

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр  
Сибирского отделения Российской академии наук»

На правах рукописи



Панамарев Никита Сергеевич

БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ БЕЛКА СУРВИВИНА В МОЧЕ  
ПРИ ДИАГНОСТИКЕ РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

1.5.6 Биотехнология

Диссертация на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель  
доктор биологических наук  
Франк Людмила Алексеевна

Красноярск – 2026

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	11
1.1 Белок-онкомаркер сурвивин .....	11
1.1.1 Структурная характеристика белка сурвивина.....	11
1.1.2 Функции сурвивина в организме и клетке .....	13
1.1.3 Использование сурвивина в качестве биомаркера онкологических заболеваний.....	16
1.1.4 Методы выявления сурвивина в биологических образцах.....	19
1.2 Целентеразин-зависимые биолюминесцентные системы.....	24
1.2.1 Биолюминесцентные системы люциферазного типа и их практическое использование.....	26
1.2.2 Биолюминесцентные системы фотопротеинового типа и их практическое использование.....	34
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	39
2.1 Вещества и реактивы .....	39
2.2 Сбор и обработка клинических образцов .....	41
2.3 Получение генетической конструкции, кодирующей рекомбинантный сурвивин.....	41
2.4 Получение генетической конструкции, кодирующей гибридный белок сурвивин-обелин (Surv-OL) .....	42
2.5 Трансформация компетентных клеток <i>E. coli</i> XL1-Blue плазмидной ДНК и ПЦР-скрининг колоний .....	43
2.6 Выделение плазмидной ДНК.....	43
2.7 Получение биомассы рекомбинантных бактериальных штаммов-продуцентов.....	44
2.8 Получение рекомбинантного сурвивина .....	44
2.9 Получение гибридного белка Surv-OL .....	45
2.10 Электрофорез белковых молекул в полиакриламидном геле .....	46
2.11 Твердофазный биолюминесцентный иммуноанализ рекомбинантного сурвивина .....	46

2.12	Определение константы аффинности анти-сурвивин антител .....	47
2.13	Определение предела обнаружения билюминесцентных репортёров на основе фотопротейна обелина и люциферазы NanoLuc .....	48
2.14	Билюминесцентный твердофазный анализ сурвивина конкурентного типа .....	49
2.15	Химический синтез конъюгатов анти-сурвивин антител с билюминесцентными белками.....	49
2.16	Билюминесцентный твердофазный анализ сурвивина «сэндвич» типа.....	50
2.17	Измерение CYFRA 21-1 в клинических образцах мочи .....	51
2.18	Программное обеспечение и статистическая обработка результатов .....	52
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....		53
3.1	Получение рекомбинантного сурвивина .....	53
3.1.1	Создание генетической конструкции, кодирующей сурвивин .....	53
3.1.2	Получение очищенного препарата рекомбинантного сурвивина.....	54
3.1.3	Проверка биоспецифичности полученного белка .....	56
3.1.4	Исследование аффинности образца поликлональных анти-сурвивин антител.....	58
3.2	Билюминесцентный иммуноанализ сурвивина на основе фотопротейна обелина .....	61
3.2.1	Конкурентный вариант иммуноанализа .....	62
3.2.1.1	Получение гибридного белка сурвивин-обелин (Surv- OL).....	62
3.2.1.2	Биохимические свойства гибридного белка .....	65
3.2.1.3	Результаты конкурентного иммуноанализа сурвивина .....	68
3.2.2	«Сэндвич» вариант иммуноанализа сурвивина на основе обелина.....	69
3.3	Билюминесцентный иммуноанализ сурвивина на основе люциферазы NanoLuc .....	72
3.3.1	Подбор раствора для построения калибровочной кривой в иммуноанализе сурвивина в моче .....	74
3.3.2	Стабильность реагентов иммуноаналитической системы по определению сурвивина в моче человека при хранении .....	75
3.3.3	Сравнительный анализ результатов билюминесцентного и колориметрического иммуноанализов.....	80

3.4 Исследование клинических образцов мочи .....	82
3.4.1 Характеристика групп исследования .....	82
3.4.2 Исследование образцов мочи пациентов на содержание сурвивина биолюминесцентным иммуноанализом.....	83
3.4.2.1 Влияние клинико-морфологических характеристик РМП на концентрацию сурвивина в моче .....	84
3.4.2.2 Мониторинг больных по уровню содержания сурвивина в моче после специализированного лечения.....	86
3.4.2.3 Сурвивин как предиктор рецидивирования немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря.....	87
3.4.3 Комбинированное определение сурвивина и CYFRA 21-1 в моче.....	89
3.4.3.1 Исследование пригодности набора «CYFRA 21-1-ИФА-БЕСТ» для анализа образцов мочи .....	89
3.4.3.2 Исследование образцов мочи пациентов на содержание онкомаркера CYFRA 21-1 .....	91
3.4.3.3 Результаты применения комбинированного анализа сурвивин/CYFRA 21- 1 .....	92
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	95
ВЫВОДЫ .....	97
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	100
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ .....	102

## ВВЕДЕНИЕ

Рак мочевого пузыря (РМП) является девятым по частоте диагностируемым онкологическим заболеванием в России у мужчин и шестнадцатым у женщин [1]. В зависимости от вовлечённости мышечной стенки мочевого пузыря в онкологический процесс данное заболевание делят на немышечно-инвазивный (НМИРМП) и мышечно-инвазивный рак мочевого пузыря (МИРМП). До прорастания опухоли в мышечную стенку РМП медленно прогрессирует и хорошо поддаётся лечению, с возможностью полностью сохранить поражённый орган и высокое качество жизни. Однако высокая склонность к рецидивированию требует тщательного и регулярного наблюдения за состоянием пациентов [2].

Золотым стандартом для диагностики и мониторинга пациентов является цистоскопия – визуальный осмотр мочевого пузыря и мочевого канала при помощи эндоскопа на наличие новообразований с последующим определением их характера. Данная процедура является дорогостоящим и инвазивным методом, из-за чего болезнь часто выявляют несвоевременно, когда начинают появляться беспокоящие пациентов симптомы – макрогематурия и дизурические расстройства [3]. Дополнением к данному методу служит цитологическое исследование клеточного осадка мочи, представляющее собой изучение структуры элементов мочи под микроскопом для поиска атипичных клеток, указывающих на развитие онкологического процесса. Цитологическое исследование также имеет ряд значимых недостатков: диагностическая эффективность значительно зависит от квалификации проводящего её цитопатолога, метод имеет низкую чувствительность для ранних стадий рака, так как клетки низкой степени злокачественности часто не отличимы от нормальных [4]. В связи с этим, требуются новые, простые и неинвазивные методы ранней диагностики и прогностики данного заболевания.

Особый интерес вызывает диагностика РМП, основанная на определении онкомаркеров в моче, куда при контакте с опухолью попадают маркерные молекулы. Это неинвазивный материал для исследования доступный практически

в неограниченном количестве. Перспективным кандидатом в маркеры РМП является сурвивин (BIRC5) – мультифункциональный белок, ингибирующий апоптоз и участвующий в регуляции клеточного деления [5]. Наблюдается значительная экспрессия данного белка в эмбриональных и злокачественных опухолевых тканях, однако в нормальных, терминально дифференцированных тканях сурвивина практически нет, что делает его привлекательным маркером для диагностики онкологических заболеваний [6,7]. Стоит отметить, что из-за отсутствия стандартных методов обнаружения сурвивина в моче диагностическая чувствительность в разных исследованиях варьирует от 20 до 70% [8]. По имеющимся на данный момент литературным данным, пороговое значение концентрации сурвивина в моче, позволяющее стратифицировать пациентов с подозрением на РМП и здоровых людей находится на уровне нескольких пМ [9]. Т.е. аналитическая система для выявления такой низкой концентрации мишени в образце должна иметь очень высокую чувствительность.

В Институте биофизики СО РАН на протяжении более чем 50 лет проводятся исследования биолюминесценции морских организмов и изучаются способы её практических приложений. Основными ферментами, обеспечивающим биолюминесценцию у многих известных на сегодняшний день морских обитателей, являются целентеразин-зависимые люциферазы, представляющие собой одноцепочечные глобулярные белки (16-35 кДа), катализирующие реакцию окисления субстрата целентеразина молекулярным кислородом с выделением CO<sub>2</sub> и излучением кванта голубого цвета ( $\lambda_{\text{max}}=470-490$  нм) [10]. Благодаря высокому квантовому выходу биолюминесцентной реакции и низкому уровню шумового сигнала, возможно создание высокочувствительных молекулярных аналитических систем с использованием данных белков в качестве репортёрных молекул. Получены рекомбинантные аналоги целентеразин-зависимых люцифераз и их различные генетически-модифицированные варианты с новыми полезными свойствами, химически синтезированы и коммерчески доступны субстрат и его синтетические варианты. Показана перспективность использования этих

люцифераз как репортеров для высокочувствительного молекулярного анализа различных диагностически важных соединений. Это создает основу для разработки высокочувствительного анализа онкомаркера сурвивина в моче и исследования его пригодности при диагностике рака мочевого пузыря.

**Целью исследования являлось** создание высокочувствительного биолюминесцентного способа выявления сурвивина в моче и установление перспективности данного маркера для диагностики и прогнозирования рака мочевого пузыря.

Для достижения поставленной цели требовалось решить следующие **задачи**:

1. Получить и исследовать свойства специфичных биолюминесцентных репортеров на основе рекомбинантных целентеразин-зависимых люцифераз, а также рекомбинантного сурвивина. Разработать дизайн анализа сурвивина на их основе.
2. Провести испытание разработанного аналитического подхода с использованием модельных и клинических образцов мочи.
3. Провести статистический анализ результатов и определить значимость содержания сурвивина в моче как диагностического и прогностического параметра при заболевании РМП.
4. Определить перспективность использования сурвивина в комбинации с другими онкомаркерами при выявлении ранних стадий заболевания РМП.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Разработан дизайн высокопроизводительного биолюминесцентного иммуноанализа сурвивина в образцах мочи на основе люциферазы NanoLuc. Метод способен выявлять концентрации исследуемого белка в диагностически значимом диапазоне концентраций, с пределом обнаружения аналита 10,6 пг/мл (0,6 пМ).

2. Показано, что содержание сурвивина имеет высокую диагностическую значимость и соответствует диагнозу заболевания РМП, установленного клиническими сертифицированными методами (чувствительность 62%, специфичность 97%). Предложенный анализ служит удобным неинвазивным

способом преддиагностики дисфункций мочевыводящих путей, в том числе и РМП.

3. Повышенное содержание сурвивина в моче пациентов может служить основанием для стратификации больных в отношении неблагоприятных прогностических факторов: высокая гистологическая стадия, большой размер опухоли, наличие мышечной инвазии. Отсутствие сурвивина в моче может служить благоприятным прогностическим фактором, увеличивающим медианный срок безрецидивной выживаемости.

4. Способ позволяет обнаруживать ранние стадии заболевания (случаи немышечно инвазивного рака мочевого пузыря, НМИРМП) с чувствительностью 52%. Выявление сурвивина одновременно с онкомаркером CYFRA 21-1 в моче больных РМП увеличивает чувствительность выявления НМИРМП до 74% при специфичности анализа 89%.

**Научная новизна.** Получены новые биоспецифические репортерные молекулы и изучены их свойства; разработан дизайн биолюминесцентного высокопроизводительного иммуноанализа белка сурвивина в моче; показана взаимосвязь между концентрацией сурвивина в образцах и диагнозом заболевания, а также клинико-морфологическими характеристиками опухоли, такими как степень инвазии, степень дифференцировки, размер опухоли и рецидивирование. Установлено, что для выявления ранних стадий заболевания РМП необходимо определять в моче пациентов одновременно сурвивин и онкомаркер CYFRA 21-1.

**Теоретическая и практическая значимость.** Установлено пороговое значение концентрации сурвивина в моче, позволяющее диагностировать заболевание с чувствительностью 62% и специфичностью 97%. Разработан высокопроизводительный способ выявления сурвивина для быстрой неинвазивной диагностики заболевания органов мочеполовой системы. Все составляющие аналитической системы отечественного происхождения, что делает анализ

доступным для проведения широких скрининговых исследований пациентов групп риска, осуществления мониторинга проводимого лечения, своевременного обнаружения рецидива заболевания. Наличие установленного повышенного уровня сурвивина в анализируемых образцах является обоснованием для формирования групп пациентов повышенного онкологического риска и назначения более глубокого обследования.

**Личный вклад соискателя** заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования – от постановки задач, проведения экспериментов и анализа полученных результатов до подготовки публикаций.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность результатов подтверждена использованием современных методов исследования и статистического анализа, а также достаточным объёмом экспериментальных данных.

Результаты работы были представлены в виде докладов и тезисов на следующих научных конференциях: XVII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Перспективны» (Красноярск, 2021); Всероссийская конференция «Синтетическая биология и биофармацевтика» (Новосибирск, 2022 г.); Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2024» (Москва, 2024); VI Всероссийская конференция «Опухолевые маркеры: молекулярно-генетические и клинические аспекты» (с.Майма, 2024); Конкурс-конференция молодых учёных и специалистов ИБФ СО РАН (Красноярск, 2026); на семинарах лаборатории фотобиологии и лаборатории биолюминесцентных и экологических технологий Института биофизики СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН.

Исследование проведено в рамках проектов: гранта Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности «Разработка и валидация молекулярно-генетических методов диагностики и стратификации риска рецидивирования немышечно инвазивного рака мочевого пузыря

(НМИРМП)» (Договор №241 от 28.04.2021 г), гранта Российского научного фонда и Красноярского краевого фонда науки «Диагностика и мониторинг течения немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря (НМИРМП) методом жидкостной биопсии» (Проект № 25-15-20021).

**Публикации.** По теме диссертационного исследования опубликовано 10 работ, в том числе: 5 статей в научных журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых научных изданий (Scopus, WoS, Белый список) и рекомендованных ВАК; 4 публикации в сборниках докладов научных конференций; 1 патент РФ.

**Структура и объём работы.** Работа изложена на 120 страницах рукописного текста и включает: введение, обзор литературы, описание методов исследования, изложение результатов исследования и их обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы (137 источников, из них 127 иностранных). Диссертационная работа содержит 9 таблиц и 43 рисунка.

