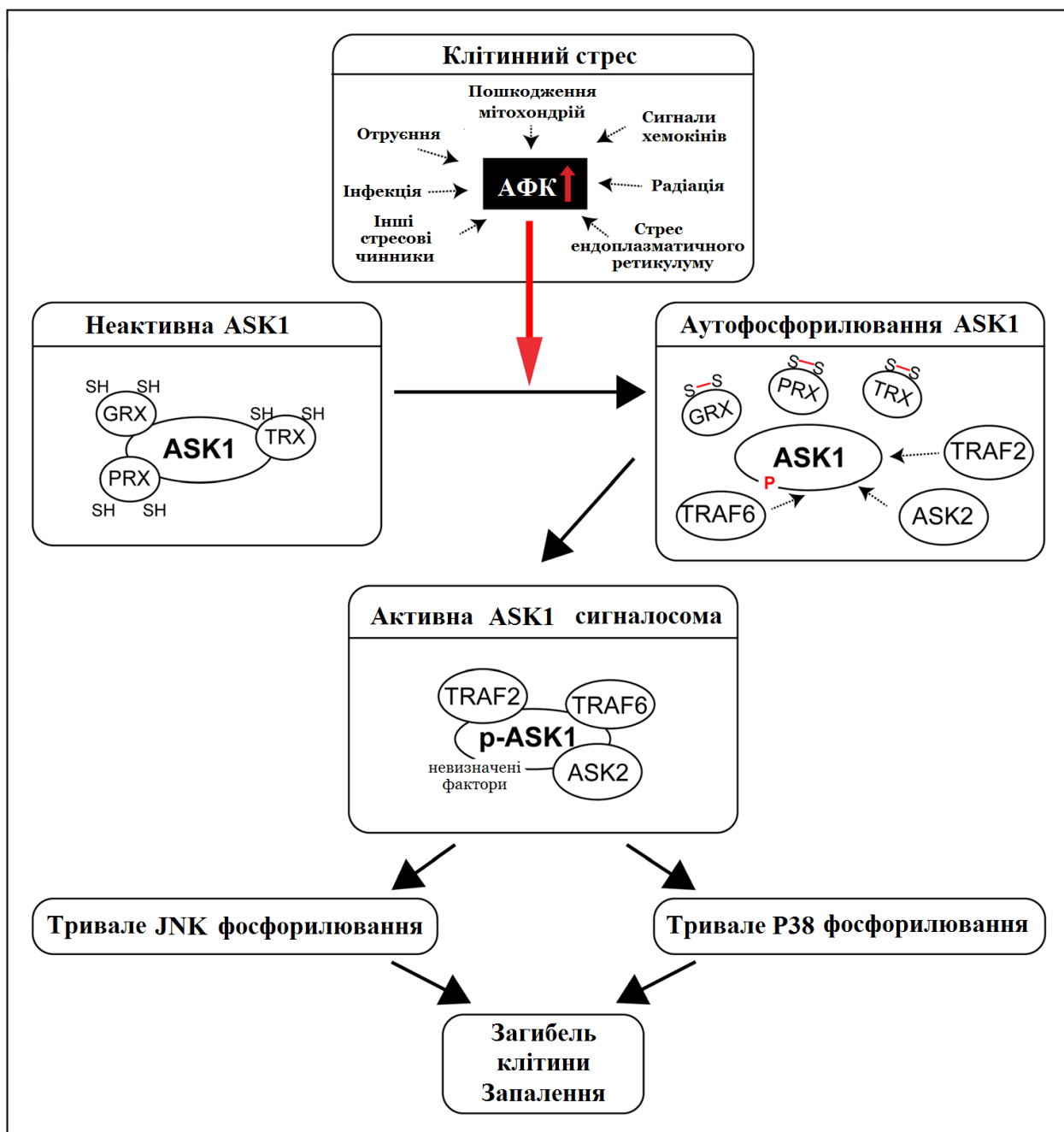


Рис. 1.3. Схема активації протеїнкінази ASK1. Зв'язані з ASK1 дитіол-оксидоредуктази TRX, GRX та PRX інактивують її. Внаслідок клітинного стресу окислювальний дисбаланс призводить до дисоціації комплексу оксидоредуктаз та ASK1. Незв'язаний ASK1 активується шляхом аутофосфорилювання утворюючи великий багатокомпонентний комплекс – сигналоому ASK1. Сигналоома сприяє стійкій активації сигнальних каскадів P38 і JNK, пов'язаних з пошкодженням клітин при запаленнях, загибеллю клітин, фіброзом тканин. Адаптовано з [114].

ASK1 експресується в багатьох тканинах та органах, наприклад, в нирках, печінці, мозку, серці та легенях. Первинна активація кінази, переважно, є відповіддю на окиснювальний стрес. Також на неї активно впливають інші чинники, такі, як надлишкова концентрація іонів кальцію, стрес ендоплазматичного ретикулуму, рецептор-опосередковані сигнали прозапальних цитокінів, наприклад, фактору некрозу пухлин (TNF) [120].

Роль кінази активно досліджують в моделях різних захворювань. Так, низка даних свідчить про участь цього ензиму в канцерогенезі шкіри [121] та розвитку раку шлунку [122, 123]. Були виявлені порушення регуляції ASK1 при запальних та неврологічних захворюваннях [9]. Серед нейродегенеративних розладів поширеною є хвороба Альцгеймера, основними патологічними особливостями якої є накопичення бета-амілоїду та фосфорильованого тау-білка. Бета-амілоїд порушує функцію мітохондрій, що призводить до надмірного вироблення активних форм кисню. Дослідження *in vitro* первинних нейрональних клітин, отриманих від ембріональних мишей, припустило, що цей змінений окисно-відновний стан опосередковує загибель клітин через активацію ASK1-JNK [124]. Порівняння нейрональних культур, отриманих від мишей дикого типу та гомозиготних *Ask1* нокаутованих мишей, показало, що дефіцит ASK1 забезпечує значний захист від індукованої бета-амілоїдами загибелі клітин. Активація ASK1-JNK є основним фактором загибелі клітин нейронів. Також було показано, що 30% клітин з нокаутованим геном все-таки загинули, тобто існують незалежні від ASK1 шляхи загибелі нейрональних клітин. Дослідження *in vivo* з використанням мишей 5XFAD для моделювання хвороби Альцгеймера дозволяють припустити, що активація P38 також опосередковує індуковану бета-амілоїдом нейродегенерацію [125].

Експериментально було показано, що ASK1 відіграє важливу роль у патогенезі аутоімунних хвороб, таких, як розсіяний склероз [126] та ревматоїдний артрит [127]. Для розуміння механізмів розвитку аутоімунних захворювань, зокрема РС, *in vivo* на тваринах було розроблено модель експериментального аутоімунного енцефаломієліту (EAE) [126]. Мишам

робили ін'єкції мієлінового олігодендроцитарного глікопротеїну (МОГ) для індукування опосередкованого Т-клітинами аутоімунного енцефаломієліту. Було виявлено, що дефіцит ASK1 забезпечує захист від деяких проявів, пов'язаних із захворюваннями. Наприклад, у мишей дикого типу, які отримували МОГ, розвивались значні порушення зору, тоді як у нокаутних за *Ask1* мишей, які отримували такі самі дози МОГ, цього не відбувалось. Гістологія зорового нерва показала суттєве зниження рівня інфільтрації запальних клітин та зменшення дегенерації аксонів у зразках з нокаутним геном. Гістопатологія спинного мозку також вказувала на те, що запалення центральної нервової системи та активація глії різко знижувались у *Ask1* нокаутованих мишей, які отримували МОГ. Експерименти *in vitro* з використанням астроцитів та мікроглії, дозволили припустити, що основним механізмом, за яким МОГ впливає на клітини, є індукція сигналізації P38, спричиненої Toll-подібними рецепторами 4 та 9 (TLR4 та TLR9). Шлях TLR-P38 також посилює прозапальну активність TNF α та синтази оксиду азоту, які зумовлюють демієлінізацію нервових клітин. Як TLR4, так і TLR9 пов'язані з виробництвом активних форм кисню, що забезпечує опосередкований ASK1 механізм активації P38. Запропонований механізм демієлінізації шляхом TLR4-ASK1-p38 потребує подальших досліджень *in vivo*. Однак вже є експериментальні докази того, що запалення та демієлінізація зменшуються у *Ask1* нокаутованих мишей, які отримували МОГ, що підтверджує запропонований механізм [128]. Припускається, що знижена дегенерація аксонів та демієлінізація у таких мишей є результатом зменшення опосередкованого P38 запалення. Слід зазначити, що інгібування ASK1 сполукою MSC2032964A досягає подібного зменшення демієлінізації в тієї ж моделі миші, а також блокує активацію шляху ASK1-P38, викликану ліпополісахаридами, у культивованих астроцитах миші. Це є експериментальним доказом того, що інгібування ASK1 може уповільнити прогресування РС.

Дефіцит ASK1 також уповільнює прогресування бічного аміотрофічного склерозу (БАС) у трансгенних мишей SOD1, які мають мутацію Cu/Zn-супероксиддисмутази (SOD1), асоційовану з цим захворюванням. На відміну від РС захворювання на БАС спричиняється дегенерацією рухових нейронів у головному та спинному мозку. Вважається, що етіопатогенези БАС та РС досить різні; однак прогресування обох захворювань характеризується сильною імунною відповіддю, яка може включати активацію мікроглії та астроцитів та імунну відповідь моноцитів або Т-клітин [129]. Агрегована SOD1mut накопичуються в мітохондріях, спричинює утворення активних форм кисню, подальше фосфорилювання ASK1 та загибель нейрональних клітин, опосередковану P38 [130]. Нокаут *Ask1* не змінює вік початку захворювання та не запобігає летальності БАС у моделі миші SOD1, але дефіцит ASK1 уповільнює загибель рухових нейронів, миші SOD1 *Ask1* - / - виживають в середньому на місяць довше, ніж миші *Ask1* + / + SOD1. У дослідженнях із застосуванням інгібіторів ASK1 K811 та K812 було досягнуто пригнічення загибелі рухових нейронів та зменшення активності глії у мишей SOD1, що подовжило їх тривалість життя на три тижні [131]. Якщо інгібування ASK1 здатне досягти подібного зменшення загибелі рухових нейронів у осіб, хворих на БАС, як це спостерігається на моделі миші з БАС, то можна очікувати, що терапевтичний ефект інгібування ASK1 буде значно більшим, ніж у рілузолу або едаравону, які наразі застосовуються для лікування БАС. Однак інгібування ASK1 ще не досліджувалось на тканинах людини, отриманих від осіб хворих на БАС.

Можна очікувати, що результати, отримані в моделях аутоімунного енцефаломієліту та бічного аміотрофічного склерозу, можуть бути екстрапольовані на пацієнтів. Інгібування ASK1 також може запобігати пошкодженню і загибелі клітин при фіброзах, запаленнях нирок, печінки, центральної нервової системи, серця та легень. Захисні ефекти інгібіторів ASK1 спостерігали у різних типах тканин. Інгібування ASK1 має значний

потенціал і може застосовуватись для досягнення довготривалого ефекту покращення стану пацієнтів з відповідними хворобами.

ASK1 виступає привабливою мішенню для фармацевтичного втручання, багато робіт присвячено розробці її інгібіторів. Наразі, ведуться пошуки інгібіторів ASK1, які б мали високу активність, селективність та безпечність. Бажано, щоб молекули інгібітора характеризувались невеликим розміром. Речовина повинна мати високу біодоступність при пероральному прийомі, досягати стабільних концентрацій у плазмі, з тривалим періодом напіввиведення, із широким розповсюдженням у тканинах, включаючи мозок. Є дані деяких клінічних випробувань, які показали, що пацієнти можуть непогано переносити вплив інгібіторів ASK1 [132, 133, 134].

Таким чином, низькомолекулярні інгібітори ASK1 можуть бути важливими сполуками для фармацевтичної індустрії. Актуальним є створення продуцента рекомбінантного аналога протеїнкінази ASK1, для отримання ензиму в препаративній кількості для пошуку різноманітних низькомолекулярних інгібіторів ASK1.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Матеріали та обладнання

У роботі було використано реактиви: акриламід («Sigma», США), бісакриламід («Sigma», США), трис (трис(гідроксиметил)амінометан) («Helicon»), додецилсульфат натрію (SDS – sodium dodecyl sulfatе) («Sigma», США), тетраметилетилендіамін (TEMED – tetramethylethylenediamine) («Fermentas», США), персульфат амонію (PSA – ammonium persulfate) («Sigma», США), ізопропіл-D-тіогалактопіранозид (ІПТГ) («Thermo Scientific», США), лізоцим («Fluka», США), ампіцилін («Arterium», Україна), канаміцин («Київмедпрепарат», Україна), імідазол («Sigma», США), глюкоза («Фармак», Україна), хлорид натрію (NaCl) («Merck», Німеччина), сульфат амонію ((NH₄)₂SO₄) («Sigma», США), сульфат магнію (MgSO₄) («Arterium», Україна), гідрофосфат натрію (Na₂HPO₄) («Merck», Німеччина), 2-меркаптоетанол («Roth», Німеччина), гліцерин («Panreac», Іспанія), лактоза («Sigma», США), агароза («Fluka», США), етилендіамінтетраацетат (EDTA) («GE Healthcare», США), Твін-20 («Sigma», США), знежирене сухе молоко («Bio-Rad», США), 5-бром-4-хлор-3'-індоліфосфат п-толуїдин (BCIP-T) («Fermentas», США), нітро-синій хлорид тетразолію (NBT) («Fermentas», США), пероксидаза хрому («ІМТЕК», Росія), ТМВ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин) («Sigma», США), дитіотреїтол (ДТТ) («Fermentas», США), БСА «Fermentas, Литва», Твін 20 («Bio-Rad», США), rhIFN-a2b (ВНДК «Фарм Біотек», Київ), маркер молекулярних мас PageRuler Plus Prestained Protein Ladder («Thermo Scientific», США), барвник PageBlue Protein Staining Solution («Thermo Scientific», США), дезоксирибонуклеаза («Sigma», США), фенілметилсульфоніл фторид (PMSF) («Sigma», США), інгібітор протеаз

(Complete protease inhibitor EDTA-free, «Roche»), Ficoll-Nyphaque Plus, («GE Healthcare», Швеція), повний ад'ювант Фрейнда (Freund's Adjuvant, Complete, «Sigma»), неповний ад'ювант Фрейнда (Freund's Adjuvant, Incomplete, «Sigma»), EGTA (Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-tetraacetic acid) («Sigma», США), Використовували ензими компанії «Thermo Scientific» (США): ендонуклеази рестрикції, Т4 ДНК-лігаза.

Експерименти проводилися з використанням такого обладнання: сэмплери («Eppendorf», Німеччина), центрифуга («Eppendorf», 5424, Німеччина), прилад для проведення гел-електрофорезу («Hoefler» miniVE, США, «Cleaver» OmniPAGE Electrophoresis Systems, Англія), ультразвуковий дезінтегратор, автоматизована хроматографічна система FPLC (fast protein liquid chromatography) («Pharmacia», Швеція), Ni-NTA-агароза («Qiagen», Німеччина), колонка HisTrap HP («GE Healthcare», США) об'ємом 5 мл, колонка HiPrep (26/10) («GE Healthcare», США) об'ємом 50 мл з сорбентом сефадекс G-25, мікрокристалічна гранульована целюлоза (CC31) («Whatman», Велика Британія), нітроцелюлозна мембрана Hybound-C Extra («GE Healthcare», США), полістиролові планшети для ELISA («Titertek», США та «Nunc», Данія), багатоканальний фотометр Multiscan MCC/340 («Titertek»), прилад для напівсухого переносу білків Semi-dry («Helicon»), фотоколориметр (КФК-2). Ламінарний бокс, CO₂-інкубатор, інвертований мікроскоп.

У роботі використовували клітини *Escherichia coli* штамів BL21(DE3) («Novagen», США), TOP10 («Invitrogen», США), DH10B («Thermo Scientific», США). Було використано моонуклеарні клітини отримані з периферичної крові донорів. Отримано сироватки імунізованих мишей та кроликів.

2.2. Середовища та буферні розчини

2.2.1. Поживні середовища для культивування клітин *E. coli*.

Середовище LB на 1 л: бакто-триптон – 10 г, бакто-дріжджовий екстракт – 5 г, NaCl – 10 г, рН 7,2-7,4.

Середовище LB-KmG (LB, 50 мкг/мл канаміцин, 1 % глюкози).

Середовище 2YT-KG (17 г/л бактотриптон, 10 г/л дріжджового екстракту, 5 г/л NaCl, 50 мг/л канаміцину, 2% глюкози).

Середовище 2YT-K для аутоіндукції (2YT-K, 1/20 від об'єму середовища NPS (0,5 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 М MgSO_4 , 1 М KH_2PO_4 , 1 М Na_2HPO_4), 1/50 від об'єму середовища розчину 5052 (25% гліцерин, 2,5% глюкоза, 10% лактоза), 1мМ MgSO_4).

2.2.2. Середовища для культивування клітин МНКП. Середовище RPMI-1640 («Sigma», США «Biowest», Франція), ембріональна сироватка теляти (FBS) («Sigma», США), середовище для культивування ліній клітин ссавців (DMEM) («Sigma-Aldrich», США).

RPMI 1640, 10% ФБС, 50 мкМ 2-меркаптоетанол та пеніцилін/стрептоміцин.

2.2.3. Буферні розчини. У роботі були використані такі буферні розчини:

- PBS10x: 0,14 М NaCl, 2,7 мМ KCl, 10мМ Na_2HPO_4 , 1,8 мМ KH_2PO_4 (pH 7,4)
- Буферний розчин для приготування проб білків для гель-електрофорезу: 0,3 М тріс-HCl; 25 % гліцерин; 3,5 % додецилсульфат натрію; 0,6 М 2-меркаптоетанол, 0,5 % бромфеноловий синій pH 6,8,
- Електродний буфер (гліцин 72 г/л, тріс 15 г/л, SDS 5 г/л),
- Буферний розчин для електропереносу білків (5,8 г/л тріс, 2,9 г/л гліцин, 0,37 г/л SDS, 0,2 V метанол),
- TES: 0,2 М тріс-HCl, 0,5 мМ ЕДТА, 0,5 М сахароза (pH 8,0)
- Буфер для фосфатази (100 мМ Tris-HCl (pH=9,5), 140 мМ NaCl, 15 мМ MgSO_4)
- Буфер TE (20 мМ Tris-HCl, pH 8.0, 0,2 М NaCl, 0,5 мМ EDTA).

- Буфер А (7 М гуанідин гідрохлорид, 100 мМ трис-НСl (рН 8,0), 200 мМ NaCl)
- Буфер В (6 М гуанідин гідрохлорид, 100 мМ трис-НСl (рН 8,0), 200 мМ NaCl)
- Буфер С (6 М гуанідин гідрохлорид, 100 мМ трис-НСl (рН 8,0), 200 мМ NaCl, 500 мМ імідазол)
- Буфер для перевірки активності ASK1 (25 мМ MOPS рН 7.2, 2,5 мМ EGTA, 2,5 мМ EDTA, 0,5 мМ ДТТ, 0,25 мг/мл BSA, 20 мМ β-гліцерофосфат)

2.3. Генно-інженерні маніпуляції з ДНК

Генно-інженерні маніпуляції з ДНК виконували за стандартними методиками [135] та рекомендаціями виробників відповідних ферментів. Реакції рестрикції проводили ендонуклеазами рестрикції («Thermo Scientific», США) згідно рекомендаціям фірми-виробника. Реакцію лігування здійснювали при 22 °С протягом 2 год за допомогою ДНК-лігази фага Т4 («Thermo Scientific», США).

Електрофоретичне розділення ДНК проводили в 1 % агарозному гелі при напрузі 5 В/см, використовуючи 20 мМ трис-ацетатний електрофорезний буфер (20 мМ Трис, 20 мМ СН₃СООН, 1 мМ ЕДТА, рН 8,3) та гліцериновий буферний розчин для нанесення проб. Візуалізацію ДНК в гелі проводили з використанням етидій броміду (10 мкг/мл).

Виділення ДНК з агарозного гелю проводили набором GeneJET Gel Extraction Kit («Thermo Scientific», США). Плазмідну ДНК з культури клітин виділяли за допомогою GeneJET Plasmid Miniprep Kit («Thermo Scientific», США). Культуру клітин, вирощену на селективному середовищі, осаджували за 4000 об/хв протягом 5 хв. Надосадову рідину видаляли, клітини додатково центрифугували. Суспендували клітини в 250 мкл буферної суміші (50 мМ Трис-НСl (рН 8.0), 10 мМ ЕДТА, 100 мкг/мл РНКаза А). Додавали 250 мкл

лізуючої буферної суміші (1% SDS, 200 мМ NaOH), перемішували, інкубували впродовж 5 хв за кімнатної температури. Додавали 350 мкл нейтралізуючої буферної суміші (3 М К⁺, 5 М Ас⁻, рН 4,5), перемішували, центрифугували протягом 10 хв за 13000 об/хв. Надосадову рідину наносили на колонки і центрифугували протягом 1 хв за 13000 об/хв. Колонки промивали (750 мкл буфера). Елюювали плазмідну ДНК 40 мкл 10 мМ Тріс-НСІ (рН 8.0), інкубувавши буфер на колонках 1 хв і центрифугуючи протягом 1 хв за 13000 об/хв. Плазмідну ДНК зберігали за температури -20 °С.

ПЛР проводили в ампліфікаторі («Терцик», Росія) з використанням набору реагентів Master Mix («Fermentas»).

2.4. Приготування компетентних клітин

Отримували компетентні клітини *E. coli* штамів BL21(DE3), DH10b та TOP10. Нічну культуру штаму, отриману на середовищі LB інокулювали у 50 мл свіжого середовища LB та інкубували при 160 об/хв і +37°C до OD₅₉₀ 0,3 о.од. Культуру охолоджували на льоду протягом 10 хв та центрифугували при 3000 об/хв, 7 хв при +4°C. Осад клітин ресуспендували в 10 мл холодного розчину СаСІ₂ А (60 мМ СаСІ₂, 15 % гліцерин). Культуру центрифугували при 2500 об/хв, 5 хв при +4°C. Осад клітин ресуспендували в 10 мл холодного розчину А і залишали на льоду на 30 хв. Культуру центрифугували при 2500 об/хв, 5 хв при +4°C. Осад клітин ресуспендували в 2 мл холодного розчину А. Отриману суспензію клітин фасували по 100 мкл в мікропробірки та зберігали при -70°C. Після заморожування кількість компетентних клітин в аліквоті оцінювали за стандартною методикою. Отримані клітини використовували для трансформації препаратами плазмідної ДНК або лігазною сумішшю.

2.5. Трансформація клітин плазмідною ДНК

Компетентні клітини *E. coli* розморожували на льодяній бані протягом 5-10 хв та додавали розчин плазмідної ДНК або лігазної суміші. Клітини інкубували на льодяній бані протягом 15-30 хв і переносили до термостату на 2 хв при +42°C. До компетентних клітин додавали 900 мкл середовища LB. Культуру інкубування протягом 1 год при 160 об/хв за +37°C, на чашки Петрі із агаризованим LB та селективним антибіотиком висівали 10 мкл, 100 мкл та весь об'єм суспензії клітин. Чашки інкубували при +37°C протягом 18 годин.

2.6. Конструювання цільових плазмідних векторів

Для отримання ДНК-послідовності, що кодує rhIL7, співробітниками відділу було отримано мРНК з клітин кісткового мозку людини, і синтезовано тотальну кДНК за допомогою реакції зворотної транскрипції. З якої, в результаті реакції ПЛР із застосування специфічних праймерів – sn 5'-CCC GCA GAC CAT GTT CCA TG-3' та asn 5'-GCT TGA AAT CGA CGT AGG AG-3' ампліфікували ДНК-послідовність hIL-7, розміром 591 п.н. Отриманий фрагмент лігували з вектором pJET1.2/blunt. Плазмідним вектором трансформували клітини *E. coli* DH10b. Проведення рестрикції рекомбінантної плазмідної ДНК по сайтам BglII показало наявність вставки розміром 679п.о., що більше ніж 591п.о., оскільки додається полілінкерна ділянка плазміди.

Конструювання pET24-rhIL7-His. ДНК-послідовність hIL-7 клонували у плазмідний вектор pET24 по сайтах рестрикції *NdeI* та *NotI*. Для забезпечення синтезу цільового білка, одержаним плазмідним вектором *pET24-IL7-His* трансформували клітини *E. coli* BL21(DE3).

Конструювання pET24-rhIL7-CBD. ДНК-послідовність hIL-7 клонували у раніше отриманий співробітниками відділу плазмідний вектор *pET24-CBD* [136] по сайтах рестрикції *NdeI* та *NotI*. Для забезпечення синтезу цільового

білка, одержаним плазмідним *pET24-IL7-CBD* трансформували клітини *E. coli* BL21(DE3).

Конструювання pET24-rhIL7-VAPmut. ДНК-послідовність hIL-7, клонували у раніше отриманий співробітниками відділу плазмідний вектор *pET24-VAPmut* по сайтах рестрикції *NdeI* та *NotI* [137]. Одержаним плазмідним вектором *pET24-IL7-VAPmut* трансформували клітини *E. coli* BL21(DE3).

Конструювання pET24-CBD-intein(his)-IL7. Плазміда була створена на основі *pET24-CBD-intein(his)-Hgh*, яка зроблена раніше співробітниками лабораторії [138]. Ген CBD вставлений по сайтах рестрикції *NdeI*, HGH було замінено на ген rhIL7. Отриманим плазмідним вектором *pET24-CBD-intein(his)-IL7* трансформували клітини *E. coli* BL21(DE3).

Конструювання pET24-ScFv(IFN β 1b)-VAPmut. Співробітниками лабораторії було попередньо отримано плазмідні вектори *pCANTAB-scFv(IFN β 1b)* [139], які лінеаризували по сайтах *NotI* та *NheI* і по них вставляли ген VAP з плазміди pJET1.2-VAPmut [140].

Конструювання pET42a-ASK1. Конструкція була надана співробітниками відділу біомедичної хімії С.М. Ярмолюка. Кіназний домен ASK1 людини (649-946 п.о.) ампліфікували з повнорозмірної кДНК (NCBI GenBank номер BC088829.1) з використанням праймерів sn 5'-GATC ACT AGT ATG GTG AAC ACC ATT ACC GAA GAG A-3' та asn 5'-GAGA CTC GAG TGT CTT TTT CTT TTT GCT TGA AAC TTT TA-3'. Сайти рестрикції *SpeI* і *XhoI* підкреслені. Ампліфіковану ДНК-послідовність каталітичного домена лігували з вектором експресії pET42a (Novagen) по сайтах рестрикції *SpeI* і *XhoI*. Отриманою лігазною сумішшю трансформували клітини *E. coli* XL-1. Отриманою рекомбінантною плазмідною з клона XL-1 трансформували клітини *E. coli* Rosetta.

2.7. Індукція синтезу цільових білків

Індукція синтезу білка у клітинах *E. coli* проводилася двома методами, внесенням ізопропіл-D-тіоґалактопіранозидом (ІПТГ) та за протоколом аутоіндукції [141]. Окрему колонію штама-продуцента інокулювали у поживне середовище із канаміцином, нарощували культуру при 37 °С, 160 об/хв, впродовж 14 год. Для індукції ІПТГ 1/50 об'єму нічної культури вносили у поживне середовище із селективним антибіотиком, клітини нарощували до OD₅₉₀ 0,6 о.од. ІПТГ додавали у концентрації 0,1-1 мМ . Індукція тривала 16 год при 37 °С, 160 об/хв.

За протоколом аутоіндукції 1/1000 об'єму нічної культури вносили у поживне середовище 2YТауто із антибіотиком. Індукція тривала 18 год при 37 °С, 160 об/хв. Далі клітини осаджували центрифугуванням при 4000 g, 4 або 30 хв, залежно від об'єму культури, при 4 °С та заморожували при -80 °С.

2.8. Лізис бактеріальних клітин

Клітини ресуспендували в буфері ТЕ, додавали лізоцим у концентрації 1 мг/мл, інкубували 20 хв. Одержаний лізат обробляли ультразвуком із частотою 20 кГц, 3-5 разів по 30 сек, для руйнування хромосомної ДНК, за необхідності додавали ДНКазу.

За наявності білка у розчинній фракції в активній формі, клітини ресуспендували у буфері PBS або 20 мМ Tris-HCl, рН 8.0, 0,15 М NaCl із додаванням 1 мМ PMSF («Sigma Aldrich») та інгібітора протеаз (Complete protease inhibitor EDTA-free, «Roche»). Лізис проводили на льоду, за допомогою ультразвукового дезінтегратора, частота 20 кГц, 3-5 разів по 30 сек.

Отриманий лізат центрифугували 14000g протягом 10 хв, зберігали необхідну фракцію із цільовим білком. Локалізацію рекомбінантного білка визначали розділенням в 12% ДСН-ПААГ.

2.9. Електрофоретичне розділення білків у ПААГ

Електродний буфер заливався у камеру, що містила скельця з поліакриламідним гелем, з двох шарів, концентрувальним 5% (на 2 мл гелю потрібно 1,4 мл H₂O, 0,3 мл акриламід/бісакриламід (30:1), 0,25 мл Тріс (рН 6,8), 20 мкл 10% SDS, 3-4 мкл TEMED, 20 мкл 10% PSA) та розподільним 12% (на 7,5 мл гелю потрібно 2,4 мл H₂O, 3 мл акриламід/бісакриламід (30:1), 1,95 мл Тріс (рН 8,8), 75 мкл 10% SDS, 5 мкл TEMED, 75 мкл 10% PSA). Сила струму у концентруючому гелі 30 мА, в розділяючому гелі – 50 мА. Зразки робили у буфері для приготування білкових проб. Гель фарбували у барвнику PageBlue Protein Staining Solution («Thermo Scientific», США), і відмивали у воді. Оцінку кількості білків проводили методом денситометрії електрофореграм з наступним аналізом їх програмою TotalLab.

2.10. Очищення бактерійних тілець включення

У випадку, коли цільовий білок локалізувався у нерозчинній фракції, кількома послідовними промиваннями буфером TE із 0,3% дезоксихолатом натрію відмивали тільця включення. На кожному етапі промивки розчин обробляли ультразвуковим дезінтегратором 15-20 сек, після центрифугування впродовж 10 хв, 14000 g, супернатант зливали. Остання промивка здійснювалась деіонізованою водою, щоб прибрати залишки дезоксихолату. Тільця включення зберігали при -20 °С.

2.11. Очищення білків rhIL7-His, rhIL7-CBD, rhIL7-VAPmut

Очищення білків проводили методом іммобілізуючої металоафінної хроматографії. Фракцію бактерійних тілець включення солюбілізували протягом 1 години за кімнатної температури в денатуруючому буфері А, який містив 10 мМ 2-меркаптоетанолу, центрифугували, фільтрували через 0,45

мкм мембранний фільтр PVDF («Millipore», США). Колонку HisTrap HP («GE Healthcare», США) приєднували до автоматизованої хроматографічної системи FPLS («Pharmacia», Швеція) та урівнювали, при швидкості потоку буфера 0,5 мл/хв, денатуруючим буфером В. Солубілізовані бактерійні тільця включення (2 мг/мл) наносили на колонку зі швидкістю 0,2 мл/хв. Сорбент відмивали від неспецифічно зв'язаних білків денатуруючим буфером В із 10 мМ імідазолом. Цільовий білок елюювали буфером С, що містив 500 мМ імідазолу.

2.12. Ренатурація rhIL7-His

Ренатурація на металоафінному сорбенті Ni-NTA. Після відмивання IL7-His від неспецифічних білків денатуруючим буфером В із 10 мМ імідазолом, проводили встановлення лінійного градієнта ГГХ в 15 об'ємах колонки HisTrap HP при змішуванні буферів з насосу А, який містив 6 М ГГХ та ренатуруючого буфера з насосу В (буфер X 100 мМ Трис-НСl рН 8.0, 150 мМ NaCl, 100 мМ аргінін, 5 мМ GSH/1 мМ GSSG, 5 мМ MgSO₄) за швидкості потоку через колонку 0,2 мл/хв. Ренатурований білок елюювали з буфером У (100 мМ Трис-НСl рН 8.0, 150 мМ NaCl, який містив 300 мМ імідазолу). Далі проводили заміну буфера для елюції на такий (буфер D, 50 мМ КН₂РО₄, рН 6.0, 0,1 М L-аргінін, 0,1% Твін 20), що не містив імідазол, методом гель-фільтрації на колонці HiPrep із сорбентом сефадекс G-25.

Ренатурація ступінчастим розведенням. До елюату IL7-His (6 М ГГХ, 100 мМ Tris, рН 8.0, 200 мМ NaCl, 500 мМ імідазол) додавали 10 мМ β-ME. До білка при постійному перемішуванні при 4°C додавали буфер Е (20 мМ Tris-НСl, рН 8.0, 50 мМ NaCl) для поетапного зниження концентрації гуанідину з 6 М до 3 М, з 3 М до 2 М. На етапах зниження концентрації з 2 М до 1 М, з 1 М до 0,5 М ГГХ, до розчину з білком додавали аргінін до кінцевої концентрації 100 мМ, GSH до 4 мМ, GSSG до 0,4 мМ.

Ренатурація гельфільтрацією. До елюату IL7-His (6М ГГХ, 100 мМ Tris, рН 8.0, 200 мМ NaCl, 500 мМ імідазол) додавали 10 мМ β -МЕ. Гельфільтраційну колонку HiPrep з сорбентом сефадекс Sephadex G-25 врівноважували буфером D (50 мМ KH_2PO_4 , рН 6.0, 0,1 М L-аргінін, 0,1% Твін 20). До фракції білка після колонки додавали 4 мМ GSH, 0,4 мМ GSSG. Білок фільтрували через 0,22 мкм мембранний фільтр PVDF («Millipore», США). Зберігали при -20°C .

Ренатурація в процесі діалізу. До елюату IL7-His (6М ГГХ, 100 мМ Tris, рН 8.0, 200 мМ NaCl, 500 мМ імідазол) додавали 10 мМ ДТТ. Проводили діаліз IL7-His у концентрації 0.1–0.2 мг/мл проти буфера для ренатурації Z (50 мМ Tris–HCl рН 8.0, 50 мМ NaCl, 100 мМ аргінін, 5 мМ GSH, 0.5 мМ GSSG) ~72 години при 4°C , при зміні буфера кожні 24 години, і проти PBS (~24 год при 4°C), зі співвідношенням 1:50 між зразками білка та резервуаром із діалізним буфером. Ренатурований IL-7 центрифугували (10 хв, 13000 g) щоб прибрати агрегати, наносили на гельфільтраційну колонку HiPrep, врівноважену буфером D (50 мМ KH_2PO_4 , рН 6.0, 0,1 М L-аргінін, 0,1% Твін 20). До фракції знятого білка додавали 4 мМ GSH, 0,4 мМ GSSG. Фільтрували через 0,22 мкм мембранний фільтр PVDF, білок зберігали при -20°C .

2.13. Виділення периферичних клітин крові

Підготовка клітин та їх культивування. У 18 здорових чоловіків, віковий діапазон яких становив 24-50 років, були отримані зразки венозної периферичної крові та оброблені протягом 2 год. МНПК виділяли методом центрифугування в градієнті щільності фікол/гіпак (Ficoll-Nuраque Plus, «GE Healthcare», Швеція) відповідно до інструкції виробника та ресуспендували у повному середовищі (RPMI 1640, доповнене 10% ФБС, 50 мкМ 2- β -меркаптоетанолом та пеніциліном/стрептоміцином). Життєздатність моноклеарних клітин оцінювали за допомогою тесту на виключення барвника трипанового синього, і значення завжди становило понад 95%.

2.14. Біоаналіз ІЛ-7 та оптимізація аналізу

Відповідь МНПК на дію rhIL-7 вимірювали в тесті МТТ на життєздатність клітин, використовуючи активовані мітогеном фітогемаглютиніном (ФГА) лімфоцити периферичної крові людини. Активовані Т-лімфоцити отримували культивуванням МНПК при щільності 1×10^6 /мл протягом 3, 5 та 6 днів із 10 мкг/мл ФГА («Sigma» HA-15) у колбах 25 см², при 37 °С, 5% CO₂ у інкубаторі. Вплив мітогену припиняли на 3, 5 та 6 дні. Активовані ФГА клітини *in vitro* збирали і промивали тричі у RPMI без цитокінів із 2% ФБС. 50 мкл суспензії клітин засівали у трьох повторах у лунки із плоским дном 96-лункової плашки (1×10^5 на лунку). Для оцінки ефектів опосередкованих цитокінами, клітини згодом обробляли різними концентраціями rhIL-7 («PeproTech», США) впродовж 72, 120 та 144 годин. Стоковий розчин ІЛ-7 доводили до концентрації 1 мг/мл PBS з 0,1% BSA. Розчин доводили до потрібної концентрації, використовуючи культуральне середовище. У лунки вносили по 50 мкл кожного розчину у трьох повторах. Кінцевий об'єм у кожній лунці становив 100 мкл, а концентрація ІЛ-7 була 62,5, 125, 250, 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 та 6000 пг/мл. Плашки виймали після інкубації та проводили МТТ аналіз життєздатності клітин [142]. Всі аліквоти rhIL-7, використані в цьому дослідженні, були з однієї партії.

Ренатуровані препарати rhIL-7 перевіряли в аналогічному аналізі. Активовані Т-лімфоцити отримували культивуванням МНПК при щільності 1×10^6 /мл впродовж 5 днів із 10 мкг/мл ФГА у колбах 25 см², при 37 °С, 5% CO₂ у інкубаторі. Вплив мітогену припиняли на 5 день. Активовані ФГА клітини *in vitro* збирали і промивали тричі у RPMI без цитокінів із 2% ФБС. 50 мкл суспензії клітин засівали у трьох повторах у лунки із плоским дном 96-лункової плашки (1×10^5 на лунку). Клітини впродовж 72 годин обробляли різними концентраціями rhIL-7 («PeproTech», США) та rhIL-7 ренатурованими діалізом та гель-фільтрацією. Стоковий розчин ІЛ-7 доводили до концентрації 1 мг/мл PBS з 0,1% BSA, до потрібної концентрації доводили культуральним

середовищем. У лунки вносили по 50 мкл кожного розчину у трьох повторях. Кінцевий об'єм у кожній лунці становив 100 мкл, а концентрація ІЛ-7 була 62,5, 125, 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 та 6000 пг/мл для контрольного препарату, та 125, 500, 2000, 5000, 10000, 20000, 30000, 40000 та 50000 пг/мл для ренатурованих. Плашки виймали після інкубації та проводили МТТ аналіз життєздатності клітин.

2.15. Побудова графіків та статистичний аналіз

Криві залежності реакції виживання клітин від концентрації ІЛ-7 були створені для кожного зразка МНПК із використанням фотометричних результатів для різних вказаних концентрацій цитокінів. Дані були представлені як середнє значення \pm стандартне відхилення (SD). Результати активації, спричиненої цитокіном, виражали як життєздатність клітин. Кількісне визначення життєздатних клітин МНПК проводили за допомогою метаболічного МТТ аналізу і оцінювали порівнюючи значення оптичної щільності клітин при різних концентраціях ІЛ-7 з такими значеннями, прийнятими як 100%, після початку культивування без ІЛ-7 ($OD_x/OD_{contr} \times 100\%$). Максимальний відсоток збільшення життєздатності клітин виражався як $(OD_{max}/OD_{contr}) \times 100\%$. Міжіндивідуальна мінливість виражалася як коефіцієнт варіації

$CV_G(\%) = (SD/\text{середнє значення}) \times 100\%$ із використанням загального середнього значення для кожної змінної. RhIL-7 EC_{50} визначали як ефективну концентрацію цитокіну, що викликає 50% збільшення життєздатності клітин. Дані EC_{50} розраховували за допомогою програмного забезпечення OriginPro 7,5 для побудови сигмоїдальних кривих залежності життєздатності клітин від концентрації ІЛ-7.

2.16. Ренатурація білка rhIL7-CBD

Ренатурація методом діалізу. До елюату rhIL7-CBD (6М ГГХ, 100 мМ Tris, рН 8.0, 200 мМ NaCl, 500 мМ імідазол) додавали 10 мМ 2-меркаптоетанол. Діалізували rhIL7-CBD у концентрації 0.1–0.2 мг/мл проти буфера для ренатурації (50 мМ Tris, 50 мМ NaCl, 100 мМ L-аргінін, 0,5 мМ GSSG, 5 мМ GSH (рН=8.0) ~72 години при 4°C, при зміні буфера кожні 24 години, із співвідношенням 1:50 між зразками білка та резервуаром із діалізним буфером. Ренатурований rhIL7-CBD центрифугували (10 хв, 13000 g) щоб прибрати агрегати. Фільтрували через 0,22 мкм мембранний фільтр PVDF, білок зберігали при -20°C.

Ренатурація методом плавного розведення. До елюату rhIL7-CBD (6М ГГХ, 100 мМ Tris, рН 8.0, 200 мМ NaCl, 500 мМ імідазол) додавали 10 мМ 2-ME. Розведення впродовж 18 год проводили буфером 1 (100 мМ Tris, 2 мМ EDTA, 0,5 М L-аргінін, 0,1 мМ GSSG (рН=8.0) або 2 (100 мМ Tris, 100 мМ NaCl, 5 мМ бета-циклодекстрин, 0,5 М L-аргінін, 0,4 мМ GSSG, 4 мМ GSH (рН=8,0). До встановлення молярності ГГХ 0,5 М. Ренатурований білок концентрували на мікрокристалічній целюлозі.

2.17. Імунізація тварин rhIL7

Для імунізації використовували самок мишей породи BALB/c, віком 2,5 міс (n=10) та самок кролів породи шиншилла, віком 3 місяці (n=3). rhIL7 кількістю 80 мг/мишу вводили під шкіру при першому та другому введенні, та інтерперитоніально при третьому згідно з наступною схемою: перше введення здійснювали з повним ад'ювантом Фрейнда (Freund's Adjuvant, Complete, «Sigma»), друге – з неповним ад'ювантом (Freund's Adjuvant, Incomplete, «Sigma»), третє – без ад'юванту з інтервалом відповідно 14 та 7 діб. Кролів імунізували під лопатки та під шкіру вздовж хребта рекомбінантним білком, що вводили з повним ад'ювантом Фрейнда в кількості 200 мкг/тварину, з

неповним ад'ювантом та без ад'юванта – 100 мкг/тварину з інтервалами 14 діб. По завершенні імунізації кров відбирали та використовували для одержання сироваток та визначення титрів специфічних антитіл. Всі маніпуляції з тваринами здійснювали із використанням седативних та анестезуючих препаратів, згідно з ветеринарним законодавством.

2.18. Отримання загальної фракції IgG з сироваток імунізованих тварин

Отримання загальної фракції IgG з сироваток імунізованих тварин проводили шляхом висолювання насиченим розчином сульфату амонію. До сироватки при перемішуванні за 4°C порційно додавали розчин сульфату амонію (3,9 М, рН=7,9) у співвідношенні 1:1. Осад центрифугували при 10000 g впродовж 20 хв, за 4°C. Осад розчиняли у буфері 20 мМ Tris-HCl, (рН 7,9), 150 мМ NaCl, 0,1 % Triton X-100, 10 % гліцерол з додаванням інгібіторів протеаз. Імуносорбент – мікрокристалічну целюлозу СС31 з іммобілізованим на ній білком SPA-CBD, промивали буфером озведений осад білків сироватки інкубували із імуносорбентом. Супернатант відбирали, сорбент промивали 3 рази. Сорбент вносили в колонку. Зв'язані антитіла елюювали 0,1 М Na-цитратним буфером, рН 3,8. Елюйовані імуноглобуліни діалізували двічі по 4 години проти буфера 25 мМ HEPES-Na, рН 7,9; 150 мМ NaCl, 0,1 % Triton X-100; 10 % гліцерол.

2.19. Створення афінних сорбентів на основі rhIL7-His, rhIL7-CBD для очищення специфічних

Для отримання специфічних до IL 7 поліклональних антитіл з сироваток імунізованих тварин, використовували сорбенти на основі іммобілізованого на целюлозі або металоафінній матриці антигену. Ренатурований методом діалізу rhIL7-His наносили на Ni-NTA сефарозу, rhIL7-CBD наносили на

мікрокристалічну целюлозу СС31. Подальші маніпуляції були однакові для обох сорбентів.

Загальну фракцію імуноглобулінів отримували шляхом очищення на сорбенті з білком А або осадженням 3,9 М сульфатом амонію (рН 7,9). Отриманий осад розчиняли в 5 мл буфера 25 мМ HEPES-Na, рН 7,9; 150 мМ NaCl, 10 мМ імідазол; 0,1 % тритон X-100; 10 % гліцерол) та додавали до 1 мл сорбента Ni-NTA Superflow з іммобілізованим, через послідовність олігогістидину IL 7. Фракцію імуноглобулінів, попередньо очищених на сорбенті з білком А, інкубували з імуносорбентом з іммобілізованим rhIL7-SBV впродовж 18 год, за 4°C. Потім сорбент два рази промивали 10 мл буфера 25 мМ HEPES Na, рН 7,9; 150 мМ NaCl; 0,1 % Triton X 100; 10 % гліцерол). Елюцію антитіл з сорбента проводили буфером 25 мМ PIPES Na, рН 6,8; 150 мМ NaCl, 3,5 М MgCl₂; 0,1 % тритон X 100; 10 % гліцерол. Елюйовані імуноглобуліни діалізували двічі по 4 години проти буфера 25 мМ HEPES-Na, рН 7,9; 150 мМ NaCl, 0,1 % Triton X-100; 10 % гліцерол. Антитіла після діалізу аліквотувати по 0,5 мл та зберігати при - 80 °С.

2.20. Ренатурація білка rhIL7-VAPmut

Після елюції білка проводили заміну буфера елюції на такий, що не містив імідазол методом гель-фільтрації на сорбенті сефадекс G-25. Очищений білок ренатурували плавним розведенням в результаті додання ренатуруючого буфера протягом 12 годин при +4°C та постійному перемішуванні.

Для ренатурації було обрано буферні розчини такого складу:

1) 100 мМ Трис-НСl рН 8.0, 150 мМ NaCl, 500 мМ аргініну, 5 мМ GSH/1 мМ GSSG, 5 мМ MgSO₄;

2) 100 мМ Трис-НСl рН 8.0, 150 мМ NaCl, 5 мМ β-циклодекстрин, 5 мМ GSH/1 мМ GSSG, 5 мМ MgSO₄;

3) 100 мМ Трис-НСl рН 8.0, 150 мМ NaCl, 5 мМ GSH/1 мМ GSSG, 0,1% Triton X-100.

Також була проведена ренатурація rhIL7-VAPmut на металоафінному сорбенті. Після очистки білка на колонці HisTrap HP, проводили встановлення лінійного градієнта ГГХ в 15 об'ємах колонки при змішуванні буферів з насосу А, який містив 6 М ГГХ та ренатуруючого буфера з насосу В (100 мМ Трис-НСІ рН 8,0, 150 мМ NaCl, 100 мМ аргінін, 5 мМ GSH/1 мМ GSSG, 5 мМ MgSO₄) за швидкості потоку через колонку 0,2 мл/хв. Ренатурований білок елюювали з буфером 100 мМ Трис-НСІ рН 8,0, 150 мМ NaCl, який містив 300 мМ імідазолу. Далі проводили заміну буфера для елюції на такий, що не містив імідазол, методом гель-фільтрації на сорбенті сефадекс G-25.

2.21. Дот-блот аналіз rhIL7-VAPmut

На нітроцелюлозну мембрану («Millipore», США) наносили специфічні до IL7 моноклональні антитіла ma124794 («Thermo Scientific», США) миші та поліклональні антитіла кроля у кількості 10 нг. Після блокування сайтів неспецифічного зв'язування буфером PBS, що містив 3% молоко (PBSM), мембрану з іммобілізованими білками інкубували протягом 1 год з ренатурованим rhIL7-VAPmut у концентрації 1 мкг/мл. Як негативний контроль на мембрану наносили рекомбінантний інтерферон $\alpha 2b$ людини (rhIFN $\alpha 2b$). Мембрану проявляли з використанням нерозчинного колориметричного субстрату для фосфатази BCIP-T/NBT («Sigma», США).

2.22. Визначення оптимальних умов роботи VAPmut у складі злитого білка rhIL7-VAPmut в ELISA

Першим шаром вносили антитіла до rhIL7, другим шаром ренатурований білок rhIL7-VAPmut. Для визначення оптимальних умов, що забезпечують високу каталітичну активності VAPmut було протестовано буферні розчини такого складу: 1) 100 мМ Tris-НСІ, 140 мМ NaCl, 15 мМ MgSO₄ (рН=9,5); 2) 50 мМ CAPS, 400 мМ NaCl, 10 мМ MgSO₄ (рН=10,0); 3) 100 мМ Tris-НСІ, 15 мМ

MgSO₄ (pH=9,0); 4) 50 мМ гліцин, 15 мМ MgSO₄ (pH=9,2). Як хромогенний субстрат для бактерійної лужної фосфатази використовували *p*-нітрофенілфосфат (Sigma, США).

2.23. Скринування бібліотеки кДНК методом реплік колоній

Клітини *E. coli* штаму TG1, інфіковані фагами після афінної селекції висівали на агаризоване середовище 2YT, що містило ампіцилін та глюкозу, інкубували протягом ночі при +30°C. Після цього, для отримання реплік колоній *E. coli*, на чашку наносили нітроцелюлозну мембрану («Millipore», США) та інкубували 10-12 годин. Мембрану з репліками колоній відмивали 6-8 разів фосфатним буфером (PBS). Після блокування місць неспецифічного зв'язування буфером PBS, що містив 3% молока (PBSM), наносили rhIL7-*VARmut* у концентрації 10 мкг/мл та інкубували протягом 1 год. Мембрану промивали 3-4 рази PBS та буферним розчином, що містив 140 мМ NaCl, 100 мМ Tris/HCl, 15 мМ MgSO₄ (pH=9,5). Для візуалізації імунних комплексів застосовували субстрат для лужної фосфатази NBT/BCIP-T (Sigma, США).