**Соответствие диссертации паспорту специальности 1.5.6 Биотехнология:** Диссертационная работа Панамарева Никиты Сергеевича соответствует паспорту специальности 1.5.6. Биотехнология в соответствии с п.7: Прикладная энзимология, включая ферментные системы, технологии очистки белков, прикладные аспекты белковой инженерии; и п. 22: Биокаталитические, биосинтетические и биосенсорные (включая нанобиосенсорные) технологии. Создание биоаналитических систем для медицинской диагностики и медицинского анализа. Диагностические средства (биочипы, биосенсоры), биосовместимых материалов с применением клеточных, геномных и постгеномных технологий; создание банков биологических образцов.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Белок-онкомаркер сурвивин

Сурвивин, также известный как BIRC5 (baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5, бакуловирусный ингибитор мотива апоптозных повторов 5), является низкомолекулярным цинксодержащим металлопротеином, состоящий из 142 аминокислотных остатков (молекулярная масса 16,5 кДа) [11]. Протеин относится к семейству IAP (inhibitors of apoptosis protein, ингибиторы апоптоза), которые связываются с различными каспазами с образованием неактивных комплексов и блокируют апоптоз.

Сурвивин активно экспрессируется во время эмбрионального развития и отсутствует в терминально дифференцированных нормальных тканях, однако снижение уровня дифференциации клеток при злокачественных процессах значительно увеличивают его количество [12]. Сверхэкспрессия сурвивина при онкологических заболеваниях помогает преодолевать раковым клеткам контрольные точки клеточного цикла, способствуя аномальному прогрессированию трансформированных клеток во время митоза [13].

#### 1.1.1 Структурная характеристика белка сурвивина

Сурвивин, как и все остальные белки из группы белков-ингибиторов апоптоза, содержит бакуловирусный IAP повтор (BIR), который состоит примерно из 70 аминокислот. Данный повтор обеспечивает их взаимодействие с проапоптотическими белками.

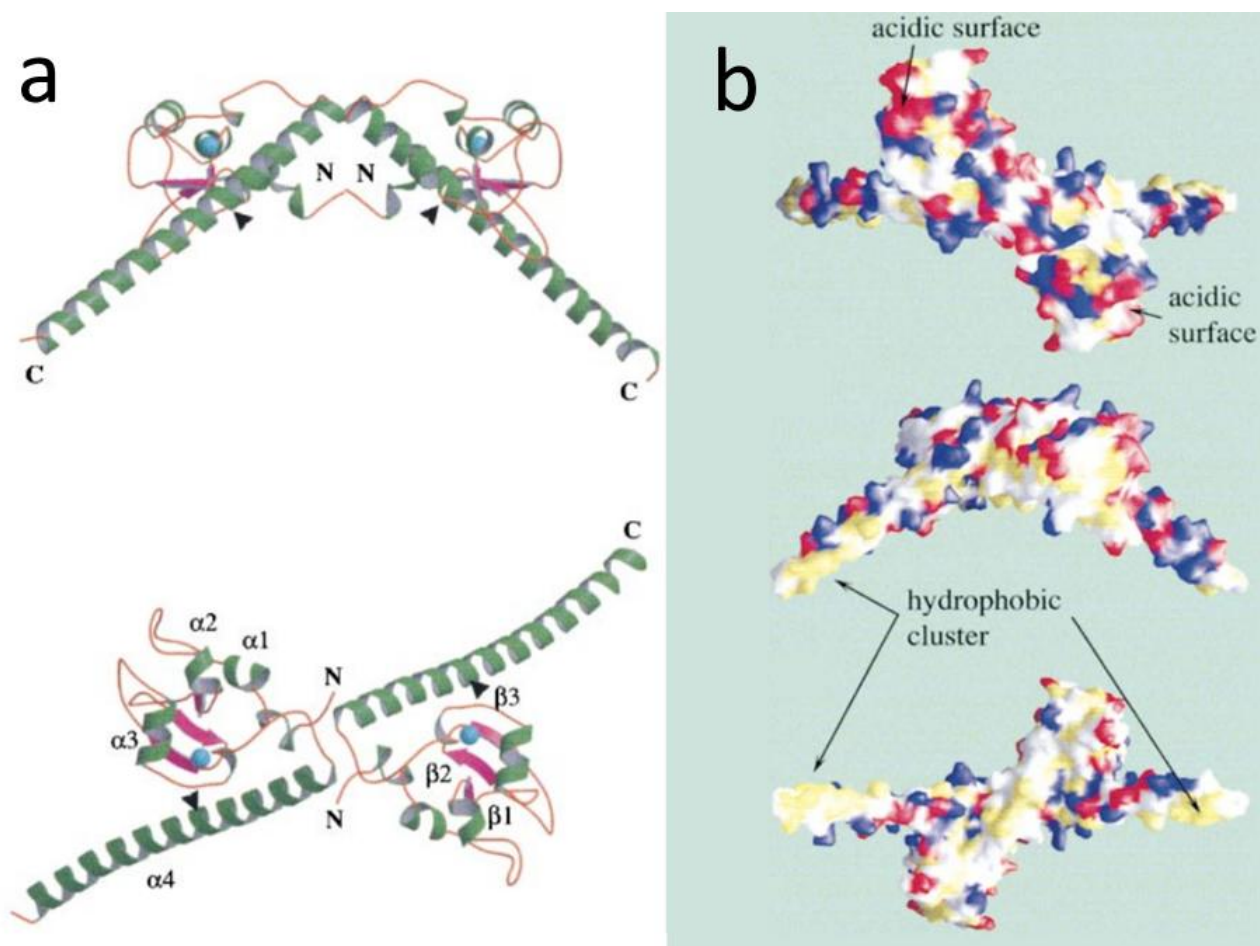


Рис.1.1. Структура (а) и молекулярная поверхность (b) димера сурвивина. На картинке (а): Зеленым и фиолетовым обозначены  $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -цепи соответственно, голубым – атомы цинка. Черным стрелками обозначены сайты расщепления трипсином. На картинке (b): Аминокислоты обозначены в соответствии с их химическими свойствами: кислотные, основные, полярные и гидрофобные в красный, синий, белый и жёлтый цвета соответственно [15].

Мономер данного белка состоит из глобулярного N-концевого домена цинкового пальца (1-88 а.о.), линкерного участка (89-97 а.о.) и длинной С-концевой спирали (98-142 а.о.). Домен цинкового пальца и спираль плотно упакованы вместе. В общем мономер содержит 4 спирали, имеющих больше одного оборота, 3 цепи  $\beta$ -листа. VIR мотив состоит из 3-х  $\alpha$ -спиралей и трёхцепочечного антипараллельного  $\beta$ -листа

В растворе сурвивин образует стабильные димеры (структура на рис.1.1), которые не диссоциируют при разведении раствора, в котором он находится [14]. Димер имеет уникальную форму галстука-бабочки. Поверхность сурвивина

(рис.1.2) имеет разные химические свойства, обусловленные их аминокислотным составом. Так, выпуклая поверхность представлена небольшими вкраплениями основных, кислотных, гидрофобных или полярных аминокислот. Вогнутая же сторона состоит в основном из гидрофобных аминокислот, в частности два крупных гидрофобных кластера расположены на С-конце спирали  $\alpha 4$ . Эти кластеры участвуют в межбелковых взаимодействиях, например, связываются с микротрубочками.

В образование димера вовлечены: N-концевой регион белка, линкерная часть и N-концевая часть спирали  $\alpha 4$ . Граница, на которой взаимодействуют димеры в основном гидрофобна, так как на 75% состоит из неполярных аминокислот [15].

### **1.1.2 Функции сурвивина в организме и клетке**

С биологической точки зрения, сурвивин – мультифункциональный белок, способный ингибировать апоптоз, регулировать деление клеток и способствовать ангиогенезу [16]. В некоторых исследованиях указывается, что главной функцией белка является контроль митоза [17]. Ингибирование сурвивина вызывает дефекты в сегрегации хромосом, цитокинезе и нарушает финальные стадии деления клетки [18]. Также его ингибирование значительно подавляет ангиогенез в моделях опухолей, что указывает на взаимосвязь функций сурвивина и ангиогенеза [19].

В нормальных тканях синтез и деградация сурвивина полностью зависят от клеточного цикла, что подтверждает его роль в регуляции митоза. При митозе сурвивин функционирует небольшой промежуток времени во время метафазы и анафазы, при этом локализуясь в двух субклеточных пулах (Рис.1.2). Один пул сурвивина участвует в полимеризации тубулина посредством взаимодействия с центросомами, микротрубочками метафазного и анафазного веретена деления и остатками митотического аппарата, главным образом регулируя их динамику. Второй пул сурвивина локализован у кинетохора митотической хромосомы. В этом пуле сурвивин ассоциирован с регуляторами цитокинеза, такими как киназа *auroga* В, внутренний белок центромеры (inner centromere protein, INCENP), и бореалин

(Borealin/Dasra), которые поддерживают роль сурвивина как часть комплекса белков-хромосомных пассажиров (chromosomal passenger complex - CPC) [20]. Этот комплекс участвует в регуляции ключевых митотических событий: прикрепление микротрубочек к кинетохору, активация сборки и дальнейшая регуляция веретена деления и сократительного аппарата, управляющего цитокинезом [21].

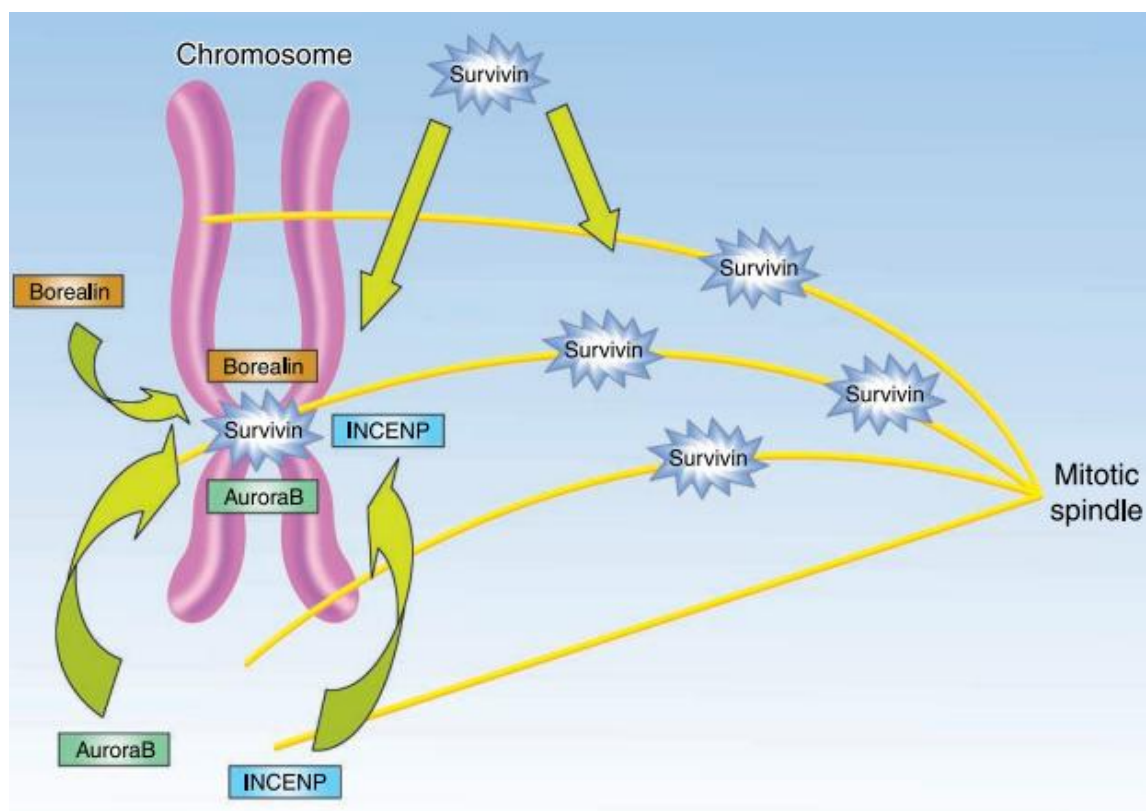


Рис.1.2. Функции сурвивина при митозе. Сурвивин – компонент CPC, который необходим для правильной сегрегации хромосом и цитокинеза. Дополнительно, отдельный пул сурвивина связан с полимеризацией тубулина и способствует регуляции динамики микротрубочек [20].

Роль сурвивина в ингибировании апоптоза была предметом многочисленных дискуссий. Изначально считалось, что сурвивин и другие IAP избирательно связывают и способствуют деградации каспаз 3, 7 и 9 [22]. Однако дальнейшие эксперименты показали, что сурвивин ингибирует только каспазу 9 (Рис.1.3), при этом требуется присутствие кофактора-белка, взаимодействующего с X – белком вируса гепатита В (hepatitis В X-interacting protein, HBXIP) [23]. Также есть

предположение, что антиапоптотическая роль сурвивина может быть связана с белком-ингибитором апоптоза XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein - XIAP), с которым сурвивин взаимодействует через бакуловирусный домен, при этом повышая стабильность XIAP, что приводит к синергетическому ингибированию активации каспазы-9 [20].