2.24. Очищення та індукція білкового сплайсингу протеїна CBD-intein(his)-IL7

Очищені бактерійні тільця включення солубілізували у денатуруючому буфері А, після 1,5 год солубілізації білок розводили в 2 рази буфером № 50мМ Трис-НСl (pH 8,0), 0,2 М NaCl і додавали до мікрокристалічної целюлози СС31. Сорбент зі зв'язаним білком відмивали буфером №. Додавали або 50 мМ ДТТ або 50 мМ 2-меркаптоетанолу. Інкубували сорбент 1 добу за температур 4, 20 та 37°C. В наступних дослідах інкубацію після промивок буфером № проводили з 50 мМ ДТТ за температури 4°C, впродовж 1, 2 та трьох діб.

2.25. Встановлення наявності IL7 з білка CBD-intein(his)-IL7 в супернатанті та його очищення

Для детекції rhIL7 в супернатанті після індукції відщеплення інтеїну ДТТ чи 2-ME проводили дот-блот аналіз. На нітроцелюлозну мембрану наносили супернатант від інкубованого за різних температур сорбенту з CBD-intein(his)-IL7. Після блокування місць неспецифічного зв'язування буфером PBSSM, мембрану з іммобілізованими білками інкубували протягом години з поліклональними мишиними антитілами до IL7. Промивали та інкубували з антитілами проти мишиних, злитими з фосфатазою. Виявлення імунних комплексів проводили колориметричним субстратом для фосфатази BCIP-T/NBT.

Супернатант після сорбента пропускали через Ni-NTA сефарозу, так на сорбенті вилучали інтеїн. rhIL7 збирався як фракція проскоку.

2.26. Отримання рекомбінантного білка scFv(IFN β 1b)-VAPmut

У середовище LBAmr додавали 1/100 нічної культури *E. coli* BL21(DE3) *pCANTAB-scFv(IFN β 1b)-VAPmut*, клітини культивували при 37°C до OD 0,6. Додавали IPTG до 0,1 mM, культивували за 28°C. Осад клітин *E. coli* суспендували при 4°C в буфері TES, додавали 1/5 TES, струшували для індукування м'якого осмотичного шоку. Суспензію інкубували 30 хв на льоду, фракцію периплазми відділяли від клітин центрифугуванням при 15000 g протягом 10хв. Одержаний супернатант відбирали та зберігали при -20 °C.

2.27. Перевірка активності рекомбінантного білка scFv(IFN β 1b)-VAPmut

Периплазматичну фракцію перевіряли в дот-блот аналізі. Нітроцелюлозну мембрану з нанесеним білком інкубували в буфері для

фосфатази (100 мМ Tris-HCl, 140 мМ NaCl, 15 мМ MgSO₄ (pH=9,5), проявку активності фосфатази зроблено колориметричним субстратом для фосфатази BCIP-T/NBT.

В ELISA першим шаром вносили rIFN β -1b, контроль – rIFN α -2b та rIL7-Nis. Після інкубування 1 год при 37°C і промивки буфером PBS, який містив 0,1 % твіну 20, до лунок вносили розведені в 4 рази периплазми, витримували 1 год при 37°C. Промивали PBST. Проявку робили розчином 4-нітрофенілфосфату 10 мг/мл в буфері для фосфатази та інкубували протягом 20-30 хв.

2.28. Очистка білка ASK1

Після індукції синтезу цільового білка ППТГ осаджені центрифугуванням клітини лізували, супернатант після центрифугування пропускали через мембранний фільтр 0,45 мм. Колонку з 10 мл Ni-NTA агарози урівноважували буфером № 50 мМ трис-HCl, pH 7,5, 20 мМ імідазол, 300 мМ NaCl. Лізат наносили на колонку при швидкості потоку 0.2 мл/хв, промивали буфером урівноваження. Очищений білок елюювали буфером № із додаванням 300 мМ імідазолу. Колонку HiPrep 26/10 із сорбентом G-25 застосовували для заміни буфера на такий, що не містив імідазол: 50 мМ Tris-HCl pH 7.5, 300 мМ NaCl, 0.05 мМ EDTA, 0.2 мМ PMSF, 5 мМ DTT, 25 % гліцерол. Очищений ASK1 зберігали при -70°C.

2.29. Перевірка активності ASK1

Ензиматичну активність рекомбінантної протеїнкінази ASK1 визначали за допомогою люциферазного методу – Kinase-Glo® Plus Luminescent Kinase Assay. Цей метод є непрямим методом детекції протеїнкіназної активності, що ґрунтується на кількісному визначенні АТФ, що залишається в розчині після кіназної реакції. Реакційна суміш містила 6 мкл буферного розчину (25 мМ

MOPS pH 7.2, 2,5 mM EGTA, 2,5 mM EDTA, 0,5 mM ДТТ, 0,25 мг/мл BSA, 20 mM β -гліцерофосфат), 5 мкл MBP субстратного розчину для кінази (5,0 мкг/мкл), 7,25 мкл деіонізованої води та розчин з ферментом, концентрацією від 0 до 1400 нг. 20 мкл реакційної суміші додавали в лунки мікропланшету за умов кімнатної температури. Додаванням у кожну лунку 10 мкл 3x АТФ розчину (300 мкМ АТФ, 30 mM $MgCl_2$, 15 mM MOPS pH 7.2) розпочинали реакцію. Мікропланшет інкубували 120 хв при 31 °С. Зупиняли реакцію додаванням 30 мкл люциферазного міксу (Kinase-Glo®Plus Luminescent Kinase Assay, Promega) до кожної лунки. Люцифераза пригнічує активність кінази і розпочинає люциферазну реакцію. За протоколом виробника «Dual Luciferase assay protocol» люмінесценцію вимірювали на рідері за температури 21 °С.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Синтез рекомбінантних білків на основі hIL7 в *E. coli*

Для створення систем експресії злитих білків на основі rhIL7 з афінними та ферментними мітками, а саме rhIL7-His, rhIL7-CBD та rhIL7-ВАРmut, використовували плазмідний вектор *pET-24a(+)*. Даний плазмідний вектор дозволяє ввести послідовність олігогістидину на С-кінець ДНК-послідовності цільового білка. Задіяний у формуванні специфічних сайтів зв'язування N-кінець залишається вільним. В свою чергу His-tag, при застосуванні іммобілізуючої металоафінної хроматографії, забезпечує специфічне виділення та можливість подальшої ренатурації на сорбенті синтезованої молекули, а також запобігає «підтіканню» білка у випадку створення імуного сорбенту.

Для отримання вектора *pET24-IL7-CBD* використовували ДНК-послідовність целюлозовз'язувального домену (CBD) із целюлозолітичного комплексу *Clostridium thermocellum*. Цей домен здатний до селективного зв'язування з целюлозою в умовах, коли інші білки денатуровані і функціонально неактивні (наприклад, у 6 М розчині сечовини). Домен дозволяє іммобілізувати білок на поверхні целюлозного матриксу, при цьому активні сайти білка-партнера залишаються у вільному доступі.

Для отримання вектора *pET24-IL7-ВАРmut* було введено ДНК-послідовність бактерійної лужної фосфатази (ВАРmut). Вона є периплазматичним металопротеїном, гомодимером, в кожному мономері якого міститься два дисульфідні зв'язки. Їх формування необхідне для правильної укладки і активації фермента. ВАРmut, застосована для проведення дослідження, має підвищену ферментативну активність порівняно з бактерійною лужною фосфатазою *E. coli* [137]. У роботі авторів Muller В.Н.

та ін. [143] було з'ясовано, що за рахунок двох амінокислотних замін D153G і D330N (заміна аспарагінової кислоти на аспарагін і гліцин у 153 та 330 положеннях відповідно) досягається збільшення каталітичної активності у 17–40 разів без втрати термостабільності ферменту.

Для високоефективної експресії плазмідними векторами трансформували штам-реципієнт *E. coli* BL21(DE3). Клітини цього штаму мають ген РНК-полімерази фага Т7, який інтегровано у бактеріальну хромосому в складі вектора лямбда D69. Він експресується під транскрипційним контролем промотора лактозного оперона після індукування ПТГ або лактозою (за протоколом аутоіндукції). Синтез цільового білка, індукований лактозою, починається після використання культурою глюкози, так протокол аутоіндукції забезпечує ріст культури до високої щільності. Цьому ж сприяють бактотриптон і дріжджовий екстракт у складі 2YT середовища. Також протокол аутоіндукції передбачає використання неорганічних солей, гліцеролу. Така система експресії не вимагає великих об'ємів дорогих культуральних середовищ, а пролонгований час культивування (до 24 годин) дозволяє отримувати максимальні виходи рекомбінантного білка.

Індукування синтезу рекомбінантних білків проводили двома методами – за протоколом аутоіндукції та додаванням ПТГ, при +30 °С та +37 °С. Електрофоретичний аналіз лізатів бактеріальних клітин показав наявність у них продуктів очікуваної молекулярної маси.

Для *E. coli* BL21(DE3) *pET24-IL7-His* молекулярна маса білка rhIL7-His становила 18,7 кДа (рис.3.1). За обох температур білок синтезувався в умовах, створених за протоколом аутоіндукції. Максимальні рівні виходу становили 15-20% від вмісту сумарних білків клітин *E. coli*. Вихід цільового білка досягав 0,8 мг/мл вихідної культури *E. coli*. Аналіз білків клітинних фракцій після індукції експресії показав, що білок rhIL-7 накопичувався в нерозчинній фракції бактеріальної цитоплазми – тільцях включення.

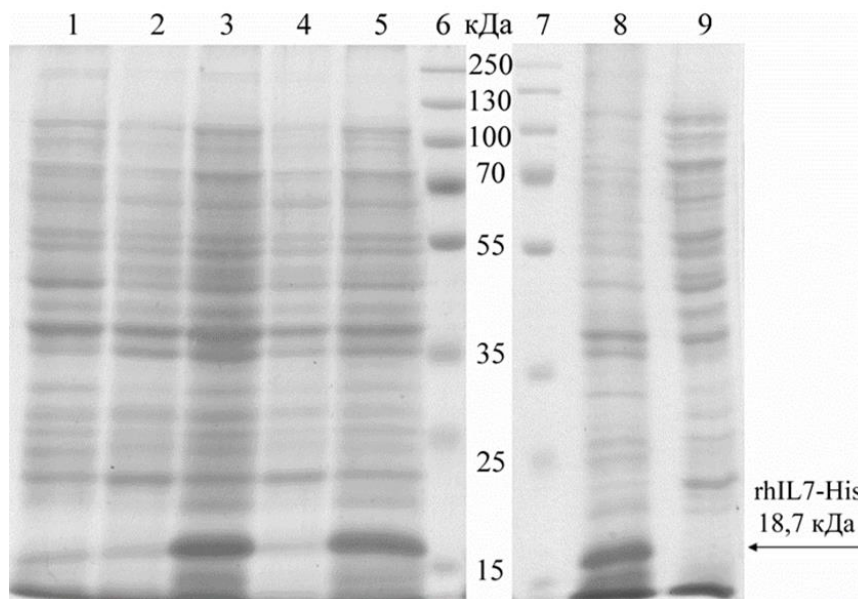


Рис. 3.1. Електрофореграма білків *E. coli*, отриманих в результаті індукування синтезу rhIL7-His: 1 – клітини без індукції; 2, 4 – індукція ІПТГ при 30°C і 37°C, відповідно; 3, 5 – аутоіндукція при 30°C і 37°C, відповідно; 6, 7 – білки-маркери молекулярної маси («Thermo Scientific», США); 8 – фракція нерозчинних білків клітин, 9 – фракція розчинних білків клітин

Отриманий в *E. coli* BL21(DE3) *pET24-IL7-CBD* білок rhIL7-CBD мав молекулярну масу 38,2 кДа. Електрофоретичний аналіз лізатів бактеріальних клітин показав наявність у них продукту очікуваної молекулярної маси при застосуванні протоколу аутоіндукції. В свою чергу, в результаті додавання ІПТГ синтез цільового білка не спостерігався. Максимальний рівень накопичення цільового білка (30% від вмісту сумарних білків клітин *E. coli*) спостерігався у випадку аутоіндукції при +37°C. Вихід цільового білка досягав 0,2 мг/мл вихідної культури *E. coli*. В результаті електрофоретичного розділення розчинної і нерозчинної фракції білків *E. coli* встановлено, що цільовий білок накопичувався у вигляді бактерійних тілець включення (рис.3.2).

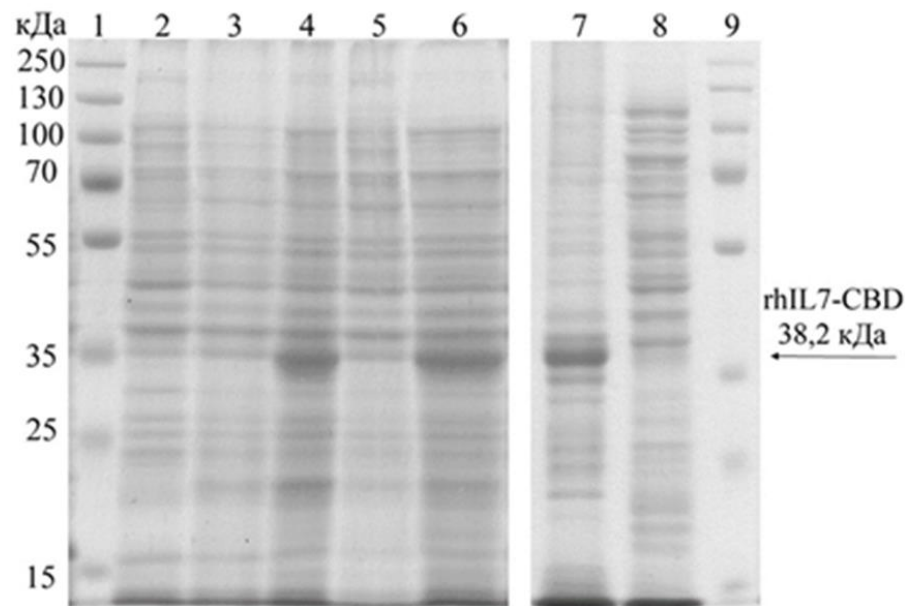


Рис. 3.2. Електрофореграма білків *E. coli*, отриманих в результаті індукування синтезу rhIL7-CBD: 1, 9 – білки-маркери молекулярної маси («Thermo Scientific», США); 2 – клітини без індукції; 3, 5 – індукція ІПТГ при 30 °С і 37 °С, відповідно; 4, 6 – аутоіндукція при 30°С і 37°С, відповідно; 7 – фракція нерозчинних білків клітин, 8 – фракція розчинних білків клітин

Для *E. coli* BL21(DE3) *pET24-IL7-VAPmut* маса білка rhIL7-VAPmut становила 66,2 кДа. Електрофоретичний аналіз лізатів бактеріальних клітин показав наявність у них продукту очікуваної молекулярної маси. Білок можна було виявити за умов індукції ІПТГ при +37 °С, при цьому його концентрація була нижчою ніж у випадку аутоіндукції при тій самій температурі. У випадку аутоіндукції при +37 °С максимальний рівень накопичення цільового білка становив близько 30% від вмісту сумарних білків клітин *E. coli*. Вихід цільового білка досягав 0,4 мг/мл вихідної культури *E. coli*. В результаті електрофоретичного розділення розчинної і нерозчинної фракції білків *E. coli* встановлено, що цільовий білок накопичувався у вигляді бактерійних тілець включення (рис. 3.3).

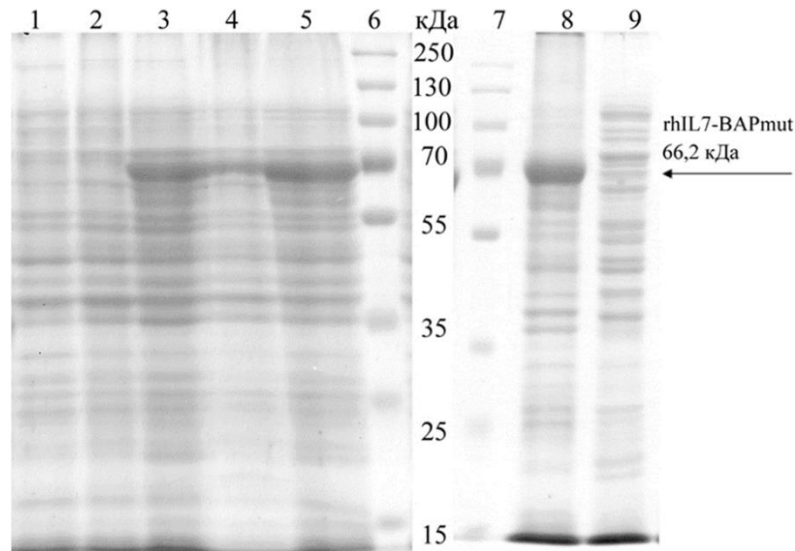


Рис.3.3. Електрофореграма фракції білків *E. coli*, отриманих в результаті індукування синтезу rhIL7-BAPmut: 1 – клітини без індукції; 2, 4 – індукція ПТГ при 30°C і 37°C, відповідно; 3, 5 – аутоіндукція при 30°C і 37°C, відповідно; 6, 7 – білки-маркери молекулярної маси («Thermo Scientific», США), 8 – нерозчинна фракція білків клітин, 9 – розчинна фракція білків клітин

Результати досліджень, представлені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:

1. **Усенко М.О.**, Окунєв О.В., Бенціонова К.І., Горбатюк О.Б., Іродов Д.М., Кордюм В.А. Отримання рекомбінантного злитого білка rhIL7-BAPmut та його функціональна характеристика. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2019. Т. 25. С. 321-326. DOI: 10.7124/FEEO.v25.1185.
2. **Усенко М.О.**, Горбатюк О.Б., Окунєв О.В., Іродов Д.М., Ковальчук М.В., Кордюм В.А. Отримання рекомбінантного злитого білка rhIL7-CBD. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2020. Т. 26. С. 282–286. DOI: 10.7124/FEEO.v26.1280.
3. **Usenko M.O.**, Gorbatiuk O.B., Okunev O.V., Kordium V.A. Obtaining and characterization of the IL-7-CBD fusion protein. Materials of XII annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Kyiv, 2018. *Biopolym. Cell*. Vol. 34, N 2. P. 163.

4. **Usenko M.O.**, Gorbatiuk O.B., Okunev O.V., Kordium V.A.. Production of IL7-His recombinant protein for purification of polyclonal antibodies. XIth Parnas Conference: Young Scientists Forum «Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine» Kyiv, Ukraine, 2018. *Ukr. Biochem. J.* Vol. 90, Special Issue. P. 70.

5. **Usenko M.O.**, Gorbatiuk O.B., Okunev O.V., Kordium V.A.. Production of IL7-fusion recombinant proteins and their application for affinity chromatography resin creation. 15th Horizons in Molecular Biology: International PhD Student Symposium, Göttingen, Germany, 2018. Abs. book. P.124.

3.2. Ренатурація і перевірка активності rhIL7-His

Щоб отримати очищену фракцію rhIL7-His, було проведено виділення тілець включення. Денситометрія електрофореграм після розділення білків лізатів *E. coli* за допомогою програми TotalLab 2.0 показала, що вміст цільового білка в тільцях включення досягав 38% від вмісту сумарних білків клітин *E. coli*. Отримані тільця включення містили в середньому 0,62 мг/мл rhIL7-His в перерахунку на вихідну культуру *E. coli* (рис.1). Подальша робота була сконцентрована на очищенні та ренатурації rhIL7-His *in vitro*. Солюбілізацію тілець включення проводили в буферному розчині, що містив 7 М ГГХ та 10 мМ 2-меркаптоетанол, центрифугували та відбирали супернатант для подальшої очистки та ренатурації. rhIL7-His містить С-кінцевий залишок олігогістидину, тому його очищення проводили методом металоафінної хроматографії. Очищений білок ренатурували чотирма методами (таблиця 3.1).

Аналіз зв'язування ренатурованого за чотирма методиками rhIL7-His з антитілами до IL-7 в ELISA показав, що найвища ефективність ренатурації спостерігалась у методі діалізу (рис.3.4).

Таблиця 3.1.

Варіанти ренатурації rhIL7-His

№ досліджу	Метод ренатурації	Склад буфера для ренатурації
1	Ступінчасте розведення	<p>До IL7-His, елюйованого з колонки HisTrap HP (6 М ГГХ, 100 мМ Tris, рН 8.0, 200 мМ NaCl, 500 мМ імідазол + 10 мМ β-МЕ) додавали буфер E (20 мМ Tris-HCl, рН 8.0, 50 мМ NaCl) для поетапного зниження концентрації гуанідину з 6 М до 3 М, з 3 М до 2 М.</p> <p>На етапах зниження концентрації з 2 М до 1 М, з 1 М до 0,5 М ГГХ, до розчину з білком додавали аргінін до кінцевої концентрації 100 мМ, GSH до 4 мМ, GSSG до 0,4 мМ.</p>
2	Ренатурація на металоафінному сорбенті + гель-фільтрація	<p>На колонці HisTrap HP, градієнт буферів В (6 М гуанідин гідрохлорид, 100 мМ трис-HCl (рН 8,0), 200 мМ NaCl, 10 мМ імідазол) та Х (100 мМ Tris-HCl рН 8.0, 150 мМ NaCl, 100 мМ аргінін, 5 мМ GSH/1 мМ GSSG, 5 мМ MgSO₄).</p> <p>Елюція буфером У (100 мМ Tris-HCl рН 8.0, 150 мМ NaCl, 300 мМ імідазол)</p> <p>Гель-фільтрація у буфер D (50 мМ KН₂PO₄, рН 6.0, 0,1 М L-аргінін, 0,1% Твін 20).</p>
3	Гель-фільтрація	<p>IL7-His, елюйований з колонки HisTrap HP (6 М ГГХ, 100 мМ Tris, рН 8.0, 200 мМ NaCl, 500 мМ імідазол + 10 мМ β-МЕ) наносили на колонку HiPrep з сорбентом сефадекс Sephadex G-25, врівноважену буфером D (50 мМ KН₂PO₄, рН 6.0, 0,1 М L-аргінін, 0,1% Твін 20).</p> <p>До фракції білка після колонки додавали 4 мМ GSH, 0,4 мМ GSSG.</p>
4	Діаліз	<p>Елюйований IL7-His (6М ГГХ, 100 мМ Tris, рН 8.0, 200 мМ NaCl, 500 мМ імідазол + 10 мМ ДТТ) діалізували проти буфера для ренатурації Z (50 мМ Tris-HCl рН 8.0, 50 мМ NaCl, 100 мМ аргінін, 5 мМ GSH, 0.5 мМ GSSG) ~72 години при 4°C. Діалізували проти PBS, ~24 год при 4°C.</p> <p>Ренатурований IL-7 центрифугували (10 хв, 13000 g) щоб прибрати агрегати, наносили на гельфільтраційну колонку HiPrep, врівноважену буфером D (50мМ KН₂PO₄, рН 6.0, 0,1 М L-аргінін, 0,1% Твін 20).</p> <p>До фракції знятого білка додавали 4 мМ GSH, 0,4 мМ GSSG.</p>

Нижчі, співставні між собою ефективності показали методи ренатурації на металоафінному сорбенті та гель-фільтрації. Допоміжні речовини, такі як глутатіони, аргінін забезпечили підвищення виходу функціонально-активного rhIL7-His за рахунок перешкоджання його агрегації, а також сприяли коректному формуванню дисульфідних зв'язків.

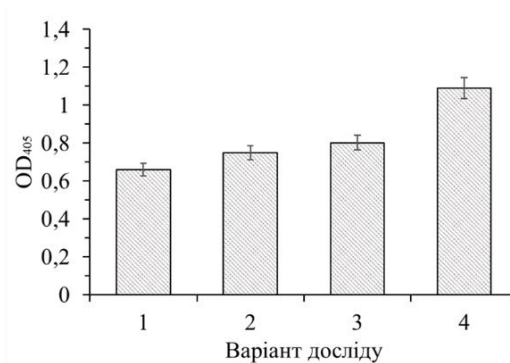


Рис. 3.4. Аналіз зв'язування rhIL7-His, ренатурованого за чотирма методами, з антитілами до IL-7 в ELISA (n=3, p<0,05). Умови ренатурації наведено у таблиці 3.1. Зв'язувальну активність порівнювали при концентрації rhIL7-His 1 мкг/мл

Вихід цільового білка після очистки та ренатурації становив 80%. Чистота препарату складала близько 90% (рис. 3.5).

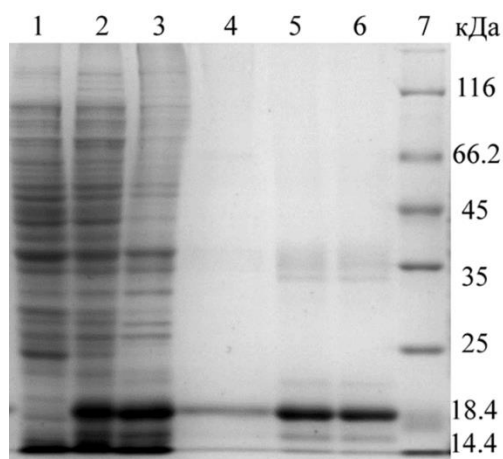


Рис. 3.5. Електрофореграма білків *E. coli*, отриманих в результаті ренатурації rhIL7-His: 1 – клітини без індукції; 2, 3 – фракція бактерійних тілець включення; 4, 5, 6 – фракції очищеного ренатурованого rhIL7-His, розведенням (4), діалізом (5,6); 7 – білки-маркери молекулярної маси («Thermo Scientific», США)

Для перевірки активності rhIL-7, методами діалізу та гельфільтрації, застосовували тест на мононуклеарних клітинах периферичної крові (МНПК). Відповідь МНПК на дію rhIL-7 вимірювали в тесті МТТ на життєздатність клітин, використовуючи активовані мітогеном фітогемаглютиніном (ФГА) лімфоцити периферичної крові людини. Для визначення ефективності ренатурації був поставлений наступний експеримент: клітини були розділені на дві групи, одну з яких обробляли різними концентраціями rhIL-7 («РeproTech», США), а іншу різними концентраціями ренатурованого rhIL-7. Плашки виймали після інкубації впродовж 72 год, та проводили МТТ аналіз життєздатності клітин. (рис 3.6, 3.7).