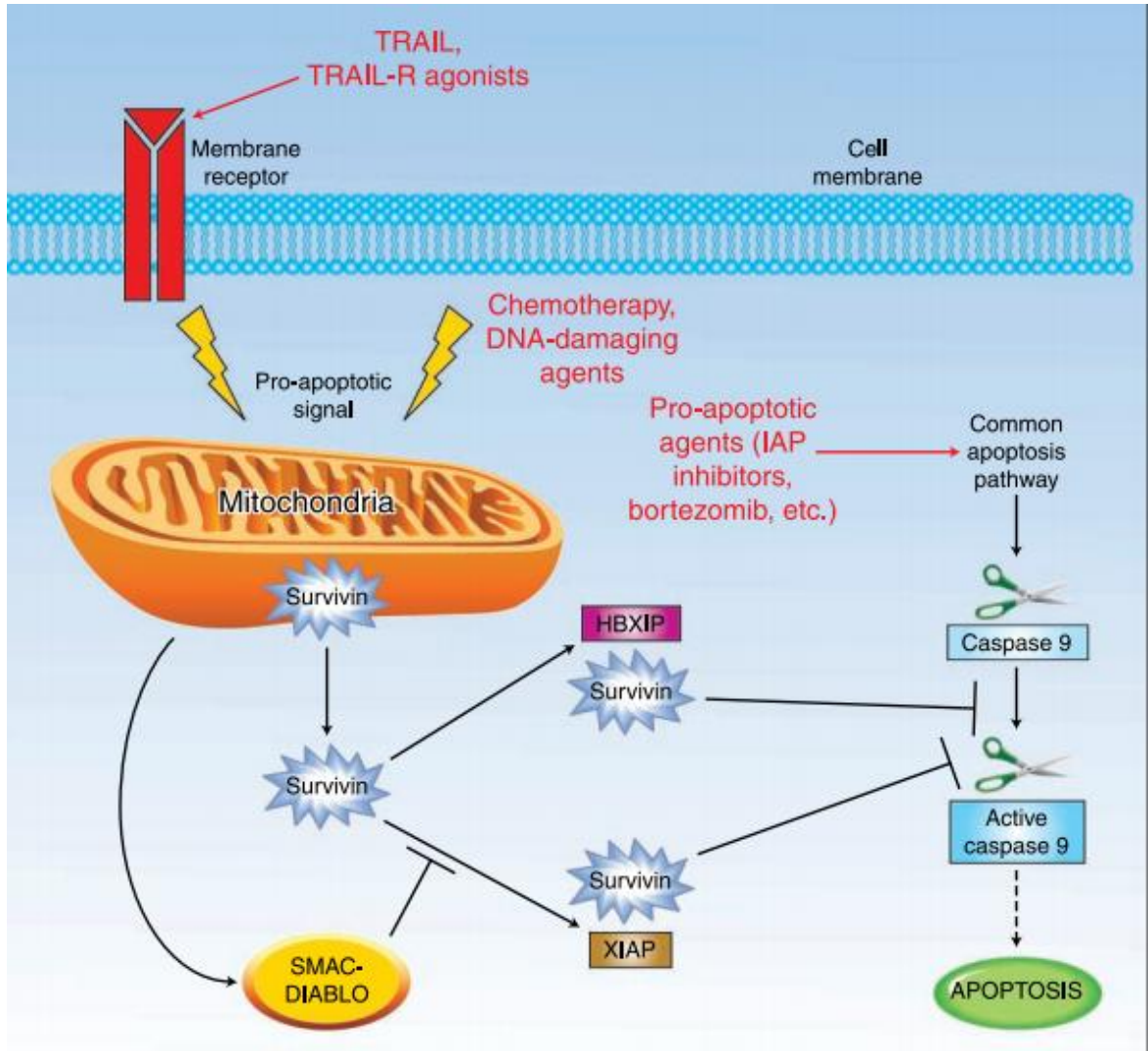


Рис.1.3. Функции сурвивина как ингибитора апоптоза. После активации проапоптотического клеточного сигнального пути сурвивин освобождается из митохондрии в цитозоль и ингибирует активацию каспазы-9. Эта функция требует ассоциации с HBXIP и/или XIAP и ингибируется митохондриальным белком Smac/Diablo [20].

Ангиогенез – физиологический процесс, характеризующийся образованием новых кровеносных сосудов из уже существующих. Данный процесс увеличивает доставку кислорода и питательных веществ, что необходимо для существования и

роста возникшей опухоли. Процесс образования новых сосудов включает в себя следующие этапы: 1) освобождение проангиогенных факторов из опухолевых клеток; 2) изменения в морфологии эндотелиоцитов; 3) освобождение протеолитических ферментов, разрушающих базальную мембрану; 4) миграция и формирование трубчатых структур; 5) пролиферация эндотелиоцитов и 6) дифференциация в капилляры. Среди всех белков, участвующих в этих процессах особенно важным, является фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor - VEGF), т.к. он участвует во всех этапах, за исключением первого. Фактор роста эндотелия сосудов связывается с соответствующими рецепторами (семейства VEGFR) и через сигнальный путь PI3K/Akt способствует выживанию и пролиферации эндотелиальных клеток. Сурвивин способствует активации данного пути, который в свою очередь через ряд других механизмов увеличивает экспрессию VEGF [24].

### **1.1.3 Использование сурвивина в качестве биомаркера онкологических заболеваний**

Сурвивин практически отсутствует в нормальных тканях взрослого человека, но при этом сверхэкспрессируется практически во всех злокачественных опухолях (таблица 1), включая рак мочевого пузыря, рак лёгких, рак молочной железы, желудка, пищевода, печени, яичника и других [25]. В настоящее время сурвивин рассматривают как потенциальный маркер генитоуретальных типов рака, так при таких типах болезни белок попадает в мочу, где он может быть легко обнаружен при помощи теста на основе антител. Это позволяет создать простой, неинвазивный и относительно дешёвый метод для диагностики таких типов рака. Данный метод может быть очень полезен для диагностики рака мочевого пузыря, так как он плохо обнаруживается стандартными методами (цистоскопия, цитологические методы) на ранних стадиях, которые к тому же являются инвазивными, из-за чего вызывают дискомфорт у пациентов. Также рак мочевого пузыря имеет высокую вероятность рецидива, что требует обследования пациента минимум раз в три месяца. Помимо

этого, эффективность цистоскопии и уринарной цитологии сильно зависят от квалификации врача, проводящего диагностику, что сильно сказывается на результатах. Чувствительность цистоскопии оценивается в 47-52%, а у цитологического исследования клеток осадка мочи (urine cytology) в 40-60% при опухолях на низкой стадии и до 95% при высокой [26].

Таблица 1. Сверхэкспрессия белка сурвивина при различных типах рака [26]

Тип рака	Увеличение экспрессии, %
Рак лёгких	85,5
Рак пищевода	80
Рак груди	70,7-90,2
Рак поджелудочной железы	76,9-88
Рак яичников	73,5
Злокачественная меланома	67
Гепатоцеллюлярная карцинома	41-87
Колоректальный рак	63,5
Рак мочевого пузыря	57,8
Острый миелоидный лейкоз	54,8
Острый лимфобластный лейкоз	68,8
Рак ротовой полости	72-75

S. Ziaee et al проверили пригодность сурвивина как маркера рака мочевого пузыря. Они разделили испытуемых на 2 группы: исследуемую, включающую больных раком мочевого пузыря пациентов (N=20) и контрольную (имеют другие нарушения мочеиспускательного тракта, N=18). В итоге положительные результаты в тесте (ОТ-ПЦР – метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией) на сурвивин были получены для 18 участников из исследуемой группы и 9-ти из контрольной, т.е. в данном случае тест обладает 90% чувствительностью и 50% специфичностью. При этом в исследуемой группе было 10 пациентов, у которых цитологическое исследование не выявило наличие рака,

однако все из них имели положительный результат в тесте на сурвивин. Позже было выявлено, что 9 пациентов из этой группы имели опухоли ранней стадии. Результаты данного эксперимента продемонстрировали, что тест на сурвивин имеет лучшую чувствительность чем стандартные методы (цистоскопия и цитологическое исследование клеток осадка мочи) при диагностике рака на низкой стадии [27].

Также в работе Srivastava A.K. et al [9] при помощи иммуноферментного анализа (ИФА) была определена концентрация сурвивина в моче 48 здоровых участников контрольной группы и 117 пациентов с гистологически подтвержденной уротелиальной карциномой. Было обнаружено, что сурвивин значительно выше в группе случаев ( $P < 0,05$ ). Было предложено пороговое значение сурвивина 17,7 пг/мл с приблизительной чувствительностью 82,9% и специфичностью 81,1% ( $P < 0,0001$ ), тогда как цитология мочи имела чувствительность 66,7% и специфичность 96,0%.

Среди опубликованных исследований существует разброс данных по специфичности и чувствительности сурвивина. Можно встретить как крайне низкие значения чувствительности (21,1%) [28], как средние (53%; 70,6%) [29,7], так и крайне высокие (100%) [26]. Мета-анализ, включающий в себя в совокупности данные по 2051 участнику, определил значение чувствительности в 77,2%. Данные о специфичности также остаются не ясны. В том же мета-анализе авторы отмечают, что при включении большого количества здоровых в контрольную группу значение специфичности может завышаться, полученное значение специфичности у них составило 91,8% [8]. Клиническую значимость использования сурвивина ещё только предстоит выяснить, так как существующие исследования имеют ограниченную выборку и разные подходы к дизайну исследования. Поэтому работы по выявлению сурвивина всё ещё являются актуальными.

### 1.1.4 Методы выявления сурвивина в биологических образцах

Сурвивин, как регулярный белок, даже в случае сверхэкспрессии, находится в биологических жидкостях в крайне малом количестве. Пороговый уровень, позволяющий отличать здоровых от онкологических больных, находится на уровне 100-120 пг/мл для сыворотки крови [30,31] и 10-20 пг/мл для мочи [9,32,33].

Существует 2 подхода, благодаря которым можно измерить белок в такой низкой концентрации. Во-первых, это концентрирование образца, благодаря чему содержание аналита можно увеличить в 10 и более раз [34]. Однако, это требует дополнительных расходных материалов, оборудования, времени и большой объём образца, что существенно повышает стоимость и трудозатратность анализа. Второй подход – создание высокочувствительных диагностикумов, способных выявлять аналит в крайне низких концентрациях.

Классическим методом качественного или количественного обнаружения аналита в биологических жидкостях является иммуноанализ, который основан на специфической реакции связывания антигена и антитела с последующим выявлением образовавшегося иммунокомплекса при помощи специфического меченого иммунореагента [35]. С момента разработки принципов иммуноанализа в 1959 году, развитие метода в плане повсеместности применения и создания оригинальных схем анализа растёт экспоненциально [36].

Разработано множество форматов иммуноанализа, которые можно разделить главным образом на 2 категории: гомогенные и гетерогенные. Гомогенный иммуноанализ характеризуется тем, что все необходимые реакции проходят в однофазной системе – растворе. Механическое разделение продуктов реакции и удаление непрореагировавших компонентов при этом не требуется. Гетерогенный иммуноанализ проводят с использованием двухфазной системы, в которой помимо жидкой фазы присутствует твёрдая фаза-носитель [37].

Наиболее используемыми вариантами гетерогенного иммуноанализа являются «сэндвич» и конкурентный методы (схемы показаны на рис 1.4 а и б). «Сэндвич» метод заключается в использовании твёрдого носителя с иммобилизованными антителами, к которому добавляют образец с антигеном. Выявляют связавшийся антиген меченым антителом, детектируемый сигнал находится в прямой зависимости от количества антигена. Конкурентный иммуноанализ проводят путём добавления к иммобилизованным на твёрдом носителе антителам раствора, содержащем анализируемый и меченый антиген. Между ними происходит конкуренция за ограниченное количество центров специфического связывания, детектируемый сигнал при этом находится в обратной зависимости от концентрации исследуемого антигена [38].

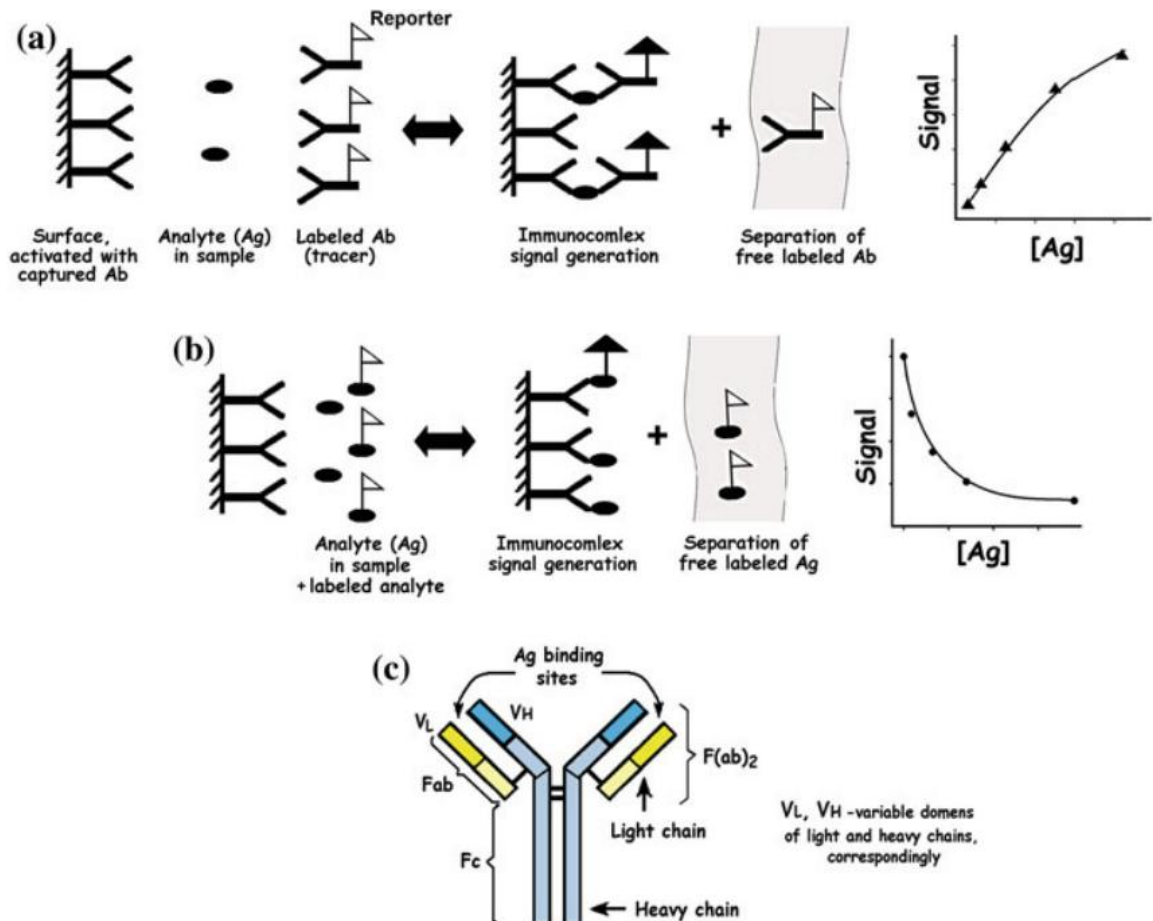


Рис.1.4. Схема для: **а** «сэндвич» и **б** конкурентного иммуноанализа; **с** - структура антитела (человеческий IgG), показывающая пары идентичных тяжёлых (выделены светло-голубым) и лёгких (выделены светло-жёлтым) цепей. Обе пары цепей содержат переменные домены,  $V_H$  и  $V_L$ , отвечающие за связывание с антигеном [39].