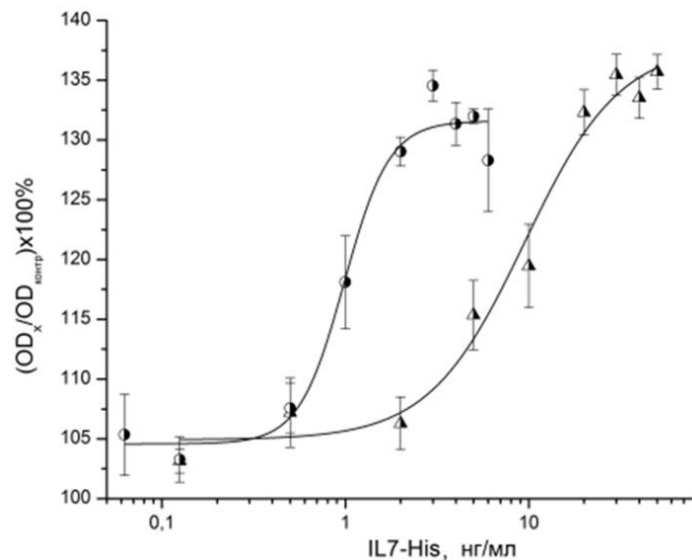


Рис. 3.6. Графік порівняння впливу на МНПК концентрацій rhIL7 («РeproTech», США) (●) та ренатурованого методом гель-фільтрації rhIL7-His (▲). Криві побудовані із застосуванням логістичного аналізу

Результати МТТ тесту продемонстрували, що кількість живих клітин при внесенні до культури МНПК певних визначених концентрацій rhIL7 значно зростає порівняно з контрольною групою, в яку нічого не додавали. При цьому для досягнення однакового рівня виживання клітин потрібно внести значно вищу концентрацію rhIL7-His, отриманого ренатурацією із застосуванням гель-фільтрації, ніж стандартного препарату rhIL7 «РeproTech». EC50 в цьому

випадку відрізняються майже в 10 разів, становлячи $9,49 \pm 2,04$ нг/мл та $0,99 \pm 0,1$ нг/мл, відповідно. Це свідчить, що активність rhIL7-His, отриманого гель-фільтрацією поступаєтья активності і афінності стандартного препарату rhIL7. Отже, цей метод ренатурації в даному випадку не можна вважати достатньо ефективним.

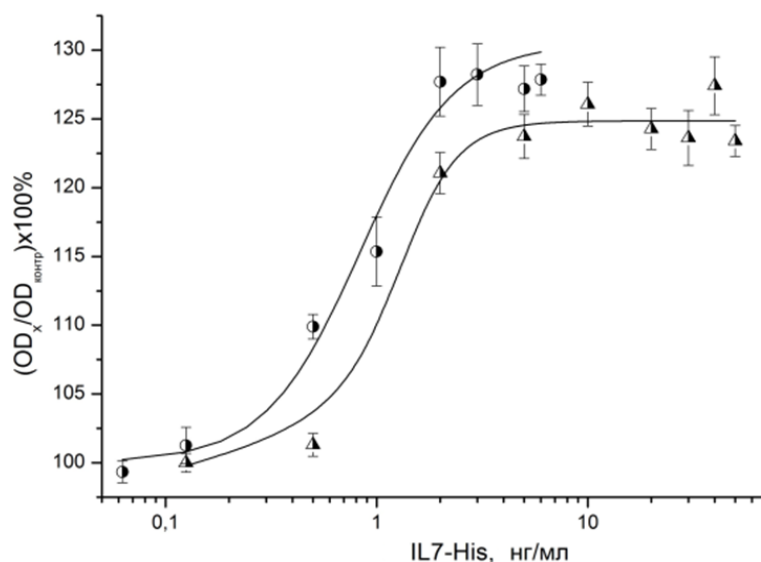


Рис. 3.7. Графік порівняння дозозалежного впливу на МНПК концентрацій rhIL7 («ReproTech», США) (о) та ренатурованого методом діалізу rhIL7-His (Δ). Криві побудовані із застосуванням логістичного аналізу

В той же час, для препарату rhIL7, ренатурованого діалізом, порівняльний аналіз свідчить про співставну активність і афінність до рецепторів клітин отриманого нами і стандартного препарату, EC_{50} становлять $1,12 \pm 0,38$ нг/мл та $0,79 \pm 0,1$ нг/мл. Відповідно, можна зробити висновок про отримання білка в повністю активній функціональній формі і про ефективність ренатурації рекомбінантного білка rhIL7-His методом діалізу.

Результати досліджень, представлені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:

1. **Usenko M.O., Gorbatiuk O.B., Okunev O.V., Kordium V.A.** Production of IL7-His recombinant protein for purification of polyclonal antibodies.

XIth Parnas Conference: Young Scientists Forum «Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine» Kyiv, Ukraine, 2018. *Ukr. Biochem. J.* Vol. 90, Special Issue. P. 70.

2. **Usenko M.O.**, Gorbatiuk O.B., Okunev O.V., Kordium V.A. Production of IL7-fusion recombinant proteins and their application for affinity chromatography resin creation. 15th Horizons in Molecular Biology: International PhD Student Symposium, Göttingen, Germany, 2018. Abs. book. P.124.

3. Kovalchuk M.V., Ruban T.A., **Usenko M.O.**, Kordium V.A. Personalized responsiveness of human PBMCs to the action of IL-7. *Biopolymers and Cell.* 2020. Vol. 36. N 4. P. 304–312. DOI: 10.7124/bc.000A33.

3.3. Ренатурація і перевірка активності rhIL7-CBD

Для одержання очищеної фракції rhIL7-CBD було проведено виділення фракції бактерійних тілець включення. Після цього необхідною умовою для його отримання у розчинній функціонально активній формі стає етап його подальшої ренатурації *in vitro*. Суттєвий вплив на ефективність процесу ренатурації мають нецільові білкові домішки, що спричиняють агрегацію білка. Тому надалі зусилля були сконцентровані на оптимізації процесу очищення кон'югату. Відпрацювання умов очистки продемонструвало, що промивання колонки із нанесеною фракцією солюбілізованого цільового білка денатуруючим буфером із 20 мМ імідазолом дозволяє значно покращити чистоту елюйованого білка. В результаті, було досягнуто чистоти препарату близько 90% (рис. 3.8).

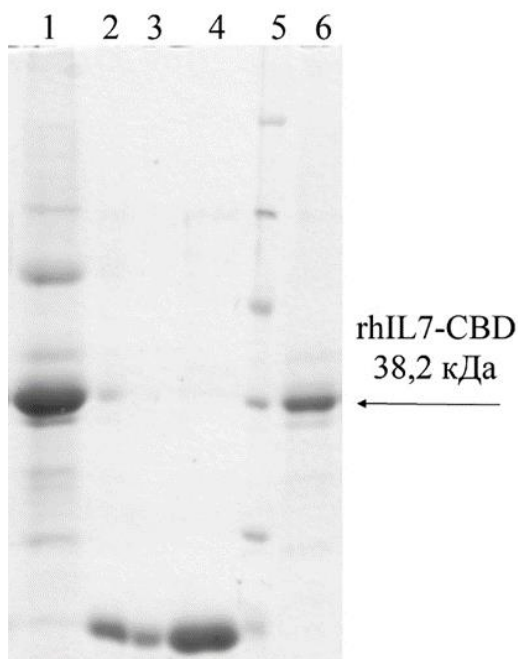


Рис. 3.8. Електрофореграма фракції білків, отриманих у результаті очищення rhIL7-CBD із бактерійних тілець включення: 1 –rhIL7-CBD до оптимізації умов очищення; 2–4 – білки-маркери концентрації; 5 – білки маркери молекулярної маси (116, 66, 45, 35, 25, 18,4 кДа); 6 – rhIL7-CBD після оптимізації умов очищення

Після очистки на металоафінному сорбенті проводили ренатурацію білка методами плавного розведення та діалізу, з додаванням аргініну, окисненого та відновленого глутатіонів, а також бета-циклодекстрину. Склад буферних розчинів для ренатурації наведено в таблиці 3.2.

Таблиця 3.2

Склад буферних розчинів для ренатурації

1.	Плавне розведення	100 мМ Трис, 2 мМ EDTA, 0,5 М L-аргінін, 0,1 мМ GSSG (pH=8.0)
2.	Діаліз	50 мМ Трис, 50 мМ NaCl, 100 мМ L-аргінін, 0,5 мМ GSSG, 5 мМ GSH (pH=8.0)
3.	Плавне розведення	100 мМ Трис, 100 мМ NaCl, 5 мМ бета-циклодекстрин, 0,5 М L-аргінін, 0,4 мМ GSSG, 4 мМ GSH (pH=8.0)

Ефективність ренатурації rhIL7, у складі злитого білка rhIL7-CBD, визначали за результатами зв'язування із специфічними антитілами в ELISA (рис. 3.9). Було показано, що найвищу ефективність має метод ренатурації діалізом, який і було обрано для отримання необхідної кількості злитого білка для іммобілізації на целюлозі.

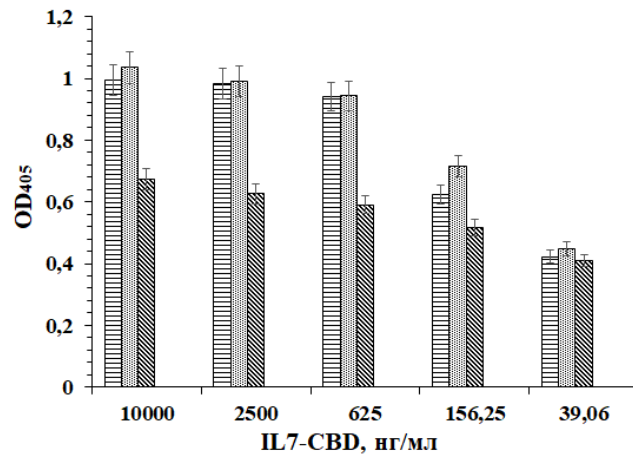


Рис. 3.9. Аналіз зв'язування rhIL7-CBD, ренатурованого трьома методами, з антитілами до ІЛ-7 в ELISA ($n=3$, $p<0,05$). Умови ренатурації наведено у таблиці 3.2

Отриманий біоафінний сорбент в результаті іммобілізації rhIL7-CBD на мікрокристалічній целюлозі СС31 було застосовано для виділення специфічних до ІЛ-7 поліклональних антитіла із сироваток імунованих тварин. Перед нанесенням на афінний сорбент проводили первинне очищення тотальної фракції ІgG імунованих мишей на сорбенті із білком SPA-CBD або осадження ІgG сульфатом амонію. Елюцію специфічних поліклональних антитіл із СС31 з rhIL-7-CBD проводили буфером, що містить 3,5 М $MgCl_2$. Такі умови забезпечують селективну десорбцію зв'язаних із рекомбінантним антигеном антитіл. Завдяки високій ємності сорбенту, а також ефективності схем іммобілізації та елюювання специфічних поліклональних антитіл, зазначений метод дозволяє одержувати антитіла високого ступеня чистоти у препаративній кількості (рис. 3.10).

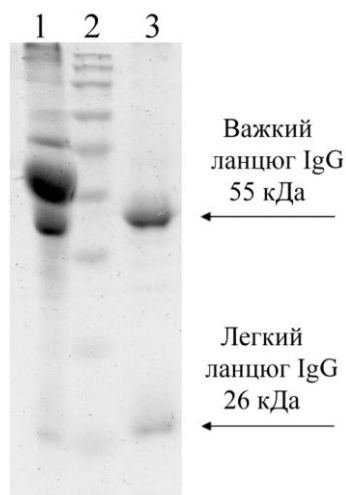


Рис. 3.10. Електрофореграма фракцій елюції поліклональних антитіл з афінної колонки: 1 – нанесені на колонку білки сироватки імунізованих тварин; 2 – білки-маркери молекулярної маси; 3 – елюйовані антитіла

Очищені на афінному сорбенті поліклональні антитіла, специфічні до ІЛ-7 (рис. 3.11), були використані для виявлення антигену в прямому методі ELISA. Було показано, що отримані ІgG достовірно виявляють rhIL-7 в концентрації 34 нг/мл (рис. 3.12).

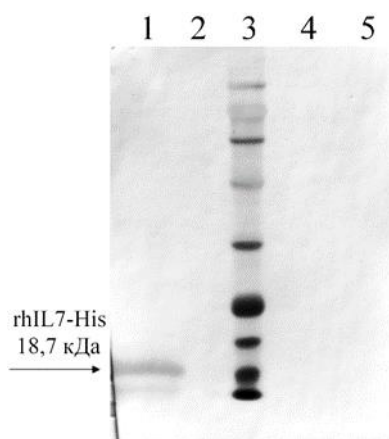


Рис. 3.11. Вестерн-блот аналіз зв'язування очищених антитіл, специфічних до rhIL-7, з наступними білками: 1 – rhIL7-His; 2 – ASK1; 4 – IFN β -1b; 5 – IL-10

Очищення антитіл на іммобілізованому антигені – найбільш специфічний тип афінної хроматографії, що забезпечує отримання антитіл з найвищим ступенем чистоти та найменшою кількістю молекул, що мають перехресну

реактивність. Афінно очищені антитіла, отриманих із поліклональних сироваток, демонструють найвищу специфічність і чутливість. Отримані із поліклональних сироваток афінно очищені антитіла демонструють найвищу специфічність і чутливість. Оскільки ці антиген-специфічні антитіла є поліклональними, вони можуть бути використані як для зв'язування антигену, так і його виявлення у сандвіч-методах імуноаналізу.

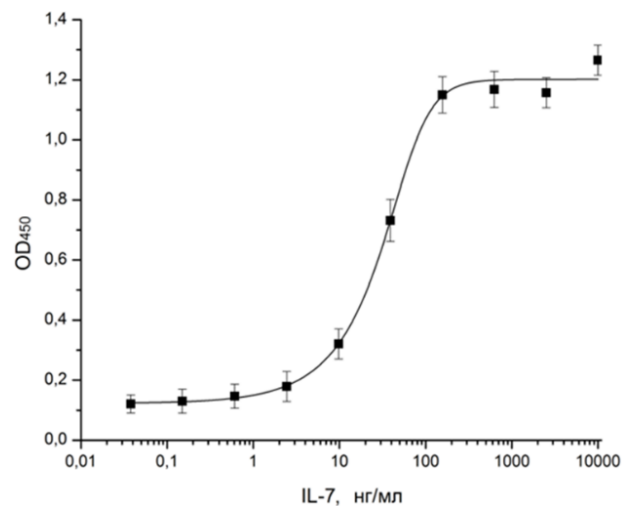


Рис. 3.12. Крива зв'язування очищених на біоафінному сорбенті поліклональних антитіл IL7 в ELISA (n = 3)

Результати досліджень, представлені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:

1. **Усенко М.О.**, Горбатюк О.Б., Окунєв О.В., Іродов Д.М., Ковальчук М.В., Кордюм В.А. Отримання рекомбінантного злитого білка rhIL7-CBD. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2020. Т. 26. С. 282–286. DOI: 10.7124/FEEO.v26.1280.

2. **Usenko M.O.**, Gorbatiuk O.B., Okunev O.V., Kordium V.A. Production of IL7-fusion recombinant proteins and their application for affinity chromatography resin creation. 15th Horizons in Molecular Biology: International PhD Student Symposium, Göttingen, Germany, 2018. Abs. book. P.124.

3. **Usenko M.O.**, Gorbatiuk O.B., Okunev O.V., Kordium V.A. Obtaining and characterization of the IL-7-CBD fusion protein. Materials of XII annual

Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Kyiv, 2018. *Biopolym. Cell.* Vol. 34, N 2. P. 163.

3.4. Ренатурація і перевірка активності rhIL7-ВАРmut

Для отримання очищеної фракції rhIL7-ВАРmut виділяли бактерійні тільця включення. Денситометрія електрофореграм після розділення білків лізатів *E. coli* за допомогою програми TotalLab 2.0 показала, що вміст цільового білка в тільцях включення досягав 30–35% від вмісту сумарних білків клітин *E. coli*. Отримані тільця включення містили в середньому 0,32 мг/мл rhIL7-ВАРmut в перерахунку на вихідну культуру *E. coli*. Солюбілізацію тілець включення проводили в буферному розчині, що містив 6 М ГГХ та 10 мМ 2-меркаптоетанол, центрифугували та відбирали супернатант для подальшої очистки та ренатурації. Очищення проводили методом металоафінної хроматографії. Оскільки імідазол, який було застосовано для елюції білка з металоафінного сорбенту, може впливати на активність лужної фосфатази, проводили заміну буфера для елюції на буфер, що не містить імідазол, методом гель-фільтрації на сорбенті сефадекс G-25 (Рис. 3.13).

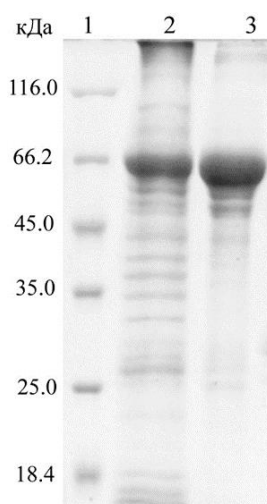


Рис. 3.13. Електрофореграма фракції білків бактерійних тілець включення: 1 – білки маркери молекулярної маси; 2 – виділені та очищенні тілця включення rhIL7-VARmut; 3 – очищений rhIL7-VARmut на металоафінному сорбенті та гель-фільтраційній колонці

Узагальнені дані результатів синтезу, очищення та ренатурації рекомбінантного злитого білка IL7-VARmut за різних умов індукування синтезу наведено в таблиці 3.3.

Таблиця 3.3

Порівняння результатів синтезу, очищення та ренатурації рекомбінантного злитого білка IL7-VARmut за умов індукування синтезу додаванням ШТГ та за протоколом аутоіндукції при температурі + 37 °С

	Аутоіндукція	Індукція ШТГ
Вихід цільового білка, після індукування його синтезу (мг/л <i>E. coli</i>)	390	100
Рівень накопичення цільового білка від сумарних білків <i>E. coli</i> , %	30	23
Значення OD600 бактерійної культури після індукування синтезу	15.3	9.1
Вихід* IL7-VARmut після виділення та очищення тілець включення, %	80	не визначали
Чистота IL7-VARmut після очищення та ренатурації, %	90	не визначали
Вихід** IL7-VARmut після очищення та ренатурації (мг/л <i>E. coli</i>)	70	не визначали

Примітка. *вихід rhIL7-VARmut розраховували як відсоток отриманого білка від його загальної кількості після індукування синтезу

Для проведення ренатурації rhIL7-ВАРmut застосовували метод плавного розведення. Додаткові речовини, які забезпечують інгібування агрегації, а також співвідношення окисно-відновних реагентів для коректного формування дисульфідних зв'язків підбирали відповідно до даних літератури [145]. Додавання аргініну у концентрації 0,1 – 1 М дозволяє знизити агрегацію білка та підвищити його розчинність. Припускають, що гуанідинова група має слабкі взаємодії з ароматичними групами амінокислот, котрі в денатурованому білку знаходяться на поверхні і сприяють його агрегації [146]. Показано, що додавання аргініну і глутатіону забезпечує ренатурацію білків, що містять дисульфідні зв'язки при ступінчастому діалізі. Дослідження концентрації та співвідношення відновленого і окисненого глутатіонів (GSH/GSSG) показали, що для лужної фосфатази присутність GSH/GSSG у співвідношенні 10:1 – 5:1 забезпечувала максимальний вихід функціонально-активного білка [147]. При співвідношенні 1:1 вихід ренатурованого білка суттєво зменшувався.

Ще одним реагентом, який досить часто використовують для запобігання агрегації білка є циклодекстрин. Зокрема, β -циклодекстрин – циклічний олігосахарид, що складається з семи α -(1,4) зв'язаних α -D-глюкопіранозних залишків [148]. ЯМР дослідження показали, що порожнина кільця молекули циклодекстрина може утворювати комплекси із залишками амінокислот, особливо ароматичних, на поверхні білка. Окрім запобігання агрегації цільового білка, циклодекстрин може мати шапероноподібну дію. Молекули детергентів (наприклад, неіонний детергент Твін 20) екранують гідрофобні ділянки денатурованих білків. Циклодекстрин забезпечує вилучення молекули детергента із комплексу білок-детергент, чим запускає процес ренатурації білка *in vitro*. Лімітуючим фактором є розміри детергента, що впливають на можливість його взаємодії з молекулою циклодекстрину.

В нашому випадку компонентом злитого білка є металопротеїн – лужна фосфатаза, що містить в складі активного центру два іони Zn^{2+} , необхідні для реалізації каталітичної функції і термодинамічної стабільності (у так званих

каталітичному M1 і структурному M2 сайтах), а також іон Mg^{2+} (у регуляторному сайті M3) необхідний для структурної стабілізації ферменту [149]. Іони Mg^{2+} запобігають агрегації і збільшують активність ренатурації фосфатази на 50% вже за присутності в концентрації 5 мМ. Таке підвищення ефективності ренатурації не досягалося при додаванні інших іонів металів, наприклад, Zn^{2+} чи Ca^{2+} , навіть за більших концентрацій (20 мМ). Відтак, ренатурація лужної фосфатази менше залежить від іонної сили буфера, ніж від специфічних взаємодій між білком і іонами Mg^{2+} . При використанні різних солей Mg^{2+} досягали схожого рівня ренатурації, тобто, аніонна частина не відіграла специфічної ролі в цьому випадку. Mg^{2+} стабілізує інтермедіати на ранній стадії ренатурації VAR, зменшуючи агрегацію денатурованих молекул. Тому в роботі було застосовано лише іони Mg^{2+} .

Допоміжні речовини, які додавали під час ренатурації плавним розведенням (таблиця 3.4), забезпечили підвищення виходу функціонально-активного rhIL7-VARmut за рахунок перешкоджання його агрегації, а також сприяли коректному формуванню дисульфідних зв'язків.

Оскільки, ренатурація розведенням не завжди є технологічною, а rhIL7-VARmut містить генетично введену послідовність His-tag, привабливим було використання останньої для проведення його одностадійного очищення та ренатурації на металоафінному сорбенті. Для оптимізації процесу очищення і ренатурації цільового білка використовували колонку, яка містила 1мл Ni-NTA - Superflow сефарози. Однак, було встановлено, що у випадку rhIL7-VARmut, стеричні обмеження не дозволяють білку набути нативної клнформації. Відтак, для rhIL7-VARmut метод плавного розведення, що не має стеричних обмежень, виявився більш ефективним у порівнянні з ренатурацією на колонці (рис.3.14).

Варіанти ренатурації rhIL7-ВАРmut

№ досліджу	Метод ренатурації	Склад буфера для ренатурації
1	плавне розведення	100 мМ Tris-HCl pH 8.0, 150 мМ NaCl, 500 мМ аргінін, 5 мМ GSH/1 мМ GSSG, 5 мМ MgSO ₄
2	плавне розведення	100 мМ Tris-HCl pH 8.0, 150 мМ NaCl, 5 мМ β- циклодекстрин, 5 мМ GSH/1мМ GSSG, 5 мМ MgSO ₄
3	плавне розведення	100 мМ Tris-HCl pH 8.0, 150 мМ NaCl, 5 мМ GSH/1 мМ GSSG, 0,1% Triton X-100
4	ренатурація на металоафінному сорбенті	100 мМ Tris-HCl pH 8.0, 150 мМ NaCl, 100 мМ аргінін, 5 мМ GSH/1 мМ GSSG, 5 мМ MgSO ₄

В результаті проведеного експерименту було показано, що найвища ефективність ренатурації rhIL7-ВАРmut була у випадку застосування аргініну, і глутатіонів для формування дисульфідних зв'язків (рис.3.14).

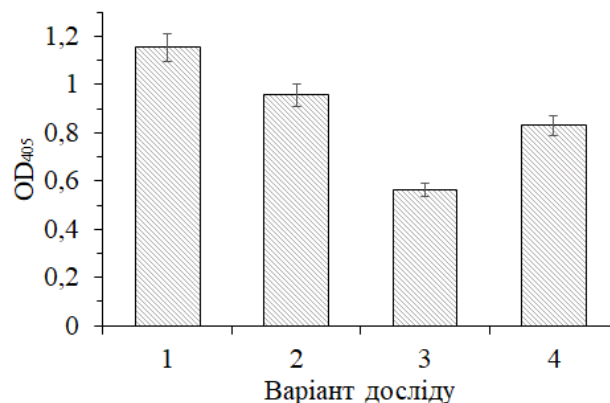


Рис. 3.14. Аналіз зв'язування rhIL7-ВАРmut, ренатурованого за присутності різних реагентів і їх співвідношень, з антитілами до ІЛ-7 в ELISA (n=3, p<0,05). Умови ренатурації наведено у таблиці 3.3. Зв'язувальну активність порівнювали при концентрації rhIL7-ВАРmut 1 мкг/мл

Перевірку біологічної активності rhIL-7 у складі злитого білка проводили шляхом зв'язування зі специфічними до rhIL-7 полі- та моноклональними

антитілами. Для візуалізації імунних комплексів застосовували нерозчинний субстрат для лужної фосфатази NBT/BCIP-T (Sigma, США). rhIL7-ВАРmut давав чіткий сигнал у випадку обох антитіл, що є свідченням специфічності реакції та підтвердженням його біфункціональної активності (рис.3.15).

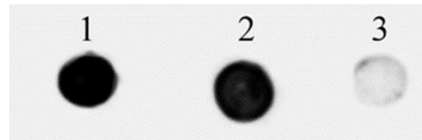


Рис. 3.15. Дот-блот аналіз зв'язування rhIL7-ВАРmut з антитілами, специфічними до ІL7. 1 - поліклональні антитіла кроля, специфічні до ІL7; 2 - моноклональні антитіла миші, специфічні до ІL7; 3 - негативний контроль

Також проводилося визначення оптимальних умов функціонування ВАРmut. За даними літератури було проаналізовано декілька варіантів буферних розчинів [138]. В результаті імуноферментного аналізу було встановлено, що при використанні буферних розчиніві Трис або CAPS при значенні рН 9,5 – 10,0 спостерігалась найвища активність ферменту (рис. 3.16).

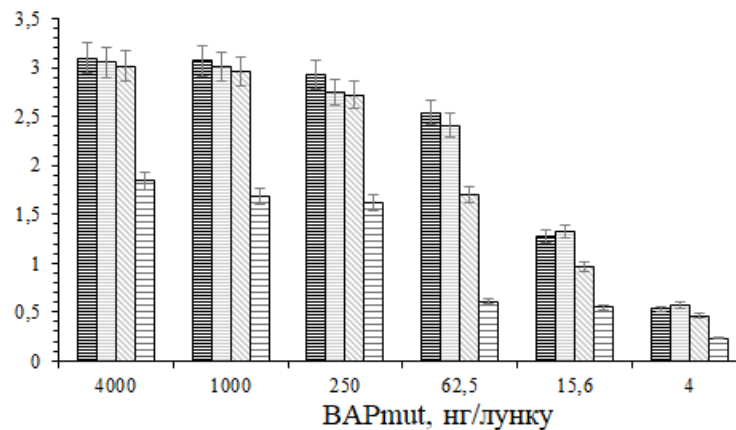


Рис. 3.16. Визначення оптимальних умов для функціонування ВАРmut в ELISA.

Буфер 1: 100 мМ Tris-HCl, 140 мМ NaCl, 15 мМ MgSO₄ (рН=9,5);

буфер 2: 50 мМ CAPS, 400 мМ NaCl, 10 мМ MgSO₄ (рН=10,0);

буфер 3: 100 мМ Tris-HCl, 15 мМ MgSO₄ (рН=9,0);

буфер 4: 50 мМ гліцин, 15 мМ MgSO₄, (рН=9,2)

Отриманий злитий білок rhIL7-BAPmut було застосовано для скринінгу імунної комбінаторної бібліотеки кДНК варіабельних генів імуноглобулінів миші шляхом аналізу реплік бактерійних колоній (клонів-продуцентів одноланцюгових антитіл, специфічних до IL7). В результаті було виділено клони, що продукують специфічні одноланцюгові антитіла (Рис. 3.17).

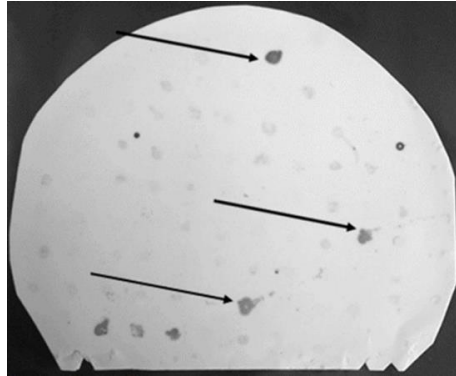


Рис. 3.17. Імуноблот реплік бактерійних колоній, одержаних в результаті скринування клонів, отриманих після декількох циклів афінної селекції фагової бібліотеки проти rhIL7. Візуалізацію клонів проводили із застосуванням rhIL7-BAPmut. Стрілками вказано клони, що продукують специфічні антитіла

Отриманий злитий білок rhIL7-BAPmut також може бути використаний для одностадійного виявлення специфічних до IL7 антитіл. Схема проведення класичного імуноферментного аналізу із застосуванням кон'югату антигену з маркерною молекулою наведено на рис. 3.18.

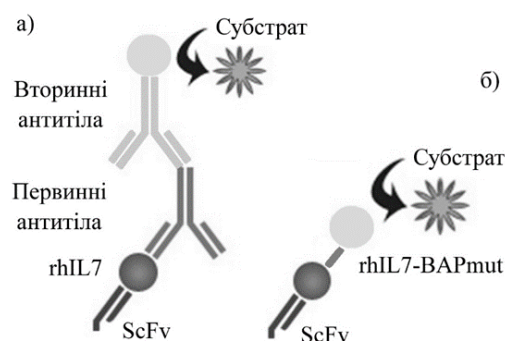


Рис. 3.18. Схематичне зображення проведення ELISA для детекції scFv(IL7): а) виявлення імунних комплексів scFv-rhIL7 відбувається в результаті послідовного додавання специфічних первинних і вторинних антитіл; б) виявлення scFv(IL7) проводиться в результаті взаємодії злитого білка rhIL7-BAPmut

Застосування rhIL7-VAPmut дозволяє суттєво скоротити час проведення імуноферментного аналізу та зменшити витрати на імунореагенти.

Результати досліджень, представлені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:

1. **Усенко М.О.**, Окунєв О.В., Бенціонова К.І., Горбатюк О.Б., Іродов Д.М., Кордюм В.А. Отримання рекомбінантного злитого білка rhIL7-VAPmut та його функціональна характеристика. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2019. Т. 25. С. 321-326. DOI: 10.7124/FEEO.v25.1185.

2. **Усенко М.О.**, Окунєв О.В., Бенціонова К.І., Горбатюк О.Б., Іродов Д.М., Ковальчук М.В., Кордюм В.А. Оптимізація умов ренатурації злитого білка rhIL7-VAPmut із тілець включення *Escherichia coli* та його практичне застосування. *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів*. 2019. Т. 17, № 1. С. 39-45. DOI: 10.7124/visnyk.utgis.17.1.1199.

3. Gorbatiuk O.V., **Usenko M.O.**, Okunev O.V., Bentsionova K. I., Irodov D.M. Optimization of renaturation method of the IL7-VAPmut fusion protein, its characterization and application. Матеріали XII Українського біохімічного конгресу, м. Тернопіль, 2019. *Медична та клінічна хімія*. Т. 21, № 3 (додаток). С. 266.

3.5. Отримання рекомбінантного білка CBD-intein(his)-IL7

Актуальною є розробка нових методів для максимального спрощення виробництва та очищення рекомбінантних білків. Однією з проблем отримання rhIL7 в бактерійних системах синтезу є модифікація N-кінця еукаріотичного білка формілметіоніном (fMet). Зазвичай, fMet має вилучатися з поліпептиду на ранніх етапах синтезу білка специфічними ферментами, метіонінамінопептидазами. Проте, рекомбінантні білки часто містять fMet через високу швидкість їх синтезу в бактерійних системах експресії. Перспективним є використання інтеїнів для вирішення цієї проблеми. Інтеїни

– це внутрішні поліпептидні послідовності, які здатні автокаталітично видалятися з поліпептидного ланцюга після трансляції. У їх складі виділяють N- і C-кінцеві сплайсингові домени. В результаті сплайсингу білок розщеплюється на три поліпептиди: інтеїн та дві послідовності, N- та C-екстеїни. Екстеїни далі можуть лігувати або існувати відокремлено. Цільовий білок можна злити з інтеїном, який матиме афінну мітку. Тоді отриманий химерний поліпептид буде мати афінний тег, що може досить легко видалятися. Поліпептидні зв'язки розщеплюються перед першим залишком та після останнього залишку інтеїну. Модифікація амінокислотних залишків інтеїну дозволяє проводити контрольоване розщеплення. Використання інтеїну робить можливим отримання білка з нативним N-кінцем шляхом злиття цільового білка з C-кінцем інтеїну. Впродовж трансляції N-кінець інтеїна модифікується fMet, що видаляється разом з інтеїном при розщепленні.

В цій частині дослідження метою було отримати rhIL7 в *E. coli* з нативним N-кінцем, створивши рекомбінантний білок CBD-intein(his)-IL7, в якому N-кінець rhIL7 білка був злитий з Mxe GyrA інтеїном (рис. 3.19).

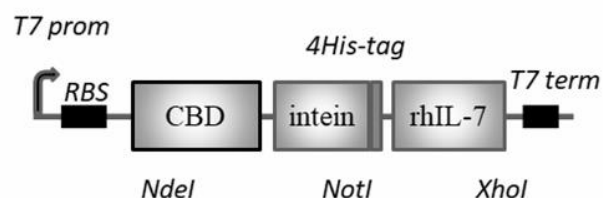


Рис. 3.19. Схематичне розміщення елементів експресійної касети у векторі pET24 для синтезу рекомбінантного злитого білка CBD-intein(his)-IL7

Плазмідний вектор був створений на основі *pET24-CBD-intein(his)-Hgh*, що був зроблений раніше співробітниками лабораторії [138] для отримання гормону росту людини. Ген CBD вставлений по сайтах рестрикції *NdeI*, в ген інтеїну була введена послідовність олігогістидину, яка дозволяє за допомогою ІМАХ прибрати цей протеїн після проведення розщеплення злитого білка.

NGH було замінено на ген rhIL7 (рис. 3.17). Отриманою плазмідною *pET24-CBD-intein(his)-IL7* трансформували клітини *E. coli* BL21(DE3).

Індукування синтезу рекомбінантного білка проводили за протоколом аутоіндукції та додаванням ПТГ, при +30 °С та +37 °С (рис. 3.20.). За обох температур білок синтезувався в умовах, створених за протоколом аутоіндукції. Максимальні рівні виходу становили близько 15 % від вмісту сумарних білків клітин *E. coli*. Аналіз білків клітинних фракцій після індукції експресії показав, що білок CBD-intein(his)-IL7 накопичувався в нерозчинній фракції бактеріальних тілець включення. Маса отриманого білка становила близько 59 кДа.

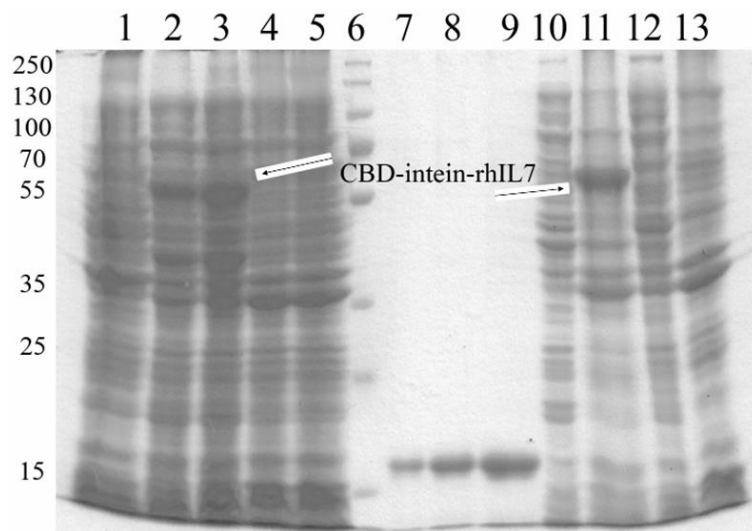


Рис. 3.20. Електрофореграма білків *E. coli*, отриманих в результаті індукування синтезу CBD-intein-IL7: 1 – клітини без індукції; 2, 3 – аутоіндукція при 30°C і 37°C; 4, 5 – індукція ПТГ при 30°C і 37°C; 6 – білки-маркери молекулярної маси; 7 – 9 маркер концентрації IFNa2b, 1, 2 і 4 мкг, відповідно; 10, 11 – фракція розчинних і нерозчинних білків клітин, відповідно, за умов аутоіндукції; 12, 13 – фракція розчинних і нерозчинних білків клітин, відповідно, за умов індукції ПТГ

Наявність домену CBD дозволила провести зв'язування білка з целюлозним сорбентом одразу після солюбілізації тілець, цей компонент злитого протеїна зберігав функціональну активність у 7М гуанідин гідрохлориді. Після 1,5 год солюбілізації целюлозу зі зв'язаним білком

промивали буфером із 50мМ Трис-НСl (рН 8,0), 0,2 М NaCl. Після цього до сорбента в буфер додавали 50 мМ ДТТ або 50 мМ 2-меркаптоетанолу для індукції білкового сплайсингу. У супернатанті перевіряли наявність вільного rhIL7 та комплексу intein(his)-IL7, що ще не розпався, після першого дня інкубації (рис 3.21).

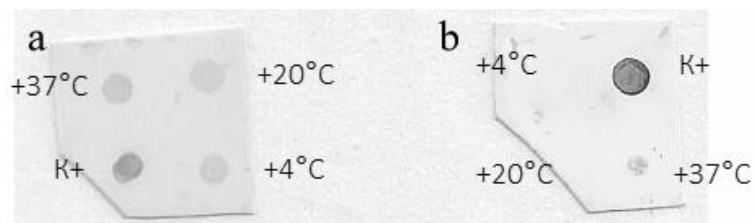


Рис. 3.21. Дот-блот аналіз для детекції rhIL7 в супернатанті після індукції відщеплення інтеїну а) ДТТ та б) 2-МЕ за різних температурних умов. rhIL7-His в якості контролю. Використані поліклональні мишині антитіла до IL7 та кон'юговані з фосфатазою антитіла проти мишиних

Дот-блот аналізом було показано, що 50 мМ ДТТ краще за 2-меркаптоетанол індукує розпад білка на CBD та intein(his)-IL7 за всіх температурних умов Далі індукували сплайсинг 50 мМ ДТТ за температури +4 °C (рис. 3.22).

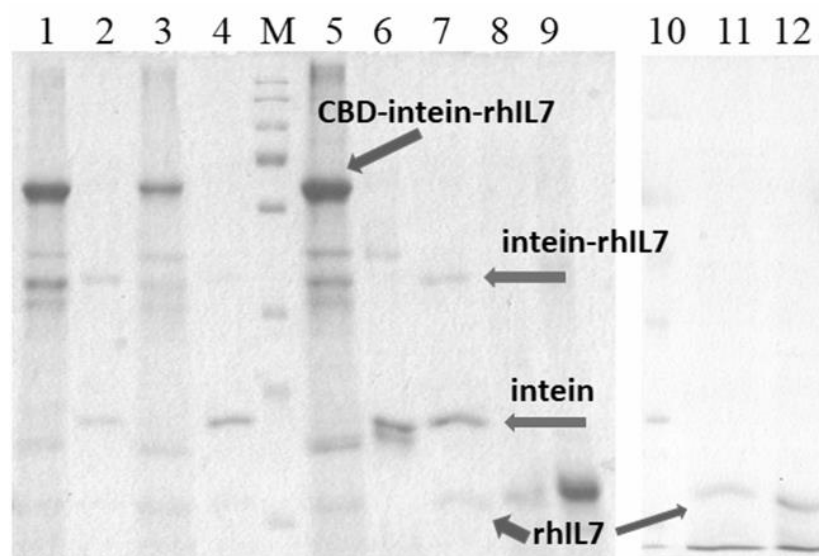


Рис. 3.22. Електрофореграма білка CBD-intein(his)-IL7, отриманого в результаті індукування сплайсингу 50 мМ ДТТ: 1, 3, 5 – фракція білків на сорбенті після 1, 2, та 3 днів експерименту, відповідно; 2, 4, 7 – фракція білків

в супернатанті після 1, 2, та 3 днів експерименту, відповідно; М, 10 – білки-маркери молекулярної маси; 6 – контроль, білки супернатанту при сплайсингу CBD-intein(his)-HGH, присутні полоси intein(his)-HGH та HGH, intein(his); 8, 9 – як контроль виступає ренатурований rhIL7-His; 11, 12 – очищена фракція rhIL7 після Ni-NTA сефарози

Наявність вільного rhIL7 та комплексу intein-IL7, що ще не розпався, перевіряли через 1, 2 та 3 доби.

Фракцію після третьої доби наносили на Ni-NTA сефарозу, і отримували rhIL7 в фракції проскоку, на сорбенті залишався intein(his). Отриманий rhIL7, після тривалого інкубування з 50 мМ ДТТ потребує подальшого етапу ренатурації і концентрування.

Результати досліджень, представлені у підрозділі, опубліковано в роботі:

1. **Usenko M.**, Gorbatiuk O., Okunev O., Kordium V. High-throughput purification method of the recombinant human IL7. 20th International Summer School on Immunology “Immune System: Genes, Receptors and Regulation”, Hvar, Croatia, 2019. Book of abstracts P. 107.

3.6. Отримання рекомбінантного білка scFv(IFN β 1b)-VAPmut

Терапія рекомбінантним інтерфероном наразі є одним з широковикористовуваних шляхів вповільнення розвитку рецидивно-ремітуючої форми розсіяного склерозу. Для детального вивчення механізмів розвитку РС, розробки ефективних шляхів терапії захворювання актуальним є ґрунтовне вивчення профілів зміни концентрацій IFN β в різних пробах. Для встановлення концентрацій вдалим інструментом є одноланцюгові рекомбінантні антитіла, що складаються з варіабельних доменів легкого та важкого ланцюгів імуноглобулінів. На відміну від повнорозмірних

моноклональних і поліклональних, комерційно доступних антитіл, технологія отримання scFv набагато дешевша для впровадження та менш трудомістка. scFv антитіла можуть бути отримані у високих концентраціях в бактеріальних системах синтезу, можуть бути стабільними і характеризуватися високими значеннями констант афінності, високою специфічністю. А також можуть бути модифіковані, злиті з флуоресцентними чи ензимними мітками.

За допомогою такого методу селекції комбінаторних бібліотек, як фаговий дисплей, було отримано scFv до IFN β -1b з імунної комбінаторної бібліотеки кДНК варіабельних генів імуноглобулінів. Співробітниками лабораторії було попередньо отримано плазмідні вектори *pCANTAB-scFv(IFN β 1b)* [139], які використовували для конструювання плазмідних векторів *pCANTAB-scFv(IFN β 1b)-BAPmut*. *pCANTAB-scFv(IFN β 1b)* лінеаризували по сайтах *NotI* та *NheI* і по них вставляли ген BAP з плазмиди *pJET1.2-BAPmut*. ScFv(IFN β 1b) та BAPmut поєднувались лінкерною послідовністю з трьох залишків аланіну, що сприяло просторовому розділенню білків-партнерів і забезпечувало збереження їх структури та функціональної активності. N-кінець молекули scFv приймає участь у формуванні активного центру антитіла, тому для уникнення втрати антигензв'язувальної активності молекула BAP приєднувалась до C-кінця scFv(IFN β 1b). BAP є природнім периплазматичним білком *E. coli*, який функціонує у формі димеру. В результаті химеризації кожен димер BAP містить дві молекули scFv, що збільшує авідність генно-інженерного злитого білка, а отже і його функціональну активність.

Створеним плазмідним вектором *pCANTAB-scFv(IFN β 1b)-BAPmut* трансформували клітини *E. coli* BL21(DE3). Ключовою особливістю системи експресії, яка була обрана нами для досліджень, є можливість отримання scFv у функціонально активній формі, що досягається секрецією scFv у бактеріальну периплазму. У периплазмі формуються дисульфідні містки, які необхідні для підтримання нативної структури варіабельних доменів і проходження правильного фолдингу молекул scFv. Так забезпечується

накопичення цільового білка у біологічно активному та розчинному стані. Після завершення згортання одноланцюгових антитіл у периплазмі відбувається також протеолітичне відщеплення їх лідерного пептида.

На основі п'яти scFv(IFN β 1b) були створені п'ять клонів продуцентів із плазмідними векторами *pCANTAB-scFv(IFN β 1b)-BAPmut*. Виділяли периплазматичну фракцію білків із scFv(IFN β 1b)-BAPmut, і досліджували функціональну активність злитих антитіл методами дот-блот та імуноферментного аналізу. Активність фосфатази спостерігали в усіх п'яти білках. Клони продемонстрували високу специфічність до IFN β -1b людини (рис. 3.23).

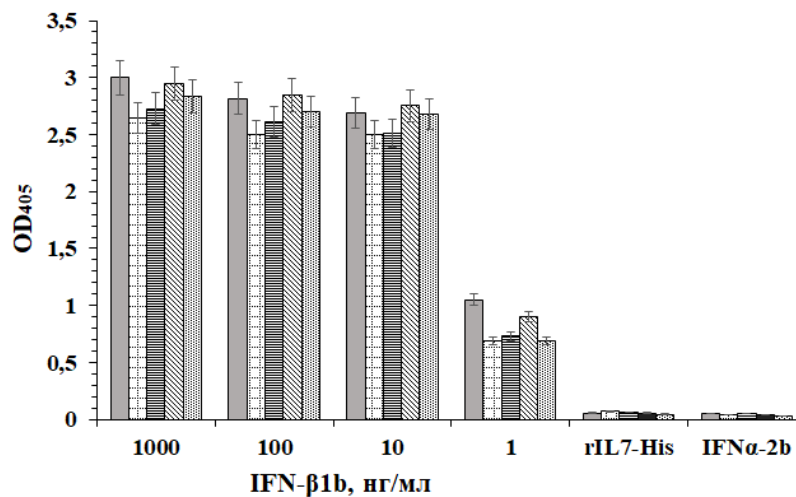


Рис. 3.23. Підтвердження функціональної активності п'яти клонів scFv(IFN β 1b)-BAPmut у складі рекомбінантного імунокон'югату із застосуванням методу імуноферментного аналізу

Результати досліджень, представлені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:

1. Патент на корисну модель № 132794 Україна. МПК (2019.01) C12N 15/00. Опубл. 11.03.2019, Бюл. № 5. Модифікований генно-інженерний злитий білок scFv(IFN β 1b)-BAP, продукований бактеріями *E. coli*. Заявник: державна установа «Інститут генетичної та регенеративної медицини Національної академії медичних наук України». Горбатюк О.Б., Усенко М.О., Іродов Д.М., Кордюм В.А. Заявл. 02.10.2018; опубл. 11.03.2019.

2. **Usenko M.**, Gorbatiuk O., Okunev O., Kordium V. Obtaining and characterization of a singlechain variable fragment alkaline phosphatase fusion proteins and specific polyclonal antibodies for detection of IFNbeta and interleukin10. 43rd FEBS Congress, Prague, Chech Republic 2018. *FEBS Open Bio*. Vol. 8, N 1. P. 186.

3. **Усенко М.О.**, Горбатюк О.Б., Іродов Д.М., Кордюм В.А. Отримання та характеристика одноланцюгових антитіл специфічних до інтерферону- β 1b та інтерлейкіну-10 людини, злитих з бактерійною лужною фосфатазою. Науково-практична конференція з міжнародною участю Інноваційні напрями в генетичній та регенеративній медицині, Київ, 2017 р. *Клітинна та органна трансплантологія*. Т. 5, № 2. С. 246.

4. **Usenko M.**, Gorbatiuk O., Filipenkova N., Okunev O., Kordium V. Production and characterization of single-chain variable fragment antibodies against interferon beta-1b and interleukin-10. Materials of XI annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Kyiv, 2017. *Biopolym. Cell*. Vol. 33, N 3. P. 236.

3.7. Отримання рекомбінантного аналога протеїнкінази ASK1 людини

Поряд з IL-7 однією з валідованих молекулярних мішеней у канцерогенезі, а також у патогенезі таких аутоімунних хвороб, як розсіяний склероз та ревматоїдний артрит, є протеїнкіназа ASK1 (апоптоз сигнал-регулююча кіназа 1). Вона активує сигнальні шляхи клітини у відповідь на різні типи стресу. Створення продуцента рекомбінантного аналога протеїнкінази дозволяє отримати білок для проведення пошук низькомолекулярних інгібіторів ASK1.

Каталітичний домен ASK1 (амінокислотні залишки 649–946) ампліфікували з кДНК та клонували в експресійний вектор *pET-42a*. Злитий білок ASK1 містив N-кінцеву послідовність GST та C-кінцевий гістидиновий таг. Синтез ASK1 індукували за допомогою IPTG та методу аутоіндукції. Молекулярна маса отриманого протеїну відповідала передбаченій (60 кДа). Рівень продукції рекомбінантного аналога ASK1 становив приблизно 0,47 г/л культури *E. coli* за використання протоколу аутоіндукції та 0,3 г/л після індукції IPTG.