Чувствительность иммуноанализа главным образом зависит от двух факторов: эффективность формирования иммунокомплекса и способность детектирующей системы обнаруживать этот комплекс с высокой чувствительностью. Формирование комплексов обеспечивается аффинностью антител к антигену. Антитела — это белки, которые вырабатываются у животных в результате иммунологического ответа на наличие чужеродного вещества. Антитела являются важнейшим компонентом иммуноанализа, который обеспечивает его большую эффективность, благодаря их способности связываться с чрезвычайно широким спектром природных и искусственных молекул, клеток и вирусов. Исключительная специфичность для анализируемого вещества позволяет анализировать его в сложных биологических средах [40].

Система обнаружения иммунокомплекса (генерация сигнала и устройство для измерения) значительно влияет на чувствительность иммуноанализа. Основным требованием для системы обнаружения является уровень сигнала метки, который должен быть выше фонового шума. Множество разновидностей меток применяются в иммунологическом анализе. Первыми использовались радиоактивные метки, но проблемы, связанные с радиоактивными отходами и нестабильность, присущая радиоактивно-меченым реагентам, стимулировали развитие нерадиоактивных меток [41].

Ферменты, катализирующие химические реакции с визуальными сигналами (например, цвет или свет) используются чаще, чем другие метки. Ферменты могут быть обнаружены в очень низкой концентрации, потому что одна молекула фермента может катализировать множество реакций, при этом оставаясь стабильной. Чтобы стать репортёром, фермент ковалентно связывают с антителом или антигеном (в зависимости от формата анализа). Анализ, в котором используют фермент в качестве метки для регистрации сигнала получил название иммуноферментного анализа.

Самой широко используемой меткой в ИФА на данный момент является пероксидаза хрена (Horseradish peroxidase – HRP), которая обеспечивает развитие

окрашивания при использовании с хромогенными субстратами, такими как тетраметилбензидин [42]. Однако отмечается, что чувствительность колориметрической метки зачастую недостаточна, исследователям приходится прибегать к различным решениям, таким как полимеризация метки для амплификации сигнала [43,44].

В литературе сообщается о создании ряда иммуноанализов сурвивина, основанных на колориметрической детекции аналита. Так, Li с соавторами удалось разработать метод с пределом обнаружения в 62,5 пг/мл [7]. Gleichenhagen и др. создали метод с чувствительностью в 33 пг/мл [45], при этом в своём более позднем исследовании [46] отметили, что предел обнаружения разработанного метода был недостаточен, что привело к низкой чувствительности сурвивина как онкомаркера в 35%, полученной в исследовании.

В попытке увеличить чувствительность, исследователи предлагают форматы анализа с магнитными частицами. Использование магнитных частиц позволяет работать с большим объёмом образца, нежели чем с тем, который помещается в лунку планшета при стандартном ИФА. Chang Yang и соавторы предложили иммуноанализ типа «сэндвич», где в качестве твёрдой фазы-носителя антител используются магнитные частицы [47,48]. Выявление иммунокомплексов проводили при помощи хемилюминесценции. Однако, предел обнаружения составил всего 0,949 нг/мл, что может быть обусловлено недостаточной оптимизацией анализа.

Недавно, Geка и соавторами, был разработан подход иммунохимической детекции сурвивина при помощи Рамановской спектроскопии, с использованием нанопроволок покрытых серебряными наночастицами в виде дендритов [49]. Метод показал высокую чувствительность в 12,5 пг/мл и рабочий линейный диапазон до 500 пг/мл, однако анализ требует сложного оборудования и особых материалов для его проведения. Также, Gleichenhagen и коллегам удалось разработать метод с пределом обнаружения в 1,45 пг/мл с использованием технологии иммуно-ПЦР, на основе твердофазного анализа проксимального

лигирования (solid-phase proximity ligation assay - spPLA) [46]. Такой высокий предел обнаружения обеспечивается тем, что единичное белковое взаимодействие переносится на уровень ДНК за счёт использования специальных зондов, затем сигнал от ДНК амплифицируется при помощи ПЦР (схема метода показана на рис.1.5.). Стоит отметить, что проведение такого анализа занимает больше суток, а также требует концентрирования образца.

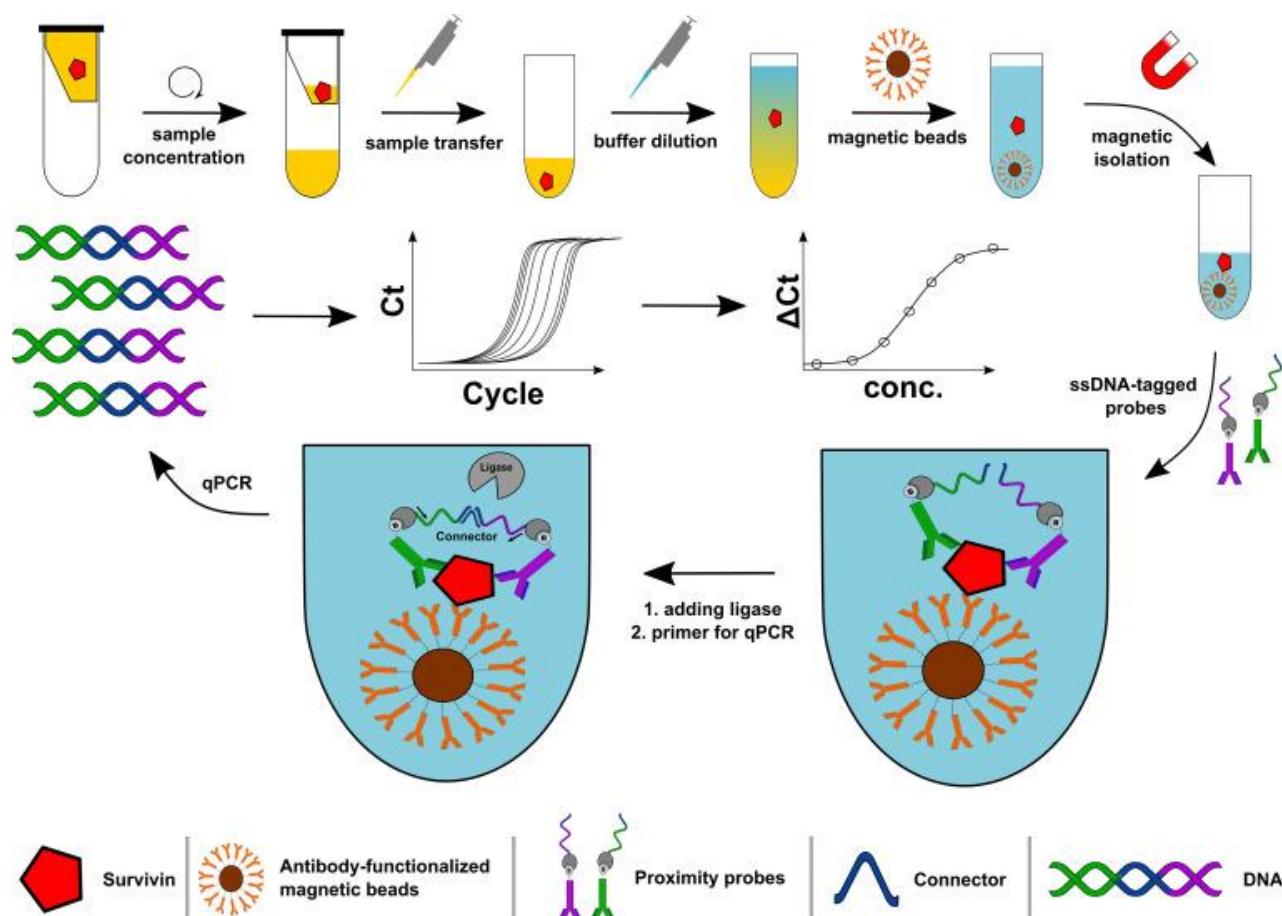


Рис.1.5. Схема метода обнаружения сурвивина в моче с использованием твердофазного анализа проксимального лигирования [46].

Таким образом, анализ данных показывает, что стандартные колориметрические ИФА зачастую имеют недостаточную чувствительность для обнаружения сурвивина в моче. Введение различных дополнительных принципов в анализ, такие как Рамановская спектроскопия, иммуно-ПЦР, поверхностный плазмонный резонанс [50], органические электрохимические сенсоры [51] существенно увеличивает чувствительность, позволяя определять сурвивин в

диагностически значимом диапазоне концентраций для образцов мочи. Однако, это требует использования дорогостоящего оборудования, специальных материалов, что ведёт к существенному усложнению и удорожанию анализа.

В Институте биофизики СО РАН имеется большая теоретическая и практическая база по использованию биолюминесцентных белков в молекулярной аналитике. Высокие требования к чувствительности анализа сурвивина требуют использования чувствительной метки. Целесообразно исследовать биолюминесцентные белки в качестве метки для иммуноанализа сурвивина, которые потенциально могут обеспечить достаточную чувствительность при сохранении простоты подхода.

## 1.2 Целентеразин-зависимые биолюминесцентные системы

Любая биолюминесцентная система имеет в своём составе 2 ключевых компонента: люциферазу и люциферин. Люцифераза – фермент из класса оксигеназ, катализирующий реакцию окисления субстрата молекулярным кислородом с излучением квантов света в видимом диапазоне спектра. Субстратом для реакций данного типа служит люциферин. Данные термины являются собирательными и функциональными понятиями, так как эти молекулы возникали независимо в ходе эволюции в разных таксонах, и поэтому не имеют общей структуры или механизма действия [10].

Наиболее изученные на сегодня биолюминесцентные системы бактерий, кишечнополостных, светлячков существенно отличаются друг от друга. Однако многие морские организмы имеют общий субстрат – целентеразин и его производные, несмотря на таксономическую удалённость друг от друга. По всей видимости, это произошло в результате трофических связей между ними, например, медуза *Aequorea Aequorea* неспособна синтезировать целентеразин самостоятельно и получает его с пищей из планктона [52].

Целентеразин (CTZ) представляет собой небольшое соединение с имидазопиразиноновым остовом, синтезируется некоторыми морскими

организмами, такими как гребневики [53], копеподы [54] из аминокислот – 2-х молекул тирозина и 1-ой молекулы фенилаланина (структура целентеразина и механизм биолюминесцентной реакции показаны на рис. 1.6). В настоящее время разработан способ синтетического целентеразина и его аналогов [55,56], что делает данный люциферин коммерчески доступным.

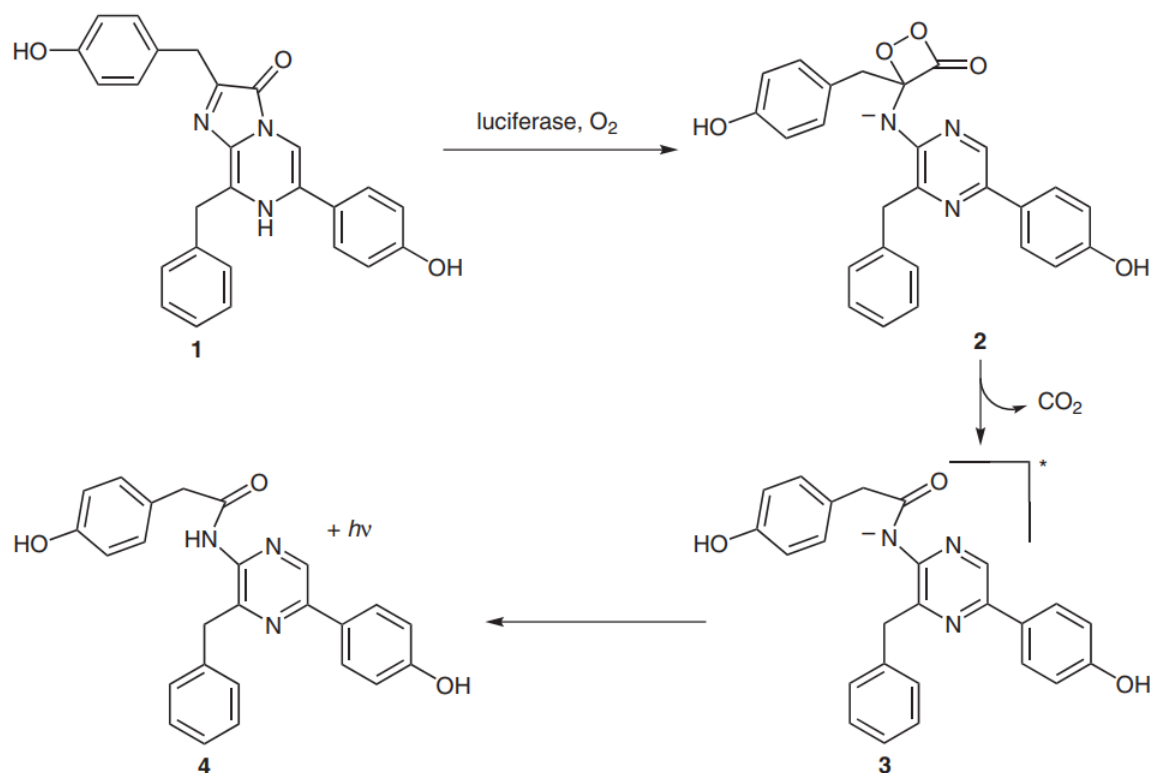


Рис.1.6. Механизм реакции окисления целентеразина: в присутствии люциферазы молекула кислорода присоединяется к целентеразину с последующим высвобождением молекулы углекислого газа. При этом формируется возбуждённый анион целентерамида, который деактивируется с образованием фотона [57].

Существует 2 типа целентеразин-зависимых биолюминесцентных систем: люциферазный, в котором реакция протекает по классической схеме и описывается уравнением Михаэлиса-Ментена, и фотопротеиновый, в котором белок и окисленный люциферин образуют устойчивый комплекс, который в ответ на специфический внешний стимул (например, воздействие ионов кальция) подвергается дальнейшим превращениям сопровождающиеся излучением света [58].

Люциферазы многих морских организмов были клонированы, получены их рекомбинантные аналоги. Получены генетические варианты данных белков с новыми полезными свойствами, открывающие широкие возможности их применения в качестве репортёров в молекулярном анализе. Ниже будут рассмотрены биолюминесцентные системы различных организмов, а также их практические приложения.

### **1.2.1 Биолюминесцентные системы люциферазного типа и их практическое использование**

Было выделено и изучено более десятка целентеразин-зависимых люцифераз, однако широкое применение получили только биолюминесцентные системы мягкого коралла *Renilla*, копепод *Metridia longa* и *Gaussia*, глубоководной креветки *Oplophorus* [59].