З використанням аутоіндукції було отримано більше цільового злитого білка, але значно менше розчинної форми, ніж за індукцією IPTG. Злитий білок ASK1-GST, отриманий за протоколом аутоіндукції, в основному накопичувався у формі бактерійних тілець включення. Експресія злитого білка ASK1-GST за допомогою методу аутоіндукції потребує подальшої оптимізації для збільшення продукції протеїнів у розчинній формі (оптимізація складу поживного середовища і/або зниження температури культивування *E. coli*). Індукція за допомогою IPTG є кращим методом для продукції злитого протеїну ASK1-GST у розчинній формі. Порівняння рівнів експресії при індукції IPTG та аутоіндукції наведено в табл. 3.5.

Таблиця 3.5

Порівняльна характеристика експресії ASK1 за умов індукування синтезу ШТГ та за протоколом аутоіндукції та його очищення на металоафінному сорбенті

Характеристика	індукція ШТГ	аутоіндукція
Вихід цільового продукту (мг/л культури <i>E. coli</i>)	300	470
Рівень експресії цільового протеїну відносно тотальних протеїнів <i>E. coli</i> , %	27	34
Вихід ASK1 у розчинній формі (мг/л культури <i>E. coli</i>)	190	130
Кінцевий показник OD ₆₀₀ для бактеріальної культури після індукції	14,2	17,8
Вихід ASK1 після очистки із розчинної фракції протеїнів <i>E. coli</i> на колонці Ni-NTA, %	92	92
Вихід ASK1 після очистки на колонці HiPrep 26/10 Desalting column, %	84	83
Чистота, %	94	94
Вихід ASK1 у розчинній формі, %	49	21
Вихід ASK1 у розчинній формі, (мг/л культури <i>E. coli</i>)	147	99

Для отримання протеїна з високим ступенем чистоти використовували швидкий і ефективний метод металоафінної хроматографії (рис. 3.24).

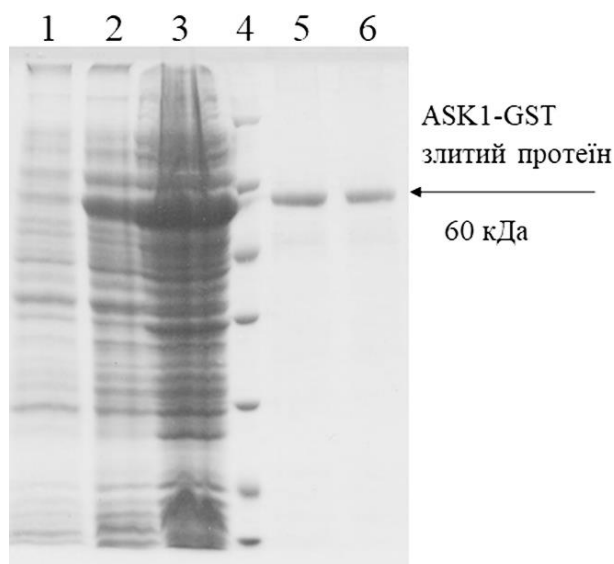


Рисунок 3.24. Електрофореграма лізатів *E. coli* після індукування синтезу рекомбінантного аналога протеїнкінази ASK1 та його хроматографічного очищення. 1 – тотальний лізат клітин *E. coli* без індукції експресії, 2 – тотальні протеїни клітин *E. coli*, після індукування синтезу ASK1 0,5 мМ IPTG, 3 – тотальні протеїни клітин *E. coli*, після індукування синтезу ASK1 за протоколом автоіндукції, 4 – молекулярні маркери (116.0, 60.2, 45.0, 35.0, 25.0, 18.4, 14.4 кДа), 5, 6 – ASK1 після очищення на Ni-NTA агарозі

Ензиматичну активність рекомбінантної протеїнкінази ASK1 визначали за допомогою люциферазного методу – Kinase-Glo® Plus Luminescent Kinase Assay. Цей метод є непрямим методом детекції протеїнкіназної активності, що ґрунтується на кількісному визначенні АТФ, що залишається в розчині після кіназної реакції. Люмінесцентний сигнал люциферази прямо-пропорційно залежить від кількості АТФ у середовищі і обернено-пропорційно від активності протеїнкінази.

Графіки ензиматичної активності для каталітичних субодиниць ASK1, що були отримані різними методами індукції синтезу – за використання IPTG та автоіндукції наведено на рис. 3.25. Оптимальна кількість протеїнкінази для використання в експериментах зі скринінгу інгібувальної активності сполук знаходиться в лінійному діапазоні титрувальної кривої.

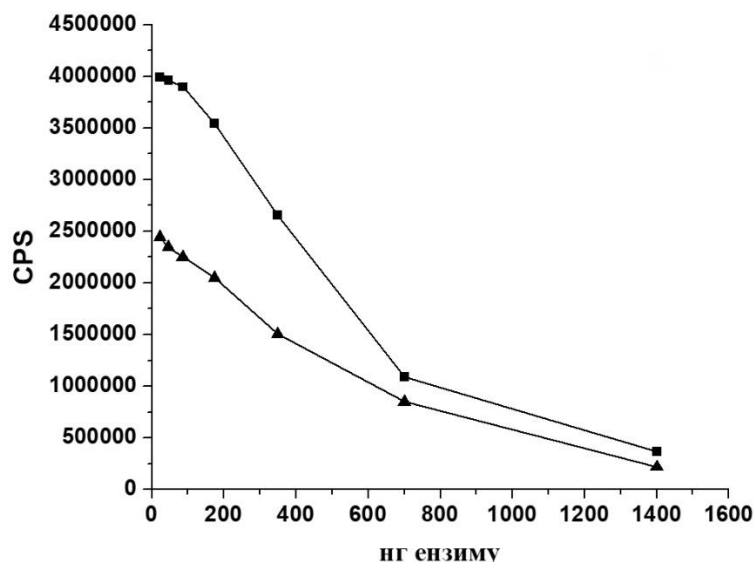


Рис. 3.25. Графіки активності рекомбінантної каталітичної субодиниці ASK1, що була отримана за використання IPTG індукції (■) та протоколу аутоіндукції (▲)

Таким чином, для дослідження інгібувальної активності сполук оптимальна концентрація рекомбінантної протеїнкінази ASK1 знаходиться в діапазоні від 200 до 700 нг.

Застосування індукції ІПТГ та аутоіндукції для отримання ASK1 є вдалою альтернативою кошовній бакуловірусній системі синтезу білків. Наш підхід забезпечує стабільне отримання достатньої кількості рекомбінантної ASK1 для пошуку її інгібіторів.

Результати досліджень, представлені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:

1. Volynets G.P., Gorbatiuk O.B, Kukharenko O.P., **Usenko M.O.**, Yarmoluk S.M. Production of recombinant human apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 2016. Vol.126. P. 89-92. DOI: 10.1016/j.pep.2016.05.016.

2. Gorbatiuk O., Volynets G., **Usenko M.**, Yarmoluk S. Efficient method for the obtaining of Recombinant Human Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)

in *Escherichia coli*. 45th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separation and Related Techniques, Prague, Czech Republic, 2017. Abs. book. P. 113.

3.8. Персоналізована відповідь мононуклеарних клітин периферичної крові людини (МНПК) на дію ІЛ-7

В даний час ІЛ-7 проходить ряд клінічних випробувань. Персональна характеристика імунних клітин із врахуванням сприйнятливості цитокіну та варіативності імунних реакцій серед людей може надати цінну прогностичну інформацію для практичного використання. На сьогоднішній день не проводилося системного вивчення індивідуальних відмінностей у реакції МНПК на ІЛ-7. Таким чином, метою цієї частини дослідження було оцінити *in vitro* персоналізовану реакцію МНПК на збільшення доз rhIL-7 та міжіндивідуальну мінливість реакцій клітин у здорових людей.

Ряд досліджень зосереджено на вивченні впливів агоністів на рецептори клітин. Для вимірювання виживання клітин, яке є результатом наслідків активації ІЛ-7R, часто використовуються функціональні аналізи клітин. Дане дослідження було проведене, щоб встановити, чи може індивідуальна чутливість МНПК до rhIL-7, виміряна як виживання стимульованих мітогеном МНПК *in vitro*, характеризувати індивідуальний функціональний статус ІЛ-7R у крові. Для дослідження варіативності реакцій МНПК серед здорових людей було перевірено невелику випадкову вибірку зразків клітин крові на здатність відповідати на ІЛ-7. У цьому дослідженні брали участь 18 здорових людей з кількістю лейкоцитів, що потрапляє в нормальний діапазон $(4,0-10,0) \times 10^6$ клітин/мл.

Для встановлення помітної міжіндивідуальної різниці були зроблені деякі модифікації стандартного біологічного аналізу ІЛ-7. Додаткові експерименти були розроблені для встановлення оптимальних умов для отримання стандартної сигмоїдної кривої, яка використовується для аналізу чутливості

клітин до ІЛ-7. Адже отримані дані по вимірюванню залежності клітинної відповіді на отриману концентрацію препарату не завжди відповідають вимогам щодо сигмоїдності кривої. Було встановлено, що діапазон доз ІЛ-7 в межах 62,5–6000 пг/мл був оптимальним для побудови однієї кривої залежності відповіді клітин на концентрацію ІЛ-7. Збільшення концентрації ІЛ-7 давало залежність, яка не відповідала S-подібній кривій.

Для оцінки ефекту ІЛ-7 була обрана двоетапна схема стимуляції МНПК. Були визначені оптимальні періоди між збором клітин та припиненням відповіді на ФГА, а також між введенням ІЛ-7 та МТТ-тестуванням. Згідно з літературними даними, оптимальні рівні відповіді Т-клітин на мітоген ФГА у МНПК дорослих були через 5 днів (оптимальні на 6-й день) [150]. Час впливу ФГА підбирали експериментально. Вплив ФГА припиняли на 3, 5 і 6 день з подальшою підготовкою клітин до обробки ІЛ-7. Використання ФГА-активованих МНПК, які культивували з ФГА протягом 5 днів, дозволило отримати кращі результати для побудови логістичної кривої. Час впливу ІЛ-7 також був підібраний експериментально. Для кожного зразка клітин збільшення життєздатності МНПК за присутності ІЛ-7 вимірювали через 72 години та 144 години експозиції з ІЛ-7. Ефект для МНПК в залежності від дози ІЛ-7 показаний на графіках двох експериментів (рис. 3.26). Значення EC_{50} для культури, яка витримувалась 144-години, становило $0,643 \pm 0,055$ нг/мл, в той час як для культури з часом витримки 72 години аналогічне значення було $0,943 \pm 0,117$ нг/мл для тих самих МНПК, що свідчить про те, що клітини стали більш чутливими до rhIL-7.

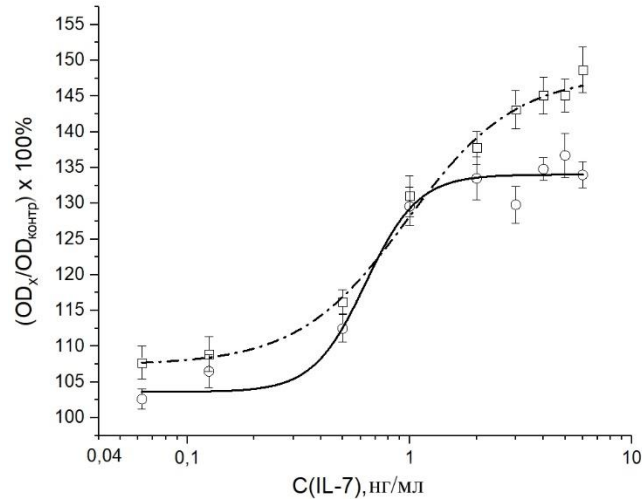


Рис. 3.26. Графік залежності впливу доз rhIL-7 на культивовані протягом 72 і 144 годин МНПК *in vitro*. Клітини стимулювали rhIL-7 у концентраціях 0,0625, 0,125, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 і 6 нг/мл. Наведені дані з кривими логістичної регресії логістичного аналізу щодо виживання клітин. Кожна точка представляє середнє значення $(OD_x/OD_{\text{контр}}) \times 100\% \pm$ стандартне відхилення (σ). Вісь x представлена як логарифмічна шкала

Так, як важливою є тривалість аналізу, а зміщення значення EC_{50} відносно невелике, було вирішено зупинитися на обробці клітин IL-7 протягом 72 год. Таким чином, цей аналіз дозволив оцінити міжіндивідуальну мінливість за чутливістю МНПК до IL-7.

Для кожного окремого зразка МНПК визначали життєздатність клітин та отримували криві реакції на IL-7. Всі графіки давали сигмоїдні криві при збільшенні концентрації rhIL-7. Для кожного зразка МНПК визначали концентрацію IL-7, яка призводить до 50% збільшення виживання клітин (EC_{50}), і вона знаходились у діапазоні 420–1540 пг/мл. Значення EC_{50} та максимальний відсоток збільшення життєздатності клітин наведені в таблиці 3.6.

Таблиця 3.6

Значення EC_{50} та максимальний відсоток збільшення життєздатності клітин для кожного зразка МНПК

№	$EC_{50} \pm \sigma$ (ng/ml)	$OD_{max}/OD_{контр}$ $\times 100\%$	№	$EC_{50} \pm \sigma$ (ng/ml)	$OD_{max}/OD_{контр}$ $\times 100\%$
1	1,343±0,22	125	10	0,735±0,096	123
2	1,108±0,123	127	11	0,642±0,071	135
3	1,337±0,125	139	12	0,943±0,117	149
4	1,54±0,2	179	13	0,506±0,106	126
5	0,42±0,09	122	14	0,507±0,123	122
6	1,06±0,10	194	15	1,029±0,21	129
7	1,028±0,213	125	16	1,457±0,163	142
8	0,414±0,17	128	17	0,767±0,042	121
9	0,767±0,089	118	18	1,067±0,073	141

Реакція МНПК на IL-7 для різних зразків була неоднорідною. Значення EC_{50} показали значний рівень міжіндивідуальної мінливості. Генотиповий коефіцієнт варіації CV_G становив 38%. Виходячи із значень EC_{50} різниця в чутливості до IL-7 серед осіб відрізнялась майже в 3 рази. Незважаючи на те, що було зафіксовано значну різницю чутливості МНПК до IL-7, кілька зразків МНПК мали наближені значення, що було продемонстровано через перекриття кривих залежності кількості живих клітин від концентрації IL-7. Крім того, були отримані співставні значення EC_{50} для зразків №1 та №3 (1,334 ± 0,22 пг/мл та 1,373 ± 0,125 пг/мл, відповідно), для №9 та №17 (767 ± 0,089 пг/мл та 767 ± 0,042 пг/мл), для №7 та №15 (1,028 ± 0,213 пг/мл та 1,029 ± 0,21 пг/мл). Варіабельність EC_{50} представлена на рис. 3.27 та в таблиці 3.6.

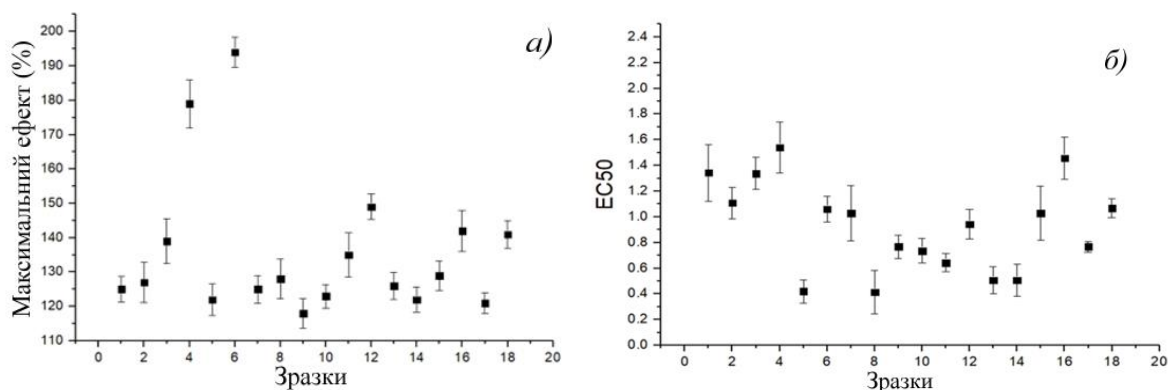


Рис. 3.27. Міжіндивідуальна варіабельність відповідей МНПК на rhIL-7 *in vitro* (n = 18). (a) Відсотки максимальних ефектів впливу rhIL-7 на МНПК ($CV_G=15\%$). (b) EC_{50} варіабельність ($CV_G=38\%$). Кожен символ відображає середнє значення \pm стандартне відхилення для окремого зразка МНПК

Відсоткове збільшення життєздатності клітин стало максимальним після 72 год інкубації клітин із IL-7 взятим у концентрації 3 нг/мл і більше. Кількість життєздатних МНПК внаслідок обробки IL-7 збільшилася з 18% до 94% у порівнянні з необробленими клітинами. Максимальний відсоток збільшення виживання клітин під час інкубації з IL-7 для більшості зразків МНПК відрізнявся не суттєво. CV_G дорівнював 15%. Гетерогенність величини реакції Т-клітин на IL-7 серед різних зразків була представлена як $(OD_{\max} / OD_{\text{контр}}) \times 100\%$, рис. 3.27 та в табл. 3.6.

На основі отриманих результатів можна припустити, що екзогенний IL-7 підтримує регуляцію апоптозу частини Т-клітин, активованих 5-денним культивуванням з ФГА. Ті самі клітини також можуть бути більш чутливими до низьких концентрацій IL-7.

Результати досліджень, представлені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:

1. Kovalchuk M.V., Ruban T.A., Usenko M.O., Kordium V.A. Personalized responsiveness of human PBMCs to the action of IL-7. *Biopolymers and Cell*. 2020. Vol. 36. N 4. P. 304–312. DOI: 10.7124/bc.000A33.

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

В даний час ІЛ-7 широко досліджується як терапевтичний засіб при різних імунних розладах. У зв'язку з цим, необхідними стають біомаркери, що мають відношення до реакцій імунних клітин на ІЛ-7, які можуть застосовуватись для моніторингу імунного статусу, індивідуальних фармакологічних реакцій на лікування ІЛ-7. В нашій роботі було проведено дослідження реакцій МНПК на ІЛ-7.

Продемонстровано, що високі дози ІЛ-7 *in vitro* стимулюють проліферацію Т-клітин, тоді як низькі дози підтримують гомеостатичне виживання Т-клітин. Концентрація rhIL-7 вище 6 нг/мл не покращувала виживання МНПК. А у деяких випадках виживання клітин при 5–6 нг/мл було гіршим, ніж при 4 нг/мл та нижче значеннях концентрації ІЛ-7. Це може бути пов'язано з тим, що тривале культивування Т-клітин при високих концентраціях ІЛ-7 призводить до інтерналізації ІЛ-7R на клітинах.

Існує значна неоднорідність імунних відповідей у людей, наразі досліджуються ступені їхньої варіації [151, 152]. Спроби оцінити міжіндивідуальну мінливість відповідей МНПК на ІЛ-7 показали, що відповіді, як правило, помітно різнились у різних осіб. Відповідно до значень EC_{50} , у здорових людей спостерігали суттєву різницю чутливості до ІЛ-7. Коефіцієнт варіації CV_G становив 38%. Висока міжіндивідуальна мінливість характерна і для інших параметрів імунної системи. Наприклад, коефіцієнти варіації CV_G для кількості лімфоцитів, еозинофілів та імуноглобулінів М становлять 35,3%, 76,4%, 47,3%, відповідно, дані наведено з бази даних біологічних варіацій www.westgard.com/biodatabase1.htm. Величина відповіді, виражена як відсоток збільшення життєздатності клітин, мала менші варіації між індивідами ($CV_G = 15\%$) і була більш доречною для практичного використання.

Отже, було продемонстровано перевагу оптимізованої схеми стимуляції для виявлення чутливості МНПК до rhIL-7. Було показано, що реакція на IL-7 відрізняється для МНПК від різних донорів. Дослідження показує, що індивідуальна реакція МНПК людини на IL-7 є цінною прогностичною інформацією про стан імунної системи. Ця інформація також буде корисною для подальшого широкомасштабного дослідження відповіді підгруп Т-клітин на проведення терапії на основі IL-7.

Подальша робота була сконцентрована на отриманні рекомбінантних аналогів IL7 людини та антитіл специфічних до цього цитокіну. Сучасні наукові дослідження важко уявити без застосування імунологічних підходів, головним і необхідним інструментом в яких є антитіла проти цільових антигенів. Антитіла, використовують для виявлення біомолекул і встановлення їх характеристик у фундаментальних дослідженнях, а також на практиці. Для очищення моноклональних антитіл застосовуються афінних сорбентів на основі білка А або білка G. Однак, у випадку поліклональних сироваток, відсоток цільових антитіл в яких може коливатися в широких межах, зазначеними методами не можливо виділити високоспецифічні антитіла. Перспективним є очищення антитіл на іммобілізованому, через послідовність білка партнера або афінної мітки, антигені. Наше дослідження було спрямовані на отримання білків для створення афінного сорбенту для очищення антитіл, специфічних до інтерлейкіну 7 людини.

Було отримано продуцент білка rhIL7-His, *E. coli* BL21(DE3) *pET24-IL7-His*. В клітинах, індукованих за протоколом аутоіндукції, білок масою 18,7 кДа накопичувався у формі бактерійних тілець включення. Тому було відпрацьовано такі методи ренатурації rhIL7-His, як діаліз, гель-фільтрація, ренатурація на колонці та ренатурація розведенням. Ефективність ренатурації перевіряли в порівняльному аналізі впливу комерційно доступного препарату rhIL-7 та ренатурованого rhIL-7 на моноклеарні клітини периферичної крові. Вплив rhIL-7 порівнювали за тією ефективною концентрацією препарату (EC₅₀), яка забезпечувала 50% збільшення життєдіяльності клітин у

порівнянні із контрольними клітинами, що не піддавали впливу ІЛ-7. Сигмоїдні криві дозо-залежного впливу інтерлейкіну 7 ренатурованого та контрольного комерційного препарату на життєздатність МНПК мали однакову амплітуду, що свідчить про наявність активності цитокіну в обох препаратах. Для досягнення однакового рівня виживання клітин, була необхідна доза ІЛ-7, ренатурованого гель-фільтрацією, в 9,6 разів більша за дозу комерційного аналога. Доза ІЛ-7, що піддавався діалізу, мала бути лише в 1,4 рази більша за дозу комерційного аналога. Хоча процес ренатурації ще потребує оптимізації, можна зробити висновок про перевагу діалізного методу. Поступове зниження концентрації гуанідин гідрохлориду, наявність пари окиснений/відновлений глутатіони та поступове зниження їх концентрації впродовж процесу діалізу, сприяють правильному укладанню дисульфідних зв'язків молекули. Наявність аргініну у концентрації 0,1 М дозволяла знизити агрегацію білка та підвищити його розчинність.

Також було отримано продуцент білка rhIL7-CBD, *E. coli* BL21(DE3) *pET24-IL7-CBD*. В результаті виконання роботи було створено злитий білок на основі інтерлейкіну 7 людини та целюлозозв'язуючого домену *Clostridium thermocellum* (rhIL7-CBD). В клітинах, індукованих за протоколом аутоіндукції, білок масою 38,2 кДа накопичувався у формі бактерійних тілець включення. Ренатурували rhIL7-CBD діалізом та плавним розведенням.

На основі отриманих білків було створено афінні сорбенти для очищення антитіл, специфічних до інтерлейкіну 7 людини. Антиген іммобілізували на сорбенті через послідовність білка-партнера або афінної мітки. Іммобілізація антигену через His-tag або CBD, у порівнянні з непрямою іммобілізацією на хімічно-модифікованих матрицях, дозволяє уникнути етапу хімічної модифікації матриці та антигену. His-tag та CBD забезпечують орієнтовану іммобілізацію біоліганда на матриці, так білок іммобілізований у функціонально активній формі. У випадку накопичення антигену у формі нерозчинних бактерійних тілець включення, антиген може бути ренатурований безпосередньо на колонці. У випадку «підтікання» ліганд може

бути легко вилучений шляхом пропускання елюату через металооафінний сорбент або целюлозу. Рекомбінантний антиген отримується за рахунок синтезу в гетерологічних системах і за необхідності сорбенти можуть бути легко регенеровані. Злиті білки на основі CBD мають високу афінність до різних типів целюлози (мікрокристалічної, фібрилярної, аморфної) та хітину. Целюлоза значно дешевша, ніж більшість комерційно доступних сорбентів, які використовуються в біотехнології. Очищені на іммобілізованому антигені антитіла демонструють найвищу специфічність і чутливість IgG, які можуть бути отримані із поліклональних сироваток. Завдяки високій ємності сорбенту, а також ефективності схем іммобілізації та елюювання специфічних поліклональних антитіл, з використанням попереднього очищення сироваткових імуноглобулінів на целюлозі із білком SPA-CBD, зазначений метод дозволяє одержувати антитіла високого ступеня чистоти у препаративній кількості. Так, були отримані антитіла з сироваток крові мишей та кролів до rhIL-7. Оскільки ці антиген-специфічні антитіла є поліклональними, вони можуть бути використані як для зв'язування антигену, так і його виявлення у сандвіч-методах імуноаналізу.