Люцифераза коралла рода *Renilla* (RLuc) представляет собой белок массой 36 кДа из 311 аминокислот с максимумом биолюминесценции  $\lambda_{\max}=480$  нм. Имеет долгую историю изучения, начиная с 1960-х годов, а также является единственной на данный момент клонированной внутриклеточной целентеразин-зависимой люциферазой [10]. Помимо люциферазы, биолюминесцентная система *Renilla* включает в себя целентеразин-связывающий белок (CBP), который нековалентно связывает субстрат и выпускает его при воздействии ионов кальция, а также зелёный флюоресцентный белок (GFP), переизлучающий квант света сдвинутый на 30 нм в длинноволновую область и повышающий квантовый выход реакции в результате ферстеровского индуктивного резонансного безызлучательного переноса энергии (Bioluminescence resonance energy transfer - BRET). Благодаря своей изученности, наличию геномодифицированных вариантов с различными свойствами и возможности экспрессии практически в любом типе клеток, RLuc имеет широкий спектр применений как *in vivo*, так и *in vitro*. Так, RLuc-535 и RLuc-547, мутанты со сдвигом спектра в длинноволновую область, применяются для

биоимиджинга у мелких животных [60]. Также данный белок используются в молекулярном анализе в виде генетически слитого белка с биоспецифическими молекулами. На основе этой технологии были разработаны методы выявления вируса клещевого энцефалита [61], болезни лайма [62], антител к опухольассоциированным белкам [63].

В 1990 году Campbell и Herring изучили 8 видов копепод, и во всех из них выделили люциферазу и люциферин [52]. В 2002 году люцифераза *Gaussia princeps* (GLuc) размером 20 kDa с максимумом биолюминесценции  $\lambda=470$  нм была клонирована в клетки *E. coli*, выделена и использована в качестве метки для анализа гибридизации ДНК [64]. Однако наличие 10 цистеинов в составе аминокислотной последовательности белка и 5 дисульфидных связей у нативно свернутой GLuc существенно затруднило фолдинг рекомбинантного белка, что привело к экспрессии неправильно свёрнутого полипептида, упакованного в тельца включения, при этом выход нативно свёрнутого белка оставался незначительным. Поэтому применение данного белка и его изучение с биофизической точки зрения оставалось незначительным до 2011 года, когда исследователи добавили к последовательности GLuc 9 аспарагиновых аминокислот с С-конца, что существенно увеличило его растворимость и, как следствие, дало время для рефординга, существенно увеличив выход нативно свёрнутого белка. Люцифераза *Gaussia* нашла своё применение биоимиджинге *in vivo* [65,66] и изучении межбелковых взаимодействий [67].

Люцифераза рачка *Metridia longa* (MLuc) была клонирована в 2004 году коллегами из лаборатории фотобиологии Института биофизики СО РАН, получен рекомбинантный вариант данной люциферазы [68]. Было выделено несколько изоформ MLuc, при этом наименьшая из них – MLuc7 имеет размер всего в 16,5 кДа, и является наименьшей по размеру среди всех природных люцифераз [69]. Максимум биолюминесценции этого белка –  $\lambda_{\max}=485$  нм [70]. Недостаток данной люциферы такой же, как и у люциферазы GLuc – наличие 5 дисульфидных

мостиков в структуре белка затрудняет экспрессию в клетках *E.coli*, хотя обеспечивает высокую термостабильность белка. Для получения высокоактивной MLuc необходима экспрессия в клетках эукариот, например, в клетках насекомых. MLuc используют в молекулярном анализе *in vitro*, например, был создан метод выявления вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) на основе генетического гибрида миниантитела к ВКЭ и люциферазы [71]. Так как MLuc является секретлируемой люциферазой, показано ее использование для мониторинга метаболизма клеточных культур без их лизиса [72,73].

Одной из первых обнаруженных и описанных целентеразин-зависимых люцифераз стала секретлируемая люцифераза из глубоководной креветки *Oplophorus gracilirostris*, открытая Осаму Шимомурой в 1978 году [74]. Высокий молекулярный вес (106 кДа) и низкая стабильность данной люциферазы первоначально не вызвали интереса для практического применения. Позже было показано, что данная люцифераза состоит из 4-х субъединиц: 2 массой 19 кДа и 2 массой 35 кДа. Оказалось, только малая субъединица массой 19 кДа обладает биолюминесцентной активностью. При попытке получения рекомбинантного варианта малой субъединицы, полученный белок был температурно нестабилен и обладал намного меньшей биолюминесцентной активностью по сравнению с полноразмерной люциферазой [75]. Прорывом для практического приложения данного белка, и, можно сказать, для практического приложения биолюминесцентных белков в целом, стала разработка искусственной люциферазы NanoLuc (NLuc, 19 кДа, структура и реакция с субстратом на рис.1.7) [76]. Она является генетически-модифицированным вариантом малой субъединицы люциферазы *Oplophorus*, включающим в себя 18 аминокислотных замен. Проведённый мутагенез существенно повысил стабильность и биолюминесцентную активность данной люциферазы. В сочетании с субстратом фуримазином (FMZ), синтетическим аналогом целентеразина, яркость биолюминесценции люциферазы NanoLuc превосходит таковую люцифераз светлячка и коралла *Renilla* более чем в 100 раз.

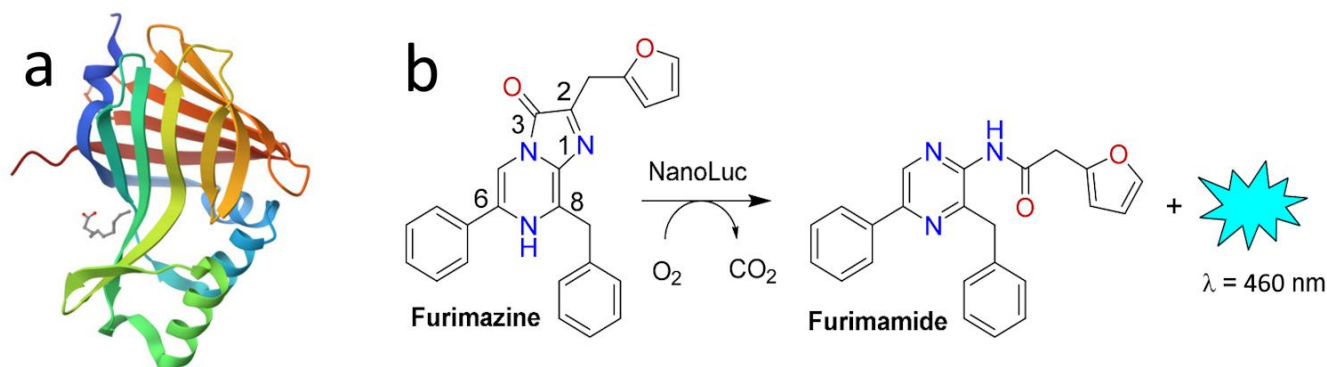


Рис.1.7. Пространственная структура люциферазы NanoLuc (a, PDB код - 5IBO) и её реакция с субстратом фуримазином (b) [77].

Как оказалось, такое поразительное увеличение биолюминесцентной активности у люциферазы NanoLuc произошло благодаря наличию аллостерического сайта связывания, с которым связывается оксилуциферин после протекания биолюминесцентной реакции. При катализе биолюминесцентной реакции  $\beta$ -бочонок люциферазы, внутри которого находится каталитический центр, переходит из открытого конформационного состояния в закрытое с высвобождением продукта реакции и кванта света. Продукт реакции связывается с аллостерическим сайтом, который появляется только тогда, когда  $\beta$ -бочонок находится в закрытом состоянии. Затем происходит быстрая диссоциация оксилуциферина от аллостерического сайта, с восстановлением структуры открытого  $\beta$ -бочонка, возвращая исходную конформацию люциферазы для протекания биолюминесцентной реакции [78]. Это обеспечивает высокую активность и уникальную длительность биолюминесцентного сигнала ( $t_{1/2}$  - 2,5 часа) [79].

Особый интерес представляет использование NanoLuc для исследования межбелковых взаимодействий. Так, люциферазу разделили на 2 фрагмента размером в 11 (SmBit, 1,3 кДа) и 156 (LgBit, 18 кДа) аминокислот с внесением дополнительных мутаций для повышения конформационной стабильности и минимизации стерических препятствий. Данная система получила название

NanoBit (NanoLuc Binary Technology<sup>®</sup>) [80]. Она позволяет отслеживать межбелковые взаимодействия при генетическом слиянии с исследуемыми белками. Фрагменты сами по себе практически не комплементируют, восстановление биолюминесцентной активности происходит только при физическом сближении за счёт белок-белковых взаимодействий. В качестве примера использования данной технологии можно привести исследование Shetty и др. [81], в котором авторы поместили липопротеинлипазу при помощи LgBit, а гликозилфосфатидилинозитол-якорный белок, который закрепляет липопротеинлипазу на сосудах и стабилизирует её работу, при помощи SmBit. При взаимодействии этих белков фрагменты люциферазы сближаются и восстанавливается их субстрат-зависимая биолюминесцентная реакция. Благодаря этому, удалось создать метод, позволяющий отслеживать взаимодействие данных белков в режиме реального времени в клеточных культурах.

Система NanoBit также получила применение в гомогенном биолюминесцентном анализе *in vitro*, который предлагается использовать для разработки экспресс-тестов, так как позволяет проводить тест в формате «mix-and-read» без проведения этапов промывки, как при стандартном ИФА. Adamson и соавт. [82] разработали автономный экспресс тест на внутрибольничную инфекцию, вызванную бактерией *Clostridium difficile*. Были разработаны NanoBit-тесты для обнаружения 2-х биомаркеров, глутаматдегидрогеназы и токсина В, в которых наноантитела и аффимеры (синтетические неиммунноглобулин-связывающие белки) рекомбинантно слиты с фрагментами NanoBit. Также были разработаны экспресс тесты на основе NanoBit для выявления антител к SARS-CoV-2 [83], терапевтических моноклональных антител ([84], схематичное изображение анализа на рис.1.8) и охратоксина А [85]. Недавно, с использованием принципа, аналогичному NanoBit, Kudryavtsev с коллегами [86] разработали однофазный иммуноанализ на фрагмент капсидного белка Е вируса клещевого энцефалита, позволяющий выявлять инфицированных иксодовых клещей.

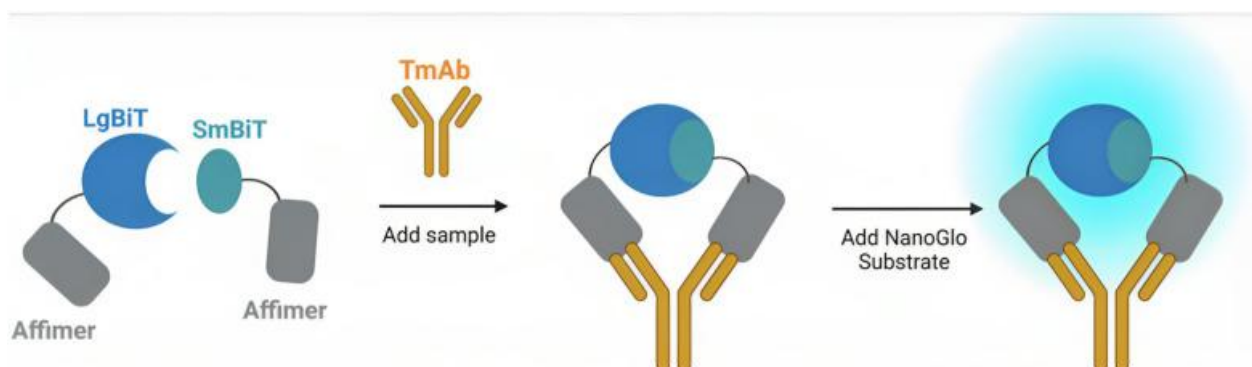


Рис.1.8. Схема механизма анализа на терапевтические моноклональные антитела (TmAb) с использованием системы NanoBit. Связывание аффимеров с антителом приводит к совместной локализации LgBiT и SmBiT, способствуя восстановлению фермента и биолуминесценции при добавлении субстрата [84].

Люцифераза NanoLuc хорошо зарекомендовала себя в качестве донора энергии в анализе на основе BRET. Высокий квантовый выход и узкий спектр излучения позволяют хорошо разделять излучение донора и акцептора, делая возможным использования широкого спектра флуорофоров [87]. По аналогии с NanoBit, данная технология получила название NanoBRET. Технология NanoBRET активно используется для изучения межбелковых взаимодействий [88,89], взаимодействий белков и малых молекул [90], анализа связывания рецепторов с лигандами [91].

Несмотря на максимум биолуминесценции NanoLuc в коротковолновом спектре при  $\lambda=460$  нм, исследователи принимают попытки использования данной люциферазы для биоимиджинга *in vivo*. Так Stacer с соавт. использовали NLuc для визуализации роста трансплантатов опухоли рака молочной железы на мышах [92]. Исследователи отмечали, что NanoLuc хорошо подходит для визуализации поверхностных тканей, но существенно уступает люциферазе светлячка с излучением при длине волны более 600 нм при визуализации глубоких тканей. Для использования люциферазы NanoLuc в биоимиджинге разрабатывают новые варианты люциферазы со сдвигом излучения в красную область. Например, Antares, представляющий собой гибрид NanoLuc с двумя флуоресцентными

доменами CyOFP1 с максимумом излучения при 589 нм [93]. Параллельно проводятся работы по синтезу новых вариантов субстрата, которые позволяют поменять спектральные характеристики биолюминесцентной системы, не модифицируя саму люциферазу [94].

Люцифераза NanoLuc хорошо зарекомендовала себя в молекулярном анализе в качестве партнёра для генетического слияния из-за своего небольшого размера. Wang и др. разработали высокочувствительный биолюминесцентный анализ для определения антител к ВИЧ-1 [95]. В микротитровальные лунки планшета, покрытых белком A/G, добавляли образцы сыворотки пациентов, после захвата антител к ВИЧ комплексы выявляли слитым белком, состоящим из антигенов ВИЧ p24 или gp41 и люциферазы NanoLuc (схема метода показана на рис.1.9). Чувствительность разработанного метода на 4 порядка выше, чем у стандартного колориметрического ИФА, и позволяет отслеживать изменение уровня антител к ВИЧ у лиц, получающих противовирусную терапию, а также дифференцировать больных в зависимости от стадии заболевания.

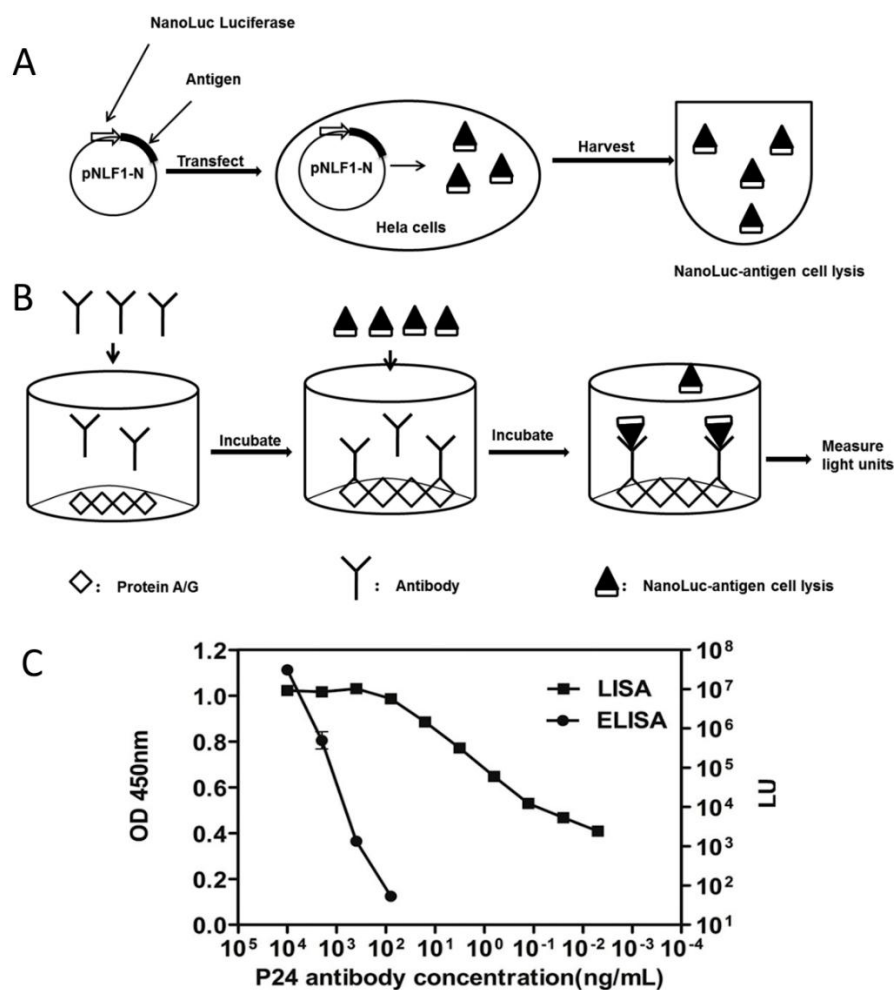


Рис.1.9. БиOLUMИнесцентный иммуноанализ антител к ВИЧ-1. А – трансфекция клеток HeLa плазмидой для получения слитого белка антигена и NanoLuc; В – захват антител к ВИЧ-1 белком А/Г с последующим выявлением при помощи слитого белка; С – результаты разработанного биOLUMИнесцентного (LISA) и стандартного колориметрического анализа (ELISA) [95].

Белки, слитые с люциферазой NanoLuc, также использовали для количественного определения антител к нуклеопротеину SARS-CoV-2 [96], гормона тироксина [97], кортизола [98], афлатоксина В1 [99] и др. Для всех разработанных биOLUMИнесцентных аналитических систем была показана значительно более высокая чувствительность по сравнению со стандартными методами.

Стоит отметить, что публикаций, где используются химические конъюгаты с люциферазой NanoLuc совсем немного, так как проведение химической модификации люциферазы зачастую ведёт к значительной потере биолюминесцентной активности и ухудшению характеристик анализа.

В лаборатории биолюминесцентных и экологических технологий ИБФ СО РАН был получен вариант люциферазы NLuc(C164S)LCTPSR, удлинённый с С-конца гексапептидом, содержащем уникальный цистеиновый остаток для направленного химического конъюгирования [100]. При этом нативный Cys164 заменили на Ser сайт направленным мутагенезом. Биолюминесцентная активность полученного варианта близка к таковой у исходной люциферазы. В работе показана возможность для использования NanoLuc в молекулярном анализе не только как партнёра для генетического слияния, но и как белка для химического конъюгирования с биоспецифическими молекулами с получением чувствительных биолюминесцентных меток.

### **1.2.2 Биолюминесцентные системы фотопротеинового типа и их практическое использование**

Ca<sup>2+</sup>-регулируемые фотопротеины светящихся морских кишечнорастных представляют собой одноцепочечные глобулярные белки размером около 21 кДа в комплексе с предокисленным субстратом – пероксицелентеразином. Все они содержат по 3 Ca<sup>2+</sup>-связывающих сайта типа «EF-Hand» [101]. Взаимодействие ионов кальция с фотопротеином приводит к декарбоксилированию субстрата, расположенного во внутренней полости белка. Процесс сопровождается излучением кванта голубого цвета с максимумом биолюминесценции при  $\lambda=460-480$  нм, в зависимости от вида кишечнорастного, из которого выделен белок. Практическое применение получили только 2 наиболее изученных фотопротеина – акворин медузы *Aequorea victoria* и обелин гидроидного полипа *Obelia longissima*.

Последовательности ДНК, кодирующие данные полипептиды, были клонированы в клетки бактерий и экспрессированы с большим выходом апобелка. Рекомбинантные апофотопротеины эффективно активируются синтетическим целентеразином в присутствии кислорода, при отсутствии ионов кальция. Эти белки всесторонне изучены относительно биохимических и биофизических свойств, третичной структуры, механизма биолюминесценции (механизм и характеристики биолюминесценции акворина и обелина представлены на рис.1.10). Эти знания наряду с возможностью получения практически неограниченного количества рекомбинантных белков служат основой для разработки уникальной биолюминесцентной детекционной системы, которая является «автономной», легко запускаемой, быстрой, высокочувствительной и безопасной [102].

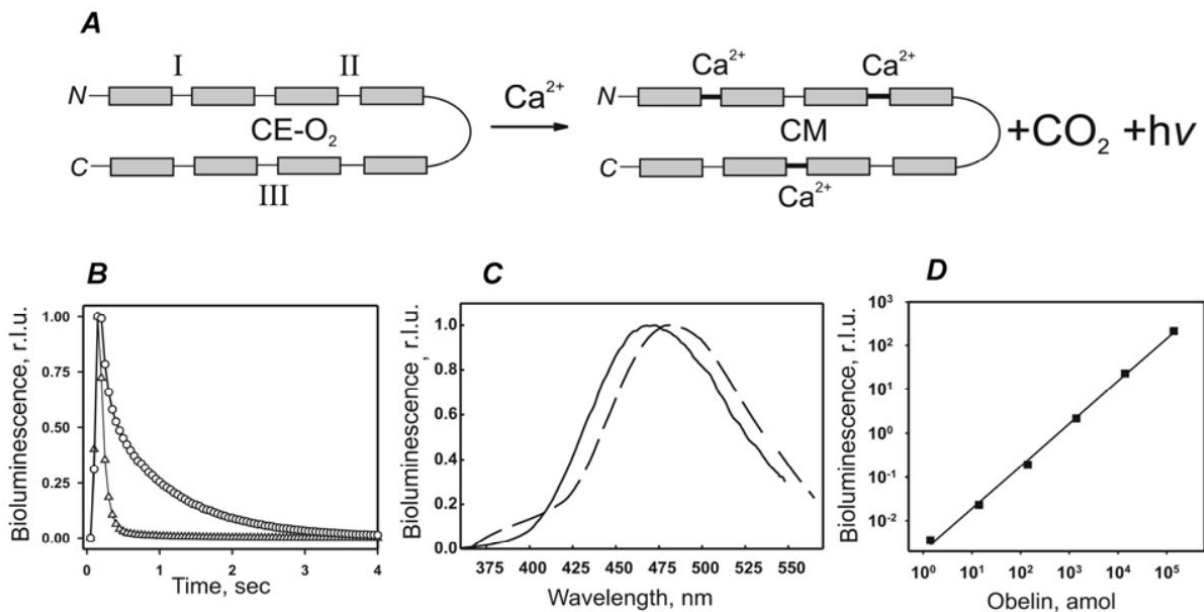


Рис.1.10. Биолюминесценция  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемых фотопротеинов. (А) Схема реакции: фотопротеин – комплекс из одноцепочечного полипептида, содержащего  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающие сайты (I, II, III) и предокисленный целентеразин ( $\text{CE-O}_2$ ). Связывание  $\text{Ca}^{2+}$  приводит к декарбоксилированию целентеразина с образованием стабильного комплекса полипептида, трёх ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и целентерамида (СМ), при этом выделяется  $\text{CO}_2$  и квант света. (В) Кинетика биолюминесцентных сигналов акворина (-○-) и обелина (-Δ-). (С) Спектр биолюминесценции акворина (сплошная линия) и обелина (прерывистая линия). (D) Биолюминесценция в зависимости от количества обелина, при избытке  $\text{Ca}^{2+}$  [102]. r.l.u. – относительные световые единицы.

Одним из первых практических приложений фотопротеинов стал мониторинг внутриклеточного кальция, что обусловлено их способностью излучать свет в присутствии ионов кальция [103]. В силу исторических причин, для этого стали использовать белок акворин, так как его кДНК была клонирована первой среди всех фотопротеинов в 1985 году [104]. Изначально акворин вводили в исследуемые клетки путём микроинъекций, что ограничивало данный метод применением только для крупных клеток [105]. Однако, развитие технологии вирусной трансфекции позволило вводить фотопротеин в самые разные клеточные культуры, в том числе нейронального происхождения, представляющие особый исследовательский интерес. Более того, были получены трансгенные мыши с акворином, благодаря чему стало возможным отслеживать кальциевые сигналы *in vivo* [106].

Кроме измерения внутриклеточного кальция, фотопротеины часто используются в молекулярном анализе *in vitro* в качестве репортёрного белка. Высокий квантовый выход биолюминесцентной реакции при практически полном отсутствии фонового сигнала позволяет обнаруживать фотопротеины на уровне аттомолей [39]. Получены рекомбинантные варианты белка обелина с уникальными цистеиновыми остатками для направленного химического конъюгирования, разработан метод синтеза конъюгатов обелина с различными биоспецифическими молекулами [58]. С использованием полученных специфических меток разработан ряд биолюминесцентных микроанализов, позволяющих выявлять ряд важных диагностических мишеней, таких как гормоны пролактин [107], тироксин и тиреотропин [108], общий [109] и гликированный [110] гемоглобин, аутоантитела к основному белку миелина [111]. Также, на основе цветных вариантов обелина был разработан метод одновременного выявления двух мишеней в одном образце [112], что было использовано для проведения генотипирования, так как при этом необходимо одновременное выявление двух вариантов аллелей [113]

Другой подход для создания фотопротеиновых меток – слияние генов биоспецифического белка и фотопротеина, что позволяет экспрессировать гибридный белок, обладающий функциональными доменами родительских белков [114]. С использованием данного подхода был получен слитый белок стрептавидин-обелин (SAV-OL, модель структуры показана на рис.1.11), который за счёт своей универсальности может быть использован в различном анализе, основанном на высокоспецифичном биотин-стрептавидиновом взаимодействии.

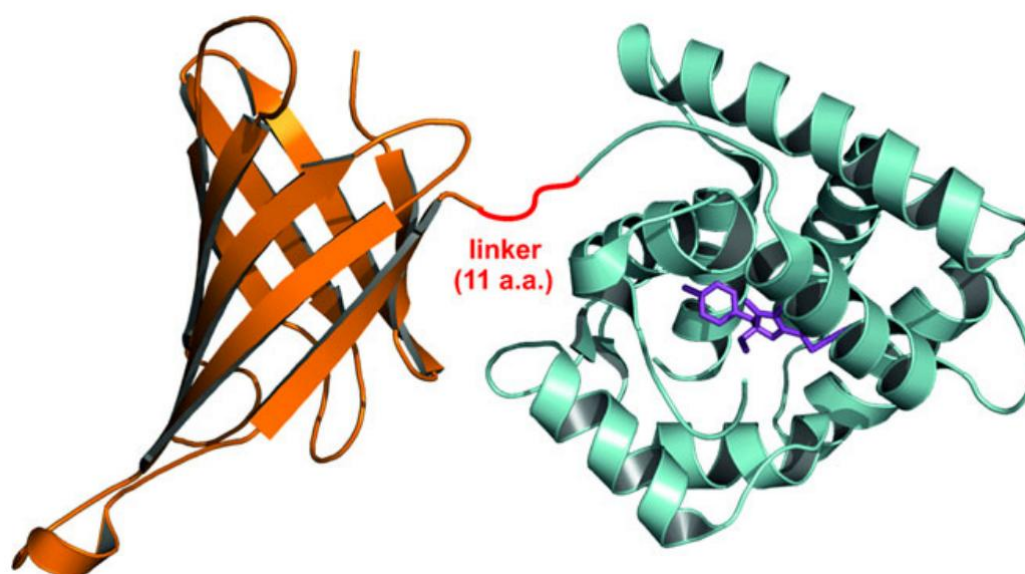


Рис.1.11. Изображение модельной структуры гибридного белка SAV-OL, полученное из известных PDB-структур. Обелин показан светло-голубым цветом, пероксицелентеразин в центре молекулы - фиолетовым, минимальное ядро стрептавидина - оранжевым, гибкий линкер – красным [115].

Так, стрептавидин-обелин использовали для определения сердечных кардиомаркеров тропонина I и T, миоглобина и креатинкиназы [115]. Ещё одной универсальной фотопротеиновой меткой, является гибридный белок proZZ-обелин (proZZ-OL). Он обладает двумя копиями полипептида Z, синтетического аналога домена В из белка А бактерии *Staphylococcus aureus*. Благодаря этому домену гибридный белок способен связываться с константными участками иммуноглобулина G. С помощью данного гибридного белка возможно определение аффинности антител, изучение связывания ДНК-аптамеров с их молекулярными

мишенями [116]. Стоит отметить, что у технологии слитых фотопротеинов есть важная особенность – удлинять обелин возможно только с N-конца, так как пролин на C-конце обелина поддерживает стабильность белка за счёт формирования водородных связей [117] и его модификация приводит к потере биолюминесцентной активности обелина (получаемый фотопротеиновый комплекс крайне нестабилен).