Було отримано продуцент білка rhIL7-VAPmut, *E. coli* BL21(DE3) pET24-IL7-VAPmut. Було отримано злитий білок масою 66,2 кДа на основі IL7 людини та бактерійної лужної фосфатази. Білок можна було виявити за умов індукції ПТГ при +37 °C, при цьому його концентрація була нижчою ніж у випадку аутоіндукції при тій самій температурі. В останньому випадку максимальний рівень накопичення цільового білка у формі бактерійних тілець включення становив близько 30 % від вмісту сумарних білків клітин *E. coli*. Було показано, що оптимальним варіантом ренатурації білка була ренатурація плавним розведенням, буфер містив аргінін окиснений/відновлений глутатіони та MgSO₄. Також було проведено визначення оптимальних умов функціонування VAPmut. В результаті імуноферментного аналізу було встановлено, що при використанні буферних систем на основі Трис або CAPS при значенні рН 9,5 – 10,0 спостерігалась найвища активність ферменту.

Біологічну активність VARmut у складі імунокон'югату було підтверджено методом дот-блот аналізу. Перевірку біологічної активності IL-7, у складі злитого білка, проводили в результаті зв'язуванням з мишиними поліклональними антитілами, специфічними до IL-7, та мишиними моноклональними антитілами ma124794 «Thermo Fisher Scientific». Рекомбінантний IL7-VARmut давав чіткий сигнал в обох випадках, що є свідченням специфічності реакції та підтвердженням біфункціональної активності rhIL7-VARmut.

Під час роботи з імунними комбінаторними бібліотеками кДНК варіабельних генів імуноглобулінів важливим етапом є їх скринінг, від ефективності якого залежить специфічність отриманих рекомбінантних антитіл. Застосування rhIL7-VARmut забезпечило селективне виділення цільових scFv, специфічних до IL7, та дозволило щонайменше втричі скоротити час проведення самого скринінгу, без застосування специфічних первинних і вторинних антитіл. Перспективним також є використання злитого білка rhIL7-VARmut для якісного та кількісного аналізу рецепторів до IL-7, що дозволить проводити моніторинг функціонального стану клітин імунної системи організму.

Зазвичай для виявлення імунних комплексів антиген-антитіло застосовують первинні антитіла, специфічні до антигену та вторинні антитіла, кон'юговані з маркерними молекулами для детекції отриманих імунних комплексів. Це збільшує час проведення скринінгу та підвищує його собівартість. Застосування rhIL7-VARmut дозволяє проводити виявлення імунних комплексів в один етап без застосування додаткових імунореагентів.

Отриманні злиті білки також є перспективними для виявлення розчинної форми рецептора sIL-7R α . Зміна співвідношення розчинної і мембрано-зв'язаної форм IL-7R α спостерігається при розсіяному склерозі, туберкульозі, дегенеративних захворюваннях, гострих та хронічних запальних процесах.

Однією з проблем отримання rhIL7 в бактерійних системах синтезу є модифікація N-кінця еукаріотичного білка формілметіоніном (fMet). Використання інтеїну робить можливим отримання білка з нативним N-кінцем

шляхом злиття цільового білка з С-кінцем інтеїну. Під час трансляції N-кінець інтеїна модифікується fMet, що видаляється разом з інтеїном при розщепленні. Так, було отримано продуцент злитого білка CBD-intein(his)-IL7, *E. coli* BL21(DE3) *pET24-CBD-intein(his)-IL7*. В результаті застосування протоколу аутоіндукції було отримано злитий білок молекулярною масою 59 кДа, що накопичувався у формі бактерійних тілець включення. Домен CBD дозволив іммобілізувати солюбілізований білок на целюлозі. Індукований після очистки білковий сплайсинг, з подальшим виділенням інтеїну на металоафінному сорбенті дозволив отримати чисту фракцію rhIL7. Такий метод є перспективним для отримання цільових білків з нативним N-кінцем.

Також перспективними для застосування в імунодіагностиці є рекомбінантні антитіла одержані злиттям одноланцюгових антитіл scFv з ферментами, флуоресцентними білками або афінними мітками. Створення та використання таких химерних молекул значно здешевлює проведення імунологічних досліджень порівняно з використанням комерційно доступних моноклональних антитіл, хімічно кон'югованих з ферментом/флуорофором. Тому було отримано продуцент білка scFv(IFN β 1b)-BAPmut, *E. coli* BL21(DE3) *pCANTAB-scFv(IFN β 1b)-BAPmut*. Білок масою 77 кДа отримано у функціонально активній формі, scFv секретуються у бактеріальну периплазму. У периплазмі формуються дисульфідні містки, які необхідні для підтримання нативної структури варіабельних доменів і проходження правильного фолдингу молекул scFv. Функціональну активність злитих антитіл перевірено методами дот-блот та імуноферментного аналізу. Отриманий плазмідний вектор *pCANTAB-scFv(IFN β 1b)-BAPmut* можна використовувати як основу для створення продуцентів scFv різної специфічності кон'югованих з лужною фосфатазою. Для цього потрібно замінити ДНК-послідовність scFv по сайтах рестрикції *NotI* та *SfiI*.

Рекомбінантні білки мають широкий спектр застосувань. Зокрема отримання рекомбінантного аналога протеїнкінази ASK1 людини дозволяє проведення пошуку низькомолекулярних інгібіторів цього ферменту. Він є

валідованою молекулярною мішенню у канцерогенезі, а також у патогенезі таких аутоімунних хвороб, як розсіяний склероз та ревматоїдний артрит. Тому було отримано продуцент білка ASK1, *E. coli* Rosetta *pET42a-ASK1*. Білок масою 60 кДа було отримано за допомогою індукції синтезу додаванням IPTG та за протоколом аутоіндукції. З використанням протоколу аутоіндукції було отримано вищий вихід цільового злитого протеїну, але значно менше у розчинній формі, ніж за використання індукції IPTG. Була визначена оптимальна концентрація рекомбінантної протеїнкінази ASK1 для дослідження активності сполук інгібіторів кінази. Застосування бактерійної системи синтезу за умов індукції IPTG та аутоіндукції для отримання ASK1 є вдалою альтернативою кошовній бакуловірусній системі синтезу рекомбінантних білків. Запропонований підхід забезпечує стабільне отримання достатньої кількості рекомбінантної ASK1 для проведення дослідження спрямованих на пошук нових перспективних інгібіторів цієї кінази.

Цитокіни IL7, IFN-beta та протеїнкіназа ASK1 досліджуються при багатьох патологічних станах організму (розсіяний склероз, аутоімунні захворювання, тощо). Отримані в результаті виконання роботи рекомбінантні білки на їх основі та високоспецифічні антитіла є перспективними кандидатами для подальшої розробки шляхів комплексної діагностики та корекції зазначених патологій.

ВИСНОВКИ

У результаті виконання дисертаційної роботи створено біфункціональні генно-інженерні кон'югати та підтверджено їх функціональну активність. Показано ефективність їхнього застосування для виявлення та очищення антитіл, а також для проведення імунодіагностичних досліджень.

1. Сконструйовано гени та штами-продуценти *E. coli* для отримання злитих рекомбінантних білків rhIL7-His та rhIL7-CBD. Оптимізовано методи їх виділення у розчинній функціонально-активній формі ренатурацією *in vitro*.

2. Злитий білок rhIL7-CBD, після іммобілізації на мікрокристалічній целюлозі CC31, та rhIL7-His, після іммобілізації на металоафінному сорбенті, було застосовано для отримання поліклональних антитіл, специфічних до інтерлейкіну 7 людини з чистотою понад 95 %.

3. Сконструйовано злитий білок rhIL7-VAPmut та забезпечено його отримання синтезом в клітинах *E. coli*. Встановлено можливість застосування rhIL7-VAPmut для скринінгу комбінаторної бібліотеки кДНК варіабельних генів імуноглобулінів.

4. Отримано злитий білок scFv(IFN β 1b)-VAPmut у біологічно-активній формі шляхом накопичення у периплазматичний простір клітин *E. coli*, встановлено можливість його застосування для виявлення інтерферону бета-1b людини. Плазмідний вектор *pCANTAB-scFv(IFN β 1b)-VAPmut* в подальшому може бути використаний як основа для отримання scFv різної специфічності кон'югованих з лужною фосфатазою.

5. Сконструйовано штам-продуцент *E. coli* для отримання рекомбінантного аналога протеїнкінази ASK1 людини, встановлено умови його біосинтезу, які забезпечили отримання препаративної кількості функціонально-активного ферменту для проведення подальшого скринінгу інгібіторів зазначеної кінази.

6. Проаналізовано вплив IL-7 на МНПК, показано, що спостерігаються значні варіації реакції на IL-7 для МНПК від різних донорів. Індивідуальна

реакція МНПК людини на ІЛ-7 може бути цінним прогностичним показником стану імунної системи для проведення подальшого широкомасштабного дослідження відповіді підгруп Т-клітин на терапію на основі ІЛ-7.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Hober S., Nord K., Linhult M. Protein A chromatography for antibody purification. *Journal of chromatography B*. 2007. Vol. 848. P. 40–47. Gottschalk U. *Process scale purification of antibodies* / Hoboken: Wiley & Sons. 2009. P. 430.
2. Darcy E., Leonard P., Fitzgerald J., Danaher M., Ma H., O'Kennedy R. Purification of Antibodies Using Affinity Chromatography. *Methods Mol Biol*. 2017. Vol. 1485. P. 305-318.
3. Barata, J.T., Durum, S.K. & Seddon, B. Flip the coin: IL-7 and IL-7R in health and disease. *Nat Immunol*. 2019. Vol. 20. P. 1584–1593.
4. Casey J.L., Coley A.M., Tilley L.M., Foley M. Green fluorescent antibodies: novel *in vitro* tools. *Protein Eng*. 2000. Vol. 13, N 6. P. 445–452.
5. Reader R.H., Workman R.G., Maddiso, B.C. et al. Advances in the Production and Batch Reformatting of Phage Antibody Libraries. *Mol Biotechnol*. 2019. Vol 61. P. 801–815.
6. Ahmad Z.A., Yeap S.K., Ali A.M., Ho W.Y., Alitheen N.B., Hamid M. scFv antibody: principles and clinical application. *Clin Dev Immunol*. 2012. P. 980250. doi: 10.1155/2012/980250.
7. Shukra A., Sridevi N., Chandran D., Maithal K. Production of recombinant antibodies using bacteriophages. *European Journal of Microbiology and Immunology*. 2014. Vol.4, N 2. P.91–98.
8. Pucca M.B., Bertolini T.B., Barbosa J.E., Galina S.V., Porto G.S. Therapeutic monoclonal antibodies: scFv patents as a marker of a new class of potential biopharmaceuticals. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011. Vol.47, N 1. P. 31–39.
9. Takenaka S, Fujisawa T, Ichijo H. Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) as a therapeutic target for neurological diseases. *Expert Opin Ther Targets*. 2020, Vol. 24, N 11. P. 1061–1064.
10. Takada K., Jameson S.C. Naive T cell homeostasis: from awareness of space to a sense of place. *Nat. Rev. Immunol*. 2009. Vol. 9. P. 823–832.

11. Dias S., Silva H. Jr., Cumano A., Vieira P. Interleukin-7 is necessary to maintain the B cell potential in common lymphoid progenitors. *J Exp Med.* 2005. Vol. 201, N 6. P. 971–979.
12. Slyvka A.V., Okunev O.V. Molecular mechanisms of versatile biological activity of interleukin-7. *Biopolym. Cell.* 2014. Vol. 30, N 5. P. 349-357.
13. Corfe S.A., Paige C.J. The many roles of IL-7 in B cell development; Mediator of survival, proliferation and differentiation. *Seminars in Immunology.* 2012. Vol. 24. P. 198–208.
14. Namen A.E., Lupton S., Hjerrild K., et al. Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7. *Nature.* 1988. Vol. 333, N 6173. P. 571–573.
15. Rochman Y., Spolski R., Leonard W.J. New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. *Nature Reviews Immunology.* 2009. Vol. 9, N 7. P. 480–490.
16. Kroemer R.T., Doughty S.W., Robinson A.J., Richards W.G. Prediction of the three-dimensional structure of human interleukin-7 by homology modeling. *Protein Eng.* 1996. Vol. 9, N 6. P. 493–498.
17. Costello R., Imbert J., Olive D. Interleukin-7, a major T-lymphocyte cytokine. *Eur Cytokine Netw.* 1993. Vol. 4, N 4. P. 253–262.
18. Moors M., Vudattu N., Abel J. *et al.* Interleukin-7 (IL-7) and IL-7 splice variants affect differentiation of human neural progenitor cells. *Genes Immun* 2010. Vol. 11. P. 11–20.
19. Bertolino E., Reddy K., Medina K.L., Parganas E., Ihle J., Singh H. Regulation of interleukin 7-dependent immunoglobulin heavy-chain variable gene rearrangements by transcription factor STAT5. *Nat Immunol.* 2005. Vol. 6, N 8. P. 836–843.
20. Churchman S.M., El-Jawhari J.J., Burska A.N., Parmar R., Goëb V., *et al.* Modulation of peripheral T-cell function by interleukin-7 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2014. Vol. 16, N 6. P. 511–524.

21. Kondrack R.M., Harbertson J., Tan J.T., McBreen M.E., Surh C.D., Bradley L.M. Interleukin 7 Regulates the Survival and Generation of Memory CD4 Cells. *J Exp Med.* 2003. Vol. 198, N 12. P. 1797–1806.
22. Alves N.L., Richard-Le Goff O., Huntington N.D., Sousa A.P., Ribeiro V.S., *et al.* Characterization of the thymic IL-7 niche *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009. Vol. 106, N 5. P. 1512–1517.
23. Willems L., Li S., Rutgeerts O., Lenaerts C., Waer M., Billiau A.D. IL-7 is required for the development of the intrinsic function of marginal zone B cells and the marginal zone microenvironment. *J Immunol.* 2011. Vol. 187, N 7. P. 3587–3594.
24. Vogt T.K., Link A., Perrin J., Finke D., Luther S.A. Novel function for interleukin-7 in dendritic cell development. *Blood.* 2009. Vol. 113, N 17. P. 3961–3968.
25. Boesteanu A., Silva A.D., Nakajima H., Leonard W.J., Peschon J.J., Joyce S. Distinct roles for signals relayed through the common cytokine receptor gamma chain and interleukin 7 receptor alpha chain in natural T cell development. *J Exp Med.* 1997. Vol. 186, N 2. P. 331–336.
26. Onder L., Narang P., Scandella E., *et al.* IL-7-producing stromal cells are critical for lymph node remodeling. *Blood.* 2012. Vol. 120, N 24. P. 4675–4683.
27. Coles M.C., Veiga-Fernandes H., Foster K.E., Norton T., Pagakis S.N., Seddon B., Kioussis D. Role of T and NK cells and IL7/IL7r interactions during neonatal maturation of lymph nodes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006. Vol. 103, N 36. P. 13457–13462.
28. Mazzucchelli R.I., Warming S., Lawrence S.M., *et al.* Visualization and identification of IL-7 producing cells in reporter mice. *PLoS One.* 2009. Vol. 4, N 11. e7637. doi:10.1371/journal.pone.0007637.
29. Kim G.Y., Hong C., Park J.H. Seeing is believing: illuminating the source of *in vivo* interleukin-7. *Immune Netw.* 2011. Vol. 11, N 1. P. 1–10. doi: 10.4110/in.2011.11.1.1.

30. Park J., Waickman A. T., Reynolds J., Castro M., Molina-París C. IL7 receptor signaling in T cells: A mathematical modeling perspective. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*. 2019. e1447. P. 25. doi:10.1002/wsbm.1447.
31. Banwell C.M., Partington K.M., Jenkinson E.J., Anderson G. Studies on the role of IL-7 presentation by mesenchymal fibroblasts during early thymocyte development. *Eur J Immunol*. 2000. Vol. 30, N 8. P. 2125–2129.
32. Kim A.R., Park J., Kim J.H., Kwak J.-E., Cho Y., Lee H., Jeong M., Park S.-H., Shin E.-C.. Herpes Zoster DNA Vaccines with IL-7 and IL-33 Molecular Adjuvants Elicit Protective T Cell Immunity. *Immune Netw*. 2018. Vol. 18, N 5. P. e38. doi: 10.4110/in.2018.18.e38.
33. Nam H.J., Song M.Y., Choi D.H., Yang S.H., Jin H.T., Sung Y.C. Marked enhancement of antigen-specific T-cell responses by IL-7-fused nonlytic, but not lytic, Fc as a genetic adjuvant. *Eur. J. Immunol*. 2010. Vol. 40, N 2. P. 351–358.
34. McElroy C.A., Dohm J.A., Walsh S.T.R. Structural and Biophysical Studies of the Human IL-7/IL-7R α Complex. *Structure*. 2009. Vol.17. N 1. P. 54–65.
35. Lundström W., Highfill S., Walsh S.T., Beq S., Morse E., Kockum I., *et al.* Soluble IL7R α potentiates IL-7 bioactivity and promotes autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013. Vol. 110, N 19. P. E1761–1770. doi: 10.1073/pnas.1222303110.
36. Janot-Sardet C., Assouline B., Cheynier R., Morre M., Beq S. A validated assay to measure soluble IL-7 receptor shows minimal impact of IL-7 treatment. *J Immunol Methods*. 2010. Vol. 353, N 1-2. P. 115–123.
37. Rose T., Lambotte O., Pallier C., Delfraissy J.F., Colle J.H. Identification and biochemical characterization of human plasma soluble IL-7R: lower concentrations in HIV-1-infected patients. *J Immunol*. 2009. Vol. 182, N 12. P. 7389–7397.

38. Gao J., Zhao L., Wan Y.Y., Zhu B.. Mechanism of Action of IL-7 and Its Potential Applications and Limitations in Cancer Immunotherapy. *Int J Mol Sci*. 2015. Vol. 16, N 5. P. 10267–10280.
39. Mazzucchelli R., Durum S.K. Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nat Rev Immunol*. 2007. Vol. 7. P. 144–154.
40. Vudattu N.K., Kuhlmann-Berenzon S., Khademi M., Seyfert V., Olsson T., Maeurer M.J. Increased Numbers of IL-7 Receptor Molecules on CD4⁺CD25[–]CD107a⁺ T-Cells in Patients with Autoimmune Diseases Affecting the Central Nervous System. *PLoS ONE*. 2009. Vol. 4, N 8. P. e6534. doi:10.1371/journal.pone.0006534.
41. Hengires C.M., Rino J., Nibbs R.J., Graham G.J., Barata J.T. IL-7 induces rapid clathrin-mediated internalization and JAK3-dependent degradation of IL-7R α in T cells. *Blood*. 2010. Vol. 115, N 16. P. 3269–3277.
42. Faller E.M., Ghazawi F.M., Cavar M., MacPherson P.A. IL-7 induces clathrin mediated endocytosis of CD127 and subsequent degradation by the proteasome in primary human CD8 T cells. *Immunol. Cell Biol*. 2016. Vol. 94. P. 196–207.
43. Kang J., Coles M. IL-7: the global builder of the innate lymphoid network and beyond, one niche at a time. *Semin Immunol*. 2012. Vol. 24, N 3. P. 190–197.
44. Nguyen V., Mendelsohn A., Larrick J.W. Interleukin-7 and Immunosenescence. *Journal of Immunology Research*. 2017, Art. N 4807853. P. 1-17. doi: 10.1155/2017/4807853.
45. Sad, H., Sarin A. Reactive oxygen species regulate quiescent T-cell apoptosis via the BH3-only proapoptotic protein BIM. *Cell Death Differ*. 2004. Vol. 11 P.416–423.
46. Zhang N., Hartig H., Dzhagalov I., Draper D., He Y.W. The role of apoptosis in the development and function of T lymphocytes. *Cell Res*. 2005. Vol. 15. P. 749–769.

47. Jiang Q., Li W.Q., Hofmeister R.R., et al. Distinct regions of the interleukin-7 receptor regulate different Bcl2 family members. *Mol Cell Biol.* 2004. Vol. 24, N 14. P. 6501-6513.
48. Niu N., Qin X. New insights into IL-7 signaling pathways during early and late T cell development. *Cellular & Molecular Immunology.* 2013. Vol. 10, N 3. P. 187–189.
49. Palmer M.J., Mahajan V.S., Trajman L.C., Irvine D.J., Lauffenburger D.A., Chen J. Interleukin-7 Receptor Signaling Network: An Integrated Systems Perspective. *Cellular & Molecular Immunology.* 2008. Vol. 5, N 2. P. 79–89.
50. Fujita N., Sato S., Katayama K., Tsuruo T. Akt-dependent phosphorylation of p27kip1 promotes binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization. *J. Biol. Chem.* 2002, Vol. 277. P. 28706–28713.
51. Zhang X., Tang N., Hadden T. J., Rishi A.K. Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Molecular Cell Research.* 2011. Vol. 1813, N 11. P. 1978–1986.
52. Fleming H.E., Paige C.J. Pre-B cell receptor signaling mediates selective response to IL-7 at the pro-B to pre-B cell transition via an ERK/MAP kinase-dependent pathway. *Immunity.* 2001. Vol. 15, N 4. P. 521–31.
53. Baracho G.V., Miletic A.V., Omori S.A., Cato M.H., Rickert R.C. Emergence of the PI3-kinase pathway as a central modulator of normal and aberrant B cell differentiation. *Curr Opin Immunol.* 2011. Vol. 23, N 2. P. 178–183.
54. Yasuda T., Sanjo H., Pages G., et al. Erk kinases link pre-B cell receptor signaling to transcriptional events required for early B cell expansion. *Immunity.* 2008. Vol. 28, N 4. P. 499–508.
55. Lundström W., Fewke N.M., Mackall C.L. IL-7 in human health and disease. *Seminars in immunology.* 2012. Vol. 24. P. 218–224. doi: 10.1016/j.smim.2012.02.005.
56. Haas J., Korporal M., Schwarz A., Balint B., Wildemann B. The interleukin-7 receptor α chain contributes to altered homeostasis of regulatory T

cells in multiple sclerosis. *Eur. J. Immunol.* 2011. Vol. 41. P. 845–853. doi: 10.1002/eji.201041139

57. Taheri M., Sayad A. Investigating the exon 6 sequence changes of interleukin 7 receptor A (IL7RA) gene in patients with re-lapsing-remitting multiple sclerosis. *Hum. Antibodies.* 2018. Vol. 26. P. 43–48. doi: 10.3233/HAB-170320.

58. Lundström W., Hermanrud C., Sjöstrand M., Brauner S., WahrenHerlenius M., *et al.* Interferon beta treatment of multiple sclerosis increases serum interleukin-7. *Multiple Sclerosis Journal.* 2014. Vol. 20. P. 1727–1736.

59. Hartling H.J., Ryder L.P., Ullum H., Ødum N., Nielsen S.D. Gene variation in IL-7 receptor (IL-7R) α affects IL-7R response in CD4⁺ T cells in HIV-infected individuals. *Sci. reports.* 2017. Vol. 7. P. 42036 (1–8). doi: 10.1038/srep42036.

60. Habibi M., Kmiecik M., Graham L., Morales J.K., Bear H.D., Manjili M.H. Radiofrequency thermal ablation of breast tumors combined with intralesional administration of IL-7 and IL-15 augments anti-tumor immune responses and inhibits tumor development and metastasis. *Breast Cancer Res. Treat.* 2009. Vol. 114. P. 423–431.

61. Le H.K., Graham L., Miller C.H., Kmiecik M., Manjili M.H., Bear H.D. Incubation of antigen-sensitized T lymphocytes activated with bryostatin 1 + ionomycin in IL-7 + IL-15 increases yield of cells capable of inducing regression of melanoma metastases compared to culture in IL-2. *Cancer Immunol. Immunother.* 2009. Vol. 58. P. 1565–1576.

62. Cha E., Graham L., Manjili M.H., Bear H.D. IL-7 + IL-15 are superior to IL-2 for the ex vivo expansion of 4T1 mammary carcinoma-specific T cells with greater efficacy against tumors in vivo. *Breast Cancer Res. Treat.* 2010. Vol. 122. P. 359–369.

63. Miller P.W., Sharma S., Stolina M., Butterfield L.H., Luo J., Lin Y. *et al.* Intratumoral administration of adenoviral interleukin 7 gene-modified dendritic cells augments specific antitumor immunity and achieves tumor eradication. *Hum. Gene Ther.* 2000. Vol. 11. P. 53–65.

64. Schroten C., Scheffer R., Boon L., de Ridder C.M., Bangma C.H., Kraaij R. Tumor protection by IL-7 secreting whole cell vaccine is merely mediated by NK1.1-positive cells. *J. Immunother.* 2012. Vol. 35. P. 125–130.
65. Schroten-Loef C., de Ridder C.M., Reneman S., Crezee M., Dalglish A., Todryk S.M., Bangma C.H., Kraaij R. A prostate cancer vaccine comprising whole cells secreting IL-7, effective against subcutaneous challenge, requires local GM-CSF for intra-prostatic efficacy. *Cancer Immunol. Immunother.* 2009. Vol. 58. P. 373–381.
66. Sportes C., Babb R.R., Krumlauf M.C., Hakim F.T., Steinberg S.M., Chow C.K., et al. Phase I study of recombinant human interleukin-7 administration in subjects with refractory malignancy. *Clin. Cancer Res.* 2010. Vol. 16. P. 727–735.
67. Kim J.-H. et al. Abstract 4991: Hyleukin-7, the Fc-fused interleukin-7, generates anti-tumor activity by modulating both adaptive and innate immune cells in the tumor microenvironment. *Cancer Res.* 2019. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2019-4991>.
68. Atezolizumab and CYT107 in Treating Participants With Locally Advanced, Inoperable, or Metastatic Urothelial Carcinoma. National Cancer Institute. 2018–2021. URL: <https://ichgcp.net/ru/clinical-trials-registry/NCT03513952>.
69. Recombinant Human Interleukin-7 (CYT107) to Promote T-Cell Recovery After Cord Blood Transplantation. M.D. Anderson Cancer Center. 2018–2023. URL: <https://ichgcp.net/clinical-trials-registry/NCT03600896>.
70. Interleukin-7 to Improve Clinical Outcomes in Lymphopenic Patients With COVID-19 Infection (ILIAD-7-US-I). Revimmune. 2020–2021. URL: <https://ichgcp.net/clinical-trials-registry/NCT04442178>.
71. Interleukin-7 (CYT107) to Improve Clinical Outcomes in Lymphopenic Patients With COVID-19 Infection UK Cohort. Revimmune, Amarex Clinical Research. 2020–2021. URL: <https://ichgcp.net/clinical-trials-registry/NCT04379076>.