Таким образом, анализ литературы показывает, что несмотря на всеобщее признание сурвивина как потенциального онкологического маркера, в настоящее время аналитические методы по его определению существенно различаются по чувствительности и как правило не удовлетворяют требованиям по чувствительности и воспроизводимости. Не существует способа определения этой мишени, разрешенной для медицинской диагностики. В то же время, постановка способа лабораторного анализа сурвивина в моче открывает возможность для быстрой неинвазивной диагностики заболеваний мочевыводящих путей, в том числе рака мочевого пузыря.

Потенциальные возможности анализа на основе целентеразин-зависимых люциферазных меток (обеспечение высокой чувствительности, простота запуска и регистрации светового сигнала, доступность рекомбинантных вариантов люцифераз, а также синтетических субстратов, отсутствие токсичности и т.д.) определяют перспективность исследования, направленного на создание аналитических систем по выявлению сурвивина в моче на основе этих белков.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Вещества и реактивы

Таблица 2. Состав буферных растворов и сред, используемых в работе

Название	Состав
SOC-среда	20 г/л бакто-триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 0,6 г/л NaCl, 2,5 мМ KCl, 10 мМ MgCl <sub>2</sub> , 10 мМ MgSO <sub>4</sub> pH 7,0 + 20 мМ глюкозы
LB-среда	10 г/л бакто-триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 7,5 г/л NaCl
LB-агар	1,5% агара в LB-среде
Буфер А	6 М мочевины, 20 мМ Tris-HCl pH 7,0, 5 мМ CaCl <sub>2</sub>
Буфер Б	1 М ацетата натрия в буфере А
Буфер Т	20 мМ Tris-HCl pH 7,0
Буфер ТЕ	Буфер Т + 5 мМ ЭДТА
Кальциевый буфер	0,1 М CaCl <sub>2</sub> , 0,1 М Tris-HCl pH 8,8
Буфер PBS	0,1 М NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,1 М K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,15 М NaCl, pH= 7,5
Промывочный буфер №1	PBS, 0,1% Tween 20, 5 мМ ЭДТА
Промывочный буфер №2	PBS, 0,1% Tween 20, 1 мМ MgCl <sub>2</sub>
Буфер TGB	25 мМ Tris-base, 250 мМ глицин, 0,1% SDS

Реактивы, использованные для проведения исследования: бычий сывороточный альбумин (BSA, Sigma-Aldrich, США), агароза LE (Thermo Scientific, США), изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) (ДИА-М, Россия), Tris-base (Sigma-Aldrich, США), мочевины (Servicebio, КНР), ЭДТА-натриевая соль (Sigma-Aldrich, США), кальций хлорид (Sigma-Aldrich, США), диметилсульфоксид (ДМСО, MP Biomedicals, Германия), агар бактериологический (ДИА-М, Россия), бактотриптон (Panreac, Испания), дрожжевой экстракт (Медиген, Россия).

Синтетический CTZ получен от Prolume Ltd. (Pinetop, США), FMZ от TargetMol (США). Стоковый раствор субстратов готовили растворением в ДМСО и хранили при -20 °С. Концентрацию определяли путём добавления 5 мкл стокового раствора к 1 мл 96% этанола, с последующим измерением оптического поглощения при 430 нм, используя коэффициент экстинкции  $9800 \text{ см}^{-1} \text{ M}^{-1}$  [118].

Для проведения белкового электрофореза использовали персульфат аммония, додецилсульфат натрия (Bio-Rad, США), стандартные смеси белков для электрофореза (Abscam, Великобритания), акриламид и бис-акриламид (Медиген, Россия), TEMED (Helicon, Россия).

Контрольная моча и иммунодиагностикум «CYFRA 21-1-ИФА-БЕСТ» получены от фирмы Вектор-Бест (Россия).

Последовательность гена, кодирующего человеческий сурвивин, оптимизированная для бактериальной экспрессии была синтезирована и клонирована в вектор pMALc5x (NEB, Великобритания) фирмой Евроген, Россия.

Вариант искусственной целентеразин-зависимой люциферазы NanoLuc(C164S)LCTPSR, удлинённой со стороны С-конца гексапептидом, содержащим уникальный цистеин для направленного химического конъюгирования, получали по [100]. Гибридный белок proZZ-OL, в состав которого входят две копии полипептида Z, синтетического аналога домена В из белка А бактерии *Staphylococcus aureus*, получали в соответствии с [119]. Вариант обелина А6С, содержащий доступный цистеин для химической конъюгации, получали по [120].

Моноклональные антитела к сурвивину получены от фирм Abscam (Великобритания), Novus Biologicals (США). Мышиные поликлональные антитела к полученному нами рекомбинантному сурвивину были изготовлены к.б.н. Матвеевым А.Л. (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск) как описано в [121]. Коммерческий гибрид сурвивина и кальмодулина получен от фирмы Abscam (Великобритания).

Коммерческий колориметрический иммунодиагностический набор для определения сурвивина Human Survivin Quantikine ELISA Kit получен от фирмы R&D Systems (США).

## **2.2 Сбор и обработка клинических образцов**

Забор образцов мочи пациентов с клинически подтверждённым диагнозом РМП проводился на базе КБУЗ «КККОД имени А.И. Крыжановского» медицинским персоналом учреждения. Участники исследования подписывали добровольное информированное согласие на участие в эксперименте. Образцы мочи здоровых добровольцев получены врачами Красноярской городской поликлиники № 14 у сопоставимых по полу и возрасту граждан, проходивших диспансерное наблюдение. Исследование одобрено Локальным Этическим комитетом КККОД (протокол заседания № 27 от 02.07.2020 г.).

Участники группы исследования были обследованы и пролечены врачами-онкологами КККОД согласно современным клиническим рекомендациям. Оценены основные клиничко-морфологические параметры заболевания и опухоли: стадия, степень дифференцировки, размер и количество новообразований.

Образцы средней порции утренней мочи пациентов собирали, аликвотировали и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  до проведения анализа. После разморозки образцы центрифугировали (10 мин, 4000g,  $4^{\circ}\text{C}$ ) и использовали для проведения анализа.

## **2.3 Получение генетической конструкции, кодирующей рекомбинантный сурвивин**

ДНК-вставку, содержащую ген сурвивина получали ПЦР синтезом, в качестве матрицы использовали плазмиду pMAL-c5X-сурвивин.

Праймеры содержали сайты рестрикции NcoI (ведущий 5'-GCACCATGGGTGCACCGACCCTCCG-3') и XhoI (обратный

GCACTCGAGGTCCATCGCTGCCAGCTG). Амплификацию проводили с использованием PfuSE ДНК полимеразы (СибЭнзим, Россия) в условиях: предварительная денатурация – 1 мин при 95°C; 25 циклов – 20 с при 95°C, 30 с при 66°C, 1 мин при 72°C; заключительная стадия – 7 мин при 72°C.

Продукт амплификации расщепляли ферментами рестрикции Bsp19I (СибЭнзим, Россия) и XhoI (NEB, США) согласно рекомендациям производителя, в течение 2 ч при 37°C. ДНК векторной плазмиды pET19b (Novagene, США) аналогично обработали ферментами рестрикции, после чего дефосфорилировали с помощью щелочной фосфатазы CIP (NEB, США). ПЦР-фрагмент и линеаризованный вектор очищали препаративным электрофорезом в агарозном геле. Лигирование проводили T4 ДНК лигазой (СибЭнзим, Россия), используя соотношение линеаризованного вектора к ДНК-вставке 1 к 5 при 16°C в течение суток.

#### **2.4 Получение генетической конструкции, кодирующей гибридный белок сурвивин-обелин (Surv-OL)**

ДНК-вставку, кодирующую ген апообелина получали ПЦР синтезом, в качестве матрицы использовали плазмиду pET19b-OL8. Праймеры: кодирующий линкер ENLYFQGT и содержащий сайт рестрикции XhoI (ведущий 5'-CAGCTCGAGGAAAACCTGTATTTTCAGGGTACCGCTTCAAAATACG-3') и BamHI (обратный TTCGGATCCTTAGGGAACTCCGTTGCCAT).

Амплификацию проводили с использованием PfuSE ДНК полимеразы (СибЭнзим, Россия) в условиях: предварительная денатурация – 1 мин при 95°C; 25 циклов – 20 с при 95°C, 30 с при 60°C, 1 мин при 72°C; заключительная стадия – 7 мин при 72°C. Продукт амплификации расщепляли ферментами рестрикции XhoI (NEB, США) и BamHI (СибЭнзим, Россия) согласно рекомендациям производителя, в течение 2 ч при 37°C.

ДНК векторной плазмиды pET19b (Novagene, США) обработали ферментами рестрикции Bsp19I и BamHI, после чего дефосфорилировали с помощью щелочной

фосфатазы CIP (NEB, США). ПЦР-фрагмент и линейризованный вектор очищали, как описано ранее. ДНК-вставку, кодирующую ген сурвивина, использовали ту же, что и при получении генетической конструкции, кодирующей рекомбинантный сурвивин. Лигирование проводили T4 ДНК лигазой (СибЭнзим, Россия) при 16°C в течение суток. Соотношение вектора, вставки апоабелина и сурвивина в лигазной смеси составляло 1:5:5.

## **2.5 Трансформация компетентных клеток *E. coli* XL1-Blue плазмидной ДНК и ПЦР-скрининг колоний**

К суспензии компетентных клеток *E. coli* XL1-Blue (45 мкл) добавили 5 мкл раствора смеси плазмид после лигирования, инкубировали при 0°C в течение 30 мин, затем прогревали (42°C, 45 сек) и снова переносили на лед. Далее в пробирку добавляли 450 мкл среды SOC (таблица 2), инкубировали 1 час при 37°C, высевали на LB-агар (таблица 2), содержащий ампициллин (200 мкг/мл), и растили при 37°C.

Выросшие колонии отбирали и ресуспендировали в 20 мкл стерильной воды, после чего инкубировали 10 мин при 95°C и центрифугировали (2 мин). Анализ размера вставок проводили ПЦР-скринингом, используя 8 мкл лизата клеточной суспензии, Taq ДНК-полимеразу (Евроген, Россия), стандартные T7 праймеры. Условия ПЦР: 95°C в течение 1 мин; 20 циклов (95°C – 20 с, 56°C – 30 с, 72°C – 1 мин); 72°C в течение 7 мин. Концентрацию и молекулярный вес ПЦР-продуктов определяли электрофоретически в 1% агарозном геле вместе с 1 kb ДНК-маркером молекулярного веса (СибЭнзим, Россия).

## **2.6 Выделение плазмидной ДНК**

Колонии штамма *E. coli* XL1-Blue отдельно друг от друга засевали в 5 мл LB среды с ампициллином в концентрации 200 мг/л, инкубировали в течение суток при 37°C. Биомассу центрифугировали 10 мин при 3500 g, надосадочную жидкость

удаляли. Набором GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, США) из клеток выделяли плазмидную ДНК, в соответствии с протоколом производителя. Методом агарозного гель-электрофореза в 1% геле определяли концентрацию ДНК, в качестве стандарта использовали 1kb ДНК-маркер молекулярного веса (Сибэнзим, Россия). Точную концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически на приборе NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, США).

Полученные нуклеотидные последовательности проверяли секвенированием в ЦКП «Геномика» СО РАН (Новосибирск, Россия).

## **2.7 Получение биомассы рекомбинантных бактериальных штаммов-продуцентов**

Для получения штаммов-продуцентов рекомбинантных белков к суспензии компетентных клеток *E. coli* BL21(DE3) Codon Plus (RIPL) (49 мкл) добавили 1 мкл раствора соответствующей плазмидной ДНК и инкубировали при 0°C в течение 30 мин. Затем суспензию прогревали при 42°C на водяной бане WB-4MS («Biosan», Латвия) в течение 30 сек и снова переносили на лед. Далее клетки обрабатывали, как описано выше для штамма XL1-Blue.

2-4 колонии рекомбинантных клеток, трансформированных соответствующей плазмидой, засеивали в 200 мл LB-среды, содержащей ампициллин (200 мг/л), культивировали с активным перемешиванием при 37°C до оптической плотности равной 0,6 при длине волны 600 нм (ОП<sub>600</sub>). Индукцию синтеза белков проводили добавлением 1 мМ ИПТГ, культивировали еще в течение 3-х часов, а после осаждали клетки центрифугированием (3500 g, 15 мин, 4°C).

## **2.8 Получение рекомбинантного сурвивина**

Клеточную массу штамма-продуцента сурвивина ресуспендировали в пятикратном (к весу) объеме буфера Т (таблица 2) и разрушали с помощью

ультразвукового дезинтегратора УЗДН-2Т («Академприбор», Украина) 8 раз по 20 сек на льду.

Полученный грубый лизат центрифугировали (6000g, 10 мин, 4°C), осаждённые тельца-включения ресуспендировали буфером Т, содержащим последовательно: 0,9% NaCl; 0,1% Тритон Х-100; 5 мМ CaCl<sub>2</sub>. Тельца-включения после промывок растворяли в 5-кратном объеме буфера А.

Растворённые тельца включения наносили на колонку Hi Trap DEAE FF (5 мл, GE HealthCare), уравновешенную буфером А и хроматографировали с помощью системы BioLogic LP (Bio-Rad). Белки с колонки элюировали линейным градиентом буфера Б (0-90%) (таблица 2). Фракцию, содержащую целевой белок, отбирали и проводили диализ против буферного раствора, содержащего 0,6 М мочевины в 20 мМ Трис-НСl рН 8,0. Молекулярный вес и чистоту белкового препарата оценивали при помощи электрофореза в 15% полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях. Концентрацию белка измеряли спектрофотометрически по методу Лоури с использованием набора DC Protein Assay (Bio-Rad, США).

## 2.9 Получение гибридного белка Surv-OL

Биомассу клеток штамма-продуцента сурвивина-обелина разрушали и обрабатывали способом, как описано ранее при получении сурвивина. Тельца-включения, растворённые в буфере А, наносили на колонку Hi Trap DEAE FF (5 мл, GE HealthCare), уравновешенную буфером А и хроматографировали с помощью системы BioLogic LP (Bio-Rad) в градиенте буфера Б.

Активацию апобелка проводили 1,2-кратным молярным избытком целентеразина в десятикратном объеме буфера ТЕ (таблица 2), содержащем 10 мМ ДТТ, при 4°C в течение суток.