72. Francois B., Jeannet R., Daix T., Walton A.H., Shotwell M.S., Unsinger J., *et al.* Interleukin-7 restores lymphocytes in septic shock: the IRIS-7 randomized clinical trial. *JCI Insight*. 2018. Vol. 3, N 5. P. 1–18, e98960. doi: 10.1172/jci.insight.98960.
73. Monneret G., de Marignan D., Coudereau R. *et al.* Immune monitoring of interleukin-7 compassionate use in a critically ill COVID-19 patient. *Cell Mol Immunol*. 2020. Vol. 17. P. 1001–1003.
74. Laterre P.F., François B., Collienne C., Hantson P., Jeannet R., *et al.* Association of Interleukin 7 Immunotherapy With Lymphocyte Counts Among Patients With Severe Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *JAMA Netw Open*. 2020. Vol. 3, N 7. P. e2016485. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2020.16485.
75. Burska A., Boissinot M., Ponchel F. Cytokines as Biomarkers in Rheumatoid Arthritis. *Mediators of Inflammation*. 2014. Art. N 545493, P. 1–24. doi: 10.1155/2014/545493.
76. Campbell D.J., Debes G.F., Johnston B., Wilson E., Butcher, E.C. Targeting T cell responses by selective chemokine receptor expression. *Semin. Immunol*. 2003. Vol 15. P. 277–286.
77. Sathaliyawala T., Kubota M., Yudanin N., Turner D., Camp P., Thome J.C., *et al.* Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T cell subsets. *Immunity*. 2013. Vol. 38, N 1. P. 187–197.
78. Churchman S.M., El-Jawhari J.J., Burska A.N., Parmar R., Goëb V., *et al.* Modulation of peripheral T-cell function by interleukin-7 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2014. Vol. 16, N 6. P. 511–524.
79. Hassan J., Reen D.J. Human Recent Thymic Emigrants – Identification, Expansion, And Survival Characteristics. *Journal Immunol*. 2001. Vol. 167, N 4. P. 1970–1976.
80. Cote S., Matte J., Sad S., Angel J.B., Crawley AM. Complexed soluble IL-7 receptor α and IL-7 increase IL-7-mediated proliferation and viability of CD8+ T-cells in vitro. *Cell Immunol*. 2015. Vol. 293, N 2. P.122–125.

81. Plosker G.L. Interferon- β -1b: a review of its use in multiple sclerosis. *CNS Drugs*. 2011. Vol. 25, N 1. P. 67–88.
82. Madsen C. The innovative development in interferon beta treatments of relapsing-remitting multiple sclerosis. *Brain Behav*. 2017. Vol. 7, N 6. P. e00696. doi: 10.1002/brb3.696.
83. Biogen Idec. Avonex (recombinant interferon beta-1a solution for injection): summary of product characteristics. URL: <https://www.medicines.org.uk/emc/product/886/smpc>
84. Bayer HealthCare – Bayer Schering Pharma. Betaferon (recombinant interferon beta-1b powder and solvent for solution for injection): summary of product characteristics. URL: <http://www.medicines.org.uk/EMC/medicine/1809/SPC/Betaferon>.
85. Runkel L., Meier W., Pepinsky R.B., Karpusas M., Whitty A., et al. Structural and functional differences between glycosylated and non-glycosylated forms of human interferon-beta (IFN-beta). *Pharm Res*. 1998. Vol. 15, N 4. P. 641–649.
86. Ivashkiv L.B., Donlin L.T. Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol*. 2014. Vol. 14, N 1. P. 36–49.
87. Li Y., Srivastava K.K., Plataniias L.C. Mechanisms of type I interferon signaling in normal and malignant cells. *Arch Immunol Ther Exp*. 2004. V. 52, N 3. P. 156–163.
88. Hojati Z., Kay M., Dehghanian F. Mechanism of Action of Interferon Beta in Treatment of Multiple Sclerosis. In: Multiple Sclerosis. Ed.: Minagar A. Academic Press, 2016. P. 365–392.
89. Samuel C.E. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev*. 2001. Vol. 14, N 4. P. 778–809.
90. David M., Chen H.E., Goelz S., Larner A.C., Neel B.G. Differential regulation of the alpha/beta interferon-stimulated Jak/Stat pathway by the SH2 domain-containing tyrosine phosphatase SHPTP1. *Mol Cell Biol*. 1995. Vol. 15, N 12. P. 7050–7058.

91. Markovics A., Toth D.M., Glant T.T. et al. Regulation of autoimmune arthritis by the SHP-1 tyrosine phosphatase. *Arthritis Res Ther.* 2020. Vol. 22, N 160. P. 1–14. doi: 10.1186/s13075-020-02250-8.
92. Du Z., Wei L., Murti A., Pfeffer S.R., Fan M., et al. Non-conventional signal transduction by type 1 interferons: the NF-kappaB pathway. *J Cell Biochem.* 2007. Vol. 102, N 5. P. 1087–1094.
93. Choubey D., Moudgil K.D. Interferons in autoimmune and inflammatory diseases: regulation and roles. *J Interferon Cytokine Res.* 2011. Vol. 31, N 12. P. 857–865.
94. Kay M., Hojati Z., Dehghanian F. The molecular study of IFN β pleiotropic roles in MS treatment. *Iran J Neurol.* 2013. V. 12, N 4. P. 149–156.
95. Feng X., Bao R., Li L., Deisenhammer F., Arnason B.G.W., Reder A.T. Interferon- β corrects massive gene dysregulation in multiple sclerosis: Short-term and long-term effects on immune regulation and neuroprotection. *EBioMedicine.* 2019. V. 49. P. 269–283.
96. Guarda G., Braun M., Staehli F., Tardivel A., Mattmann C., et al. Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation. *Immunity.* 2011. Vol. 4, N. 2. P. 213–223.
97. Bazzoni F., Tamassia N., Rossato M., Cassatella MA. Understanding the molecular mechanisms of the multifaceted IL-10-mediated anti-inflammatory response: lessons from neutrophils. *Eur J Immunol.* 2010. Vol. 40, N 9. P. 2360–2366.
98. Deisenhammer F. Neutralizing antibodies to interferon-beta and other immunological treatments for multiple sclerosis: prevalence and impact on outcomes. *CNS Drugs.* 2009. Vol. 23, N 5. P. 379-396.
99. Goodin D.S., Frohman E.M., Hurwitz B., et al. Neutralizing antibodies to interferon beta: assessment of their clinical and radiographic impact: an evidence report. Report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology.* 2007. Vol. 68, N 13. P. 977–984.

100. McCormack P.L., Scott L.J. Interferon-beta-1b: a review of its use in relapsing-remitting and secondary progressive multiple sclerosis. *CNS Drugs*. 2004. Vol.18, N 8. P. 521–546.
101. European Study Group on Interferon beta-1b in Secondary Progressive MS. Placebo-controlled multicentre randomised trial of interferon beta-1b in treatment of secondary progressive multiple sclerosis. *Lancet*. 1998. Vol. 352. P. 1491–1497.
102. Kappos L., Polman C.H., Freedman M.S., *et al.* Treatment with interferon beta-1b delays conversion to clinically definite and McDonald MS in patients with clinically isolated syndromes. *Neurology*. 2006. Vol. 67, N 7. P. 1242–1249.
103. Ryu C.H., Park K.Y., Hou Y., Jeong C.H., Kim S.M., Jeun S.S. Gene therapy of multiple sclerosis using interferon β -secreting human bone marrow mesenchymal stem cells. *Biomed Res Int*. 2013. 696738. doi: 10.1155/2013/696738.
104. Noguchi T., Takeda K., Matsuzawa A., Saegusa K., Nakano H., *et al.* Recruitment of tumor necrosis factor receptor-associated factor family proteins to apoptosis signal-regulating kinase 1 signalosome is essential for oxidative stress-induced cell death. *J Biol Chem*. 2005 Vol. 280, N 44. P. 37033–37040. doi: 10.1074/jbc.M506771200.
105. Tobiume K., Matsuzawa A., Takahashi T., Nishitoh H., Morita K., *et al.* ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep*. 2001. Vol. 2, N 3. P. 222–228.
106. Chang L., Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*. 2001. Vol. 410, N 6824. P. 37–40.
107. Hayakawa T., Matsuzawa A., Noguchi T., Takeda K., Ichijo H. The ASK1-MAP kinase pathways in immune and stress responses. *Microbes Infect*. 2006. Vol. 8, N 4. P. 1098–1107.
108. Brancho D., Tanaka N., Jaeschke A., Ventura J.J., Kelkar N., *et al.* Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. *Genes Dev*. 2003. Vol. 17, N 16. P. 1969–1978.

109. Lamb J.A., Ventura J.J., Hess P., Flavell R.A., Davis R.J. JunD mediates survival signaling by the JNK signal transduction pathway. *Mol Cell*. 2003. Vol. 11, N 6. P. 1479–1489.
110. Lee J., Sun C., Zhou Y., Lee J., Gokalp D., Herrema H., Park S.W., Davis R.J., Ozcan U. p38 MAPK-mediated regulation of Xbp1s is crucial for glucose homeostasis. *Nat Med*. 2011. Vol. 17, N 10. P. 1251–1260.
111. Tomida T., Takekawa M., Saito H. Oscillation of p38 activity controls efficient pro-inflammatory gene expression. *Nat Commun*. 2015. Vol. 6, 8350. P. 1–9. doi: 10.1038/ncomms9350.
112. Ventura J.J., Hübner A., Zhang C., Flavell R.A., Shokat K.M., Davis R.J. Chemical genetic analysis of the time course of signal transduction by JNK. *Mol Cell*. 2006. Vol. 21, N 5. P. 701–710.
113. Ichijo H., Nishida E., Irie K., ten Dijke P., Saitoh M., Moriguchi T., *et al*. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science*. 1997. Vol. 275, N 5296. P. 90–94.
114. Ogier J.M., Nayagam B.A., Lockhart P.J. ASK1 inhibition: a therapeutic strategy with multi-system benefits. *J Mol Med*. 2020. Vol. 98. P. 335–348.
115. Fra A., Yoboue E.D., Sitia R. Cysteines as Redox Molecular Switches and Targets of Disease. *Front Mol Neurosci*. 2017. Vol. 10. Art. N. 167. doi: 10.3389/fnmol.2017.00167.
116. Song J.J., Lee Y.J. Differential role of glutaredoxin and thioredoxin in metabolic oxidative stress-induced activation of apoptosis signal-regulating kinase 1. *Biochem J*. 2003. V. 373 (Pt 3). P. 845–853.
117. Liu Y, Min W. Thioredoxin promotes ASK1 ubiquitination and degradation to inhibit ASK1-mediated apoptosis in a redox activity-independent manner. *Circ Res*. 2002. V.90, N 12. P. 1259–1266.

118. Tobiume K., Saitoh M., Ichijo H. Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by the stress-induced activating phosphorylation of pre-formed oligomer. *J Cell Physiol.* 2002. V. 191, N 1. P. 95–104.
119. Kim H., Oh Y., Kim K. *et al.* Cyclophilin A regulates JNK/p38-MAPK signaling through its physical interaction with ASK1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015. Vol. 464, N 1. P. 112–117.
120. Shiizaki S., Naguro I., Ichijo H. Activation mechanisms of ASK1 in response to various stresses and its significance in intracellular signaling. *Adv Biol Regul.* 2013. Vol. 53, N 1. P. 135–144.
121. Iriyama T., Takeda K., Nakamura H. *et al.* ASK1 and ASK2 differentially regulate the counteracting roles of apoptosis and inflammation in tumorigenesis. *EMBO J.* 2009. Vol. 28. P. 843–853.
122. Hayakawa Y., Hirata Y., Nagakawa H., *et al.* Apoptosis signal-regulating kinase 1 and cyclin D1 compose a positive feedback loop contributing to tumor growth in gastric cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. Vol. 108. P. 780–785.
123. Hayakawa Y., Hirata Y., Kinoshita H., *et al.* Differential roles of ASK1 and TAK1 in *Helicobacter pylori*-induced cellular responses. *Infect. Immun.* 2013. Vol. 81. P. 4551–4560.
124. Kadowaki H., Nishitoh H., Urano F., Sadamitsu C., Matsuzawa A., *et al.* Amyloid beta induces neuronal cell death through ROS-mediated ASK1 activation. *Cell Death Differ.* 2005. Vol. 12, N 1. P. 19–24. doi: 10.1038/sj.cdd.4401528.
125. Jawhar S., Trawicka A., Jenneckens C., Bayer T.A., Wirths O. Motor deficits, neuron loss, and reduced anxiety coinciding with axonal degeneration and intraneuronal A β aggregation in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2012. Vol. 33, N 1. P. 196.e29–40. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2010.05.027.
126. Guo X., Harada C., Namekata K. *et al.* Regulation of the severity of neuroinflammation and demyelination by TLR-ASK1-p38 pathway. *EMBO Mol. Med.* 2010. Vol. 2. P. 504–515.

127. Mnich S., Blanner P., Hu L. *et al.* Critical role for apoptosis signal-regulating kinase 1 in the development of inflammatory K/BxN serum-induced arthritis. *Int. Immunopharmacol.* 2010. Vol. 10. P. 1170–1176.
128. Azuchi Y., Kimura A., Guo X., *et al.* Valproic acid and ASK1 deficiency ameliorate optic neuritis and neurodegeneration in an animal model of multiple sclerosis. *Neurosci Lett.* 2017. Vol. 639. P. 82–87.
129. Zhao W., Beers D.R., Appel S.H. Immune-mediated mechanisms in the pathoprogession of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2013. Vol. 8, N 4. P. 888–899.
130. Holasek S.S., Wengenack T.M., Kandimalla K.K., Montano C., Gregor D.M., *et al.* Activation of the stress-activated MAP kinase, p38, but not JNK in cortical motor neurons during early presymptomatic stages of amyotrophic lateral sclerosis in transgenic mice. *Brain Res.* 2005. Vol. 1045, N 1–2. P.185–198.
131. Fujisawa T., Takahashi M., Tsukamoto Y., Yamaguchi N., Nakoji M., *et al.* The ASK1-specific inhibitors K811 and K812 prolong survival in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet.* 2016. Vol. 25, N 2. P. 245–253.
132. Rosenkranz S., Feldman J., McLaughlin V., Rischard F., White J., Ebrahimi R., *et al.* The ARROW study: a phase 2, prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study of selonsertib in subjects with pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J.* 2017. Vol. 50, Is. Sup.61. OA1983. doi: 10.1183/1393003.CONGRESS-2017.OA1983.
133. Chertow G.M., Pergola P.E., Chen F., Kirby B.J., Sundry J.S., Patel U.D., GS-US-223-1015 Investigators. Effects of Selonsertib in Patients with Diabetic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol.* 2019. Vol. 30, N 10. P. 1980–1990.
134. Younossi Z.M., Stepanova M., Lawitz E., Charlton M., Loomba R., *et al.* Improvement of hepatic fibrosis and patient-reported outcomes in non-alcoholic steatohepatitis treated with selonsertib. *Liver Int.* 2018. Vol. 38, N 10. P. 1849–1859.
135. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory Manual / Second edition. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989. Vol. 1, 2, 3. P. 1626.

136. Gilchuk P.V., Okunev O.V., Pavlova M.V., Irodov D.M., Gorbatiuk O.B. Obtaining of ScFv-CBD fusion protein and its application for affinity purification of recombinant human interferon $\alpha 2b$. *Ukr. Biochem. J.* 2006. Vol. 78, N 2. P. 52–61.

137. Gorbatiuk O.B., Okunev O.V., Nikolaev Yu.S., Svyatenko O.V., Kordium V.A. Construction, expression, functional characterization and practical application of fusion protein SPA-BAPmut. *Biopolym. Cell.* 2013. Vol. 29. P. 49–54.

138. Starokadomskyy P.L., Okunev O.V., Irodov D.M., Kordium V.A. Utilization of protein splicing for purification of human growth hormone. *Molecular biology.* 2008. Vol. 42. No. 6. P. 1085–1092.

139. Павлова М.В. Дослідження властивостей рекомбінантних одноланцюгових антитіл, специфічних до інтерферону $\beta 1b$ людини: дис. канд. біол. наук: 03.00.03 / К. нац. ун-т ім. Т. Шевченка, Ін-т молекуляр. біології і генетики НАН України. Київ, 2009. 130 с.

140. Модифікований генно-інженерний злитий білок scFv(IFN $\beta 1b$)-BAP, продукований бактеріями *E. coli*: пат. 132794 Україна. МПК C12N 15/00. Заявл. 02.10.2018; опубл. 11.03.2019, Бюл. № 5.

141. Studier F.W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.* 2005. Vol. 41. P. 207–234.

142. Van de Loosdrecht A.A., Beelen R.H., Ossenkoppele G.J., Broekhoven M.G., Langenhuijsen M.M. A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukaemia. *J Immunol. Methods.* 1994. Vol. 174, N 1–2. P. 311–320.

143. Muller B.H., Lamoure C., Le Du M.H., Cattolico L., Lajeunesse E., Lemaitre F., Pearson A., Ducancel F., Menez A., Boulain J.C. Improving *Escherichia coli* alkaline phosphatase efficacy by additional mutations inside and outside the catalytic pocket. *Chembiochem.* 2001. Vol. 2. P. 517–523.

144. Yamaguchi H., Miyazaki M. Refolding Techniques for Recovering Biologically Active Recombinant Proteins from Inclusion Bodies. *Biomolecules*. 2014. Vol. 4. P. 235–251.
145. Xu H., Zhang X., Zhang Z., Zhang Y., Cass A.E.G. Directed Evolution of *E. coli* Alkaline Phosphatase Towards Higher Catalytic Activity. *Biocatalysis and Biotransformation*. 2003. Vol. 21. P. 41–47.
146. Tsumoto K., Umetsu M., Kumagai I., Ejima D., Philo J. S., Arakawa T. Role of Arginine in Protein Refolding, Solubilization, and Purification. *Biotechnology Progress*. 2004. Vol. 20. P. 1301–1308.
147. Khodagholi F., Yazdanparast R. Cooperative effects of artificial chaperone and Mg²⁺ ions on alkaline phosphatase refolding. *Biochemical Engineering Journal*. 2007. Vol. 36. P. 123–130. doi: 10.1016/j.bej.2007.02.008.
148. Aachmann F.L., Otzen D.E., Larsen K.L., Wimmer R. Structural background of cyclodextrin-protein interactions. *Protein Engineering Design and Selection*. 2003. Vol. 16. P. 905–912.
149. Dirnbach E., Steel D.G., Gafni A. Mg²⁺ Binding to Alkaline Phosphatase Correlates with Slow Changes in Protein Lability. *Biochemistry*. 2001. Vol. 40. P. 11219–11226. doi: 10.1021/bi011399m.
150. Griffin J.F., Bulmer R., Wilson E.W. Cord blood lymphocyte subpopulations and mitogenic activity in whole blood microculture. *J Reprod Immunol*. 1979. Vol. 1, N 4. P. 219–227.
151. Brodin P., Davis M.M. Human immune system variation. *Nat Rev Immunol*. 2017. Vol. 17, N 1. P. 21–29.
152. Aziz N., Detels R., Quint J.J., Gjertson D., Ryner T., Butch A.W. Biological variation of immunological blood biomarkers in healthy individuals and quality goals for biomarker tests. *BMC Immunology*. 2019. Vol. 20. Art. N 33. doi.org/10.1186/s12865-019-0313-0.

ДОДАТОК А

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ
ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Усенко М.О.**, Горбатюк О.Б., Окунєв О.В., Іродов Д.М., Ковальчук М.В., Кордюм В.А. Отримання рекомбінантного злитого білка rhIL7-CBD. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2020. Т. 26. С. 282–286. DOI: 10.7124/FEEO.v26.1280.
2. Kovalchuk M.V., Ruban T.A., **Usenko M.O.**, Kordium V.A. Personalized responsiveness of human PBMCs to the action of IL-7. *Biopolymers and Cell*. 2020. Vol. 36. N 4. P. 304–312. DOI: 10.7124/bc.000A33.
3. **Усенко М.О.**, Окунєв О.В., Бенціонова К.І., Горбатюк О.Б., Іродов Д.М., Кордюм В.А. Отримання рекомбінантного злитого білка rhIL7-VARmut та його функціональна характеристика. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2019. Т. 25. С. 321-326. DOI: 10.7124/FEEO.v25.1185.
4. **Усенко М.О.**, Окунєв О.В., Бенціонова К.І., Горбатюк О.Б., Іродов Д.М., Ковальчук М.В., Кордюм В.А. Оптимізація умов ренатурації злитого білка rhIL7-VARmut із тілець включення *Escherichia coli* та його практичне застосування. *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів*. 2019. Т. 17, № 1. С. 39-45. DOI: 10.7124/visnyk.utgis.17.1.1199.
5. Volynets G.P., Gorbatiuk O.B., Kukharenko O.P., **Usenko M.O.**, Yarmoluk S.M. Production of recombinant human apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 2016. Vol. 126. P. 89-92. DOI: 10.1016/j.pep.2016.05.016.
6. Патент на корисну модель № 132794 Україна. МПК (2019.01) C12N 15/00. Опубл. 11.03.2019, Бюл. № 5. Модифікований генно-інженерний злитий білок scFv(IFN β 1b)-VAR, продукований бактеріями *E. coli*. Горбатюк О.Б., **Усенко М.О.**, Іродов Д.М., Кордюм В.А. Заявл. 02.10.2018; опубл. 11.03.2019.

7. Gorbatiuk O.B., **Usenko M.O.**, Okunev O.V., Bentsionova K. I., Irodov D.M. Optimization of renaturation method of the IL7-BAPmut fusion protein, its characterization and application. *Матеріали XII Українського біохімічного конгресу*, м. Тернопіль, 2019. *Медична та клінічна хімія*. Т. 21, № 3 (додаток). С. 266.
8. **Usenko M.**, Gorbatiuk O., Okunev O., Kordium V. High-throughput purification method of the recombinant human IL7. 20th International Summer School on Immunology “Immune System: Genes, Receptors and Regulation”, Hvar, Croatia, 2019. Book of abstracts P. 107.
9. **Usenko M.**, Gorbatiuk O., Okunev O., Kordium V. Obtaining and characterization of a singlechain variable fragment alkaline phosphatase fusion proteins and specific polyclonal antibodies for detection of IFNbeta and interleukin10. 43rd FEBS Congress, Prague, Czech Republic 2018. *FEBS Open Bio*. Vol. 8, N 1. P. 186.
10. **Usenko M.O.**, O.B. Gorbatiuk, O.V. Okunev, V.A. Kordium. Obtaining and characterization of the IL-7-CBD fusion protein. Materials of XII annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Kyiv, 2018. *Biopolym. Cell*. Vol. 34, N 2. P. 163.
11. **Usenko M.O.**, O.B. Gorbatiuk, O.V. Okunev, V.A. Kordium. Production of IL7-His recombinant protein for purification of polyclonal antibodies. XIth Parnas Conference: Young Scientists Forum «Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine» Kyiv, Ukraine, 2018. *Ukr. Biochem. J*. Vol. 90, Special Issue. P. 70.
12. **Usenko M.O.**, Gorbatiuk O.B., Okunev O.V., Kordium V.A. Production of IL7-fusion recombinant proteins and their application for affinity chromatography resin creation. 15th Horizons in Molecular Biology: International PhD Student Symposium, Göttingen, Germany, 2018. Abs. book. P.124.
13. Gorbatiuk O., Volynets G., **Usenko M.**, Yarmoluk S. Efficient method for the obtaining of Recombinant Human Apoptosis signal-regulating kinase 1

(ASK1) in *Escherichia coli*. 45th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separation and Related Techniques, Prague, Czech Republic, 2017. Abs. book. P. 113.

14. **Usenko M.**, Gorbatiuk O., Filipenkova N., Okunev O., Kordium V. Production and characterization of single-chain variable fragment antibodies against interferon beta-1b and interleukin-10. Materials of XI annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Kyiv, 2017. *Biopolym. Cell*. Vol. 33, N 3. P. 236.

15. **Усенко М.О.**, Горбатюк О.Б., Іродов Д.М., Кордюм В.А. Отримання та характеристика одноланцюгових антитіл специфічних до інтерферону- β 1b та інтерлейкіну-10 людини, злитих з бактерійною лужною фосфатазою. Науково-практична конференція з міжнародною участю Інноваційні напрями в генетичній та регенеративній медицині, Київ, 2017 р. *Клітинна та органна трансплантологія*. Т. 5, № 2. С. 246.