Фотопротеины отделяли от незаряженных апобелков с помощью ионообменной хроматографии с использованием колонки Mono Q 5/50 GL (GE Healthcare, Великобритания), уравновешенной буфером ТЕ, на

хроматографической системе АКТА purifier (GE Healthcare, Великобритания). Элюцию белков с колонки проводили градиентом NaCl (0-0,7M). Активность полученных фракций измеряли на кюветном люминометре (модель БЛМ 8802, СКБ Наука, Красноярск). Измерения проводили в 0,1 М Tris-HCl pH 8,8, содержащем 10 mM ЭДТА, сразу после добавления кальциевого буфера. Чистоту белкового препарата проверяли 12,5% ПААГ-электрофорезом в денатурирующих условиях.

## **2.10 Электрофорез белковых молекул в полиакриламидном геле**

Электрофорез белковых молекул проводили в 12,5% и 15% полиакриламидном геле (ПААГ), содержащем 0,1% SDS, по методу Лэммли [122] с использованием камеры (Corning, США) в буфере TGB (таблица 2) и с постоянной подачей тока 15 mA. Денатурированные образцы готовили с использованием лизирующего буфера (0,1 М Tris, pH 7,0, 3% SDS, 10% глицерол, 0,05% бромфеноловый синий), кипятили в течение 5 мин и наносили на гель. При проведении электрофоза в нативных условиях, из всех растворов исключали SDS, а образцы перед нанесением не денатурировали термически.

Для окрашивания гелей использовали раствор Coomassie G-250 (Bio-Rad, США) в смеси 7,5% уксусной кислоты в 50% этаноле с последующей промывкой дистиллированной водой. Съемку гелей при естественном освещении осуществляли в камере AlphaImager (AlphaInnotech, США).

## **2.11 Твердофазный биолюминесцентный иммуноанализ рекомбинантного сурвивина**

В лунки непрозрачного стрипового планшета (Costar, США) вносили по 50 мкл разведений сурвивина (в концентрации 500, 1000 и 2000 пМ) в двух повторах. Параллельно в лунки вносили коммерческий гибридный белок сурвивин-кальмодулин (Abcam, Великобритания) аналогичным образом. В контрольную лунку вносили 50 мкл буфера Т. Инкубировали при 37°C в течении 1 часа со

встряхиванием (350 об/мин), и промывали 5 раз промывочным буфером №1 (таблица 2). Для забивки свободной поверхности в лунки вносили по 150 мкл 1% раствора БСА в буфере PBS pH 7,5. Инкубацию и промывку проводили так же, как и после предыдущего шага. После в лунки внесли по 50 мкл раствора антител к сурвивину (Abscam, Великобритания) с концентрацией 1 мкг/мл. Инкубировали и промывали как описано ранее. В качестве метки использовали гибридный белок proZZ-OL –добавляли по 50 мкл раствора в ТЕ буфере в концентрации 0,1 мкг/мл в каждую лунку. Инкубировали и промывали как описано выше.

Биолюминесценцию сформированных на поверхности комплексов измеряли с помощью планшетного люминометра Mithras LB 940 Multimode Reader (Berthold, Германия), снабженного высокоскоростным автоматическим инжектором, сразу после впрыскивания 60 мкл кальциевого буфера. Время интегрирования сигнала - 5 секунд. В результатах учитывали полученное усреднённое значение биолюминесцентного сигнала (2 повтора).

## **2.12 Определение константы аффинности анти-сурвивин антител**

В лунки стрипового планшета (NEST, КНР) вносили раствор сурвивина в буфере PBS pH 7,5 с концентрацией 2 мкг/мл и инкубировали при 37°C в течение часа со встряхиванием, затем промывали 3 раза промывочным буфером №1. Для покрытия оставшейся свободной поверхности в лунки вносили по 300 мкл 2% раствора БСА в PBS pH 7,5 с 0,05% Tween-20, инкубировали и промывали как описано ранее для предыдущего шага. Далее вносили по 100 мкл серию разведений исследуемых антител в концентрации от 500 нМ до 9 пМ с шагом 3 в PBS pH 7,5 и инкубировали в течение часа при 23°C. Промывали, как описано ранее. Для выявления связавшихся антител, в лунки добавляли по 100 мкл раствора гибридного белка proZZ-OL с концентрацией 0,1 мкг/мл в буфере для фотопротеинов (20 mM Трис-НСl pH 7,0, 5 mM ЭДТА, 0,15 M NaCl и 0,1% БСА). После инкубации с гибридным белком лунки планшета промывали 5 раз. Биолюминесценцию сформированных на поверхности комплексов измеряли как

описано выше. В результатах учитывали полученное усреднённое значение биолюминесцентного сигнала (3 повтора). Константу диссоциации антител определяли по уравнению из [123]

$$\frac{L}{L_{\max}} = \frac{x + R + K_D - \sqrt{(x + R + K_D)^2 - 4xR}}{2}$$

где  $L$  – интегральный биолюминесцентный сигнал от образца;  $L_{\max}$  – интегральный биолюминесцентный сигнал от образца с насыщающей концентрацией антител;  $R$  – концентрация адсорбированного антигена;  $x$  – концентрация антитела в растворе, добавленном в лунку планшета;  $K_D$  – константа диссоциации. Константу аффинности ( $K_{\text{aff}}$ ) определяли как величину, обратную константе диссоциации ( $K_D$ ).

### **2.13 Определение предела обнаружения биолюминесцентных репортёров на основе фотопротейна обелина и люциферазы NanoLuc**

Для определения предела обнаружения в лунки иммунологического микропланшета вносили серию разведений специфических биолюминесцентных репортёров на основе фотопротейна или люциферазы NanoLuc по 80 мкл в лунку, от 10 нг/мл до  $10^{-10}$  нг/мл с шагом 10. В контрольную лунку вместо раствора белка вносили буфер. Биолюминесценцию белков измеряли с помощью планшетного люминометра Mithras LB 940 Multimode Reade сразу после впрыскивания 100 мкл кальциевого буфера для фотопротейна обелина, или 100 мкл свежеприготовленного раствора фуримазина (1 мМ в 20 мМ Tris-HCl pH 8.0, 0,15 М NaCl) для люциферазы NanoLuc. Время интегрирования сигнала - 5 секунд. Измерения проводили как минимум в 3-х повторностях.

Пределом обнаружения фотопротейна считали такое количество белка, при котором сигнал от образца в 2 раза превышал сигнал от контрольной лунки, содержащей равный объем буфера.

Пределом обнаружения люциферазы считали такое количество белка, при котором сигнал от образца соответствовал сигналу контрольной лунки плюс 3 стандартных отклонения.

#### **2.14 Билюминесцентный твердофазный анализ сурвивина конкурентного типа**

В лунки стрипового планшета (Costar, США) вносили по 100 мкл раствора антител к сурвивину (Novus Biologicals, США) в буфере PBS pH 7,5 с концентрацией 0,5 мкг/мл. Сорбция проводилась в течение суток при 4°C без встряхивания. Далее планшет 4 раза промыли промывочным буфером №1.

Для забивки свободной поверхности в лунки вносили по 150 мкл 1% раствора БСА в буфере PBS 7,5. Далее в лунки планшета вносили смеси рекомбинантного сурвивина и гибридного белка сурвивин-обелин в PBS pH 7,5 с 5 мМ ЭДТА или в контрольной моче. Концентрацию сурвивина варьировали в диапазоне от 54 нг/мл до 0,2 нг/мл, а концентрация гибридного белка была одинаковой и составляла 1 нг/мл. В нулевую лунку добавляли раствор гибридного белка без сурвивина. Далее инкубировали при 25°C в течение часа, со встряхиванием (400 об/мин). Промыли как описано ранее.

Билюминесценцию сформированных на поверхности комплексов измеряли как описано выше.

#### **2.15 Химический синтез конъюгатов анти-сурвивин антител с билюминесцентными белками**

Поликлональные антитела мыши модифицировали 70-кратным молярным избытком сукцинимидил-(N-малеимидометил) циклогексан-1-карбоксилата (SMCC) в 50 мМ бicine pH 8,5 в течение 2 часов при 25°C. Избыток SMCC после реакции отделяли гель-фильтрацией на колонке HiTrap Desalting (GE Healthcare, Великобритания), уравновешенной буфером TE при получении конъюгата с

обелином и 50 мМ фосфатным буфером рН 7,0 при получении конъюгата с NanoLuc.

SMCC-активированный иммуноглобулин и соответствующий биолюминесцентный белок – фотопротейн обелин А6С или люцифераза NLuc(C164S)LCTPSR, смешивали в молярном соотношении 1:10 и инкубировали при 4°С в течение ночи. Полученный конъюгат выделяли гель-фильтрацией на колонке Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare, Великобритания), уравновешенной буфером TE с добавлением 150 мМ NaCl при получении конъюгата с обелином и PBS рН 7,0 при получении конъюгата с NanoLuc. Биолюминесцентную активность фракций, полученных при гель-фильтрации, определяли, как описано ранее для соответствующих биолюминесцентных белков.

## **2.16 Биолюминесцентный твердофазный анализ сурвивина «сэндвич»**

### **типа**

В лунки непрозрачного стрипового планшета (NEST, КНР) вносили по 100 мкл раствора мышинных поликлональных антител к сурвивину в PBS 7,5 с концентрацией 3 мкг/мл. Сорбция проводилась в течение суток при 4°С без встряхивания. После сорбции планшет 4 раза промыли промывочным буфером №1. Далее промывали промывочным буфером №1 при иммуноанализе с обелином и промывочным буфером №2 при иммуноанализе с NanoLuc.

Для забивки свободной поверхности в лунки вносили по 300 мкл 5% обезжиренного сухого молока в PBS рН 7,5 с 0,05% Tween-20 и 20 мМ ЭДТА. Инкубировали со встряхиванием (400 об/мин) в течение часа при 25°С и промывали так же, как и после предыдущего шага. Далее в лунки планшета вносили растворы сурвивина в PBS рН 7,5, содержащем также 0,1 мг/мл БСА и 0,1% Tween-20, или в образце мочи здорового человека, содержащем 0,1 М фосфатный буфер рН 7,5 (0,1 М) и Tween-20 (0,05%). Диапазон концентраций сурвивина составлял от 27 нг/мл до 0,125 нг/мл для иммуноанализа с обелином и от 2000 пг/мл до 15,6 пг/мл для

иммуноанализа с NanoLuc. При исследовании клинических образцов больных РМП, в мочу пациентов добавляли фосфатный буфер и Tween-20 как для стандартных растворов сурвивина в моче здорового человека. Инкубировали при комнатной температуре 2 часа, со встряхиванием (400 об/мин). Промывали, как описано ранее. Затем вносили раствор конъюгата поликлонального антитела сурвивина с обелином (50 нг/мл, в ТЕ буфере с 0,05% Tween-20 и 0,1 мг/мл БСА), или с NanoLuc (300 нг/мл, в PBS pH 7,5 с 0,05% Tween-20 и 0,1 мг/мл БСА). Инкубировали 1 час при комнатной температуре, промывали 6 раз с инкубацией в течение 1 минуты между промывками.

Биолюминесценцию сформированных на поверхности комплексов измеряли с помощью планшетного люминометра Mithras LB 940 Multimode Reader сразу после впрыскивания 100 мкл кальциевого буфера для иммуноанализа с обелином, или 100 мкл свежеприготовленного раствора FMZ (1 мМ в 20 мМ Tris-HCl pH 8,0, 0,15 М NaCl) для иммуноанализа с NanoLuc. Время интегрирования сигнала 5 секунд. В результатах учитывали полученное усреднённое значение биолюминесцентного сигнала (3 повтора).

## **2.17 Измерение CYFRA 21-1 в клинических образцах мочи**

Для измерения CYFRA 21-1 использовали набор «CYFRA 21-1-ИФА-БЕСТ» по инструкции производителя, при этом в лунки вместо образцов сыворотки вносили образцы мочи.

При работе с образцами мочи, набор исследовали по параметрам линейности и восстановления определения аналита. Для исследования линейности образцы мочи с высокой концентрацией CYFRA 21-1 последовательно разводили с шагом 2 стандартным разбавителем и измеряли концентрацию аналита, полученное значение умножали на 2 и сравнивали с исходным для неразведённого образца. При проведении теста на восстановление в образец мочи здорового человека либо в образец стандартного разбавителя добавили CYFRA 21-1 из калибровочного

образца набора с наибольшей концентрацией до расчетной финальной концентрации 5 нг/мл. После определения аналита сравнивали полученные значения для калибратора и мочи здорового человека (с учётом эндогенного содержания CYFRA 21-1 в моче до добавления калибратора).

## **2.18 Программное обеспечение и статистическая обработка результатов**

Данные обрабатывали с использованием программного пакета Microsoft Excel для Windows 10, статистического программного обеспечения MedCalc (MedCalc Software Ltd, Бельгия) и Sigma Plot (Systat Software, США). Для определения уравнения кривой, наилучшим образом описывающей полученные данные иммуноанализа использовали программное обеспечение CurveExpert Basic (Hyams Development, Великобритания). Анализ ПААГ-электрофореграмм проводили при помощи программного обеспечения GelAnalyzer 23.1 (Венгрия). Для сравнения количественных данных использовался U-тест Манна-Уитни. Для работы с категориальными данными использовали критерий  $\chi^2$ . Статистически значимым считался уровень  $p < 0,05$ . Для оценки эффективности диагностических тестов использовали следующие параметры: чувствительность, специфичность, площадь под ROC-кривой (Area Under Curve – AUC), положительная прогностическая ценность (Positive Predictive Value – PPV), отрицательная прогностическая ценность (Negative Predictive Value – NPV), точность теста.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1 Получение рекомбинантного сурвивина

#### 3.1.1 Создание генетической конструкции, кодирующей сурвивин

Одной из задач при разработке иммуноанализа является получение препарата исследуемого белка высокой степени очистки. Наиболее простым вариантом получения рекомбинантного белка является его экспрессия в бактериальных клетках *E. coli*. Этот подход оптимален для белков, не требующих сложных посттрансляционных модификаций. Последовательность сурвивина, длиной 142 а.к., не содержит ни одного дисульфидного моста, что потенциально показывает отсутствие сложностей при экспрессии данного белка в бактериальных клетках. Нами была использована кодон оптимизированная для экспрессии в бактериальных клетках нуклеотидная последовательность, кодирующая сурвивин. Получена генетическая вставка сурвивина фланкированная сайтами рестрикции *NcoI* и *XhoI* (электрофореграмма на рис.3.1а) и клонирована в вектор pET-19b.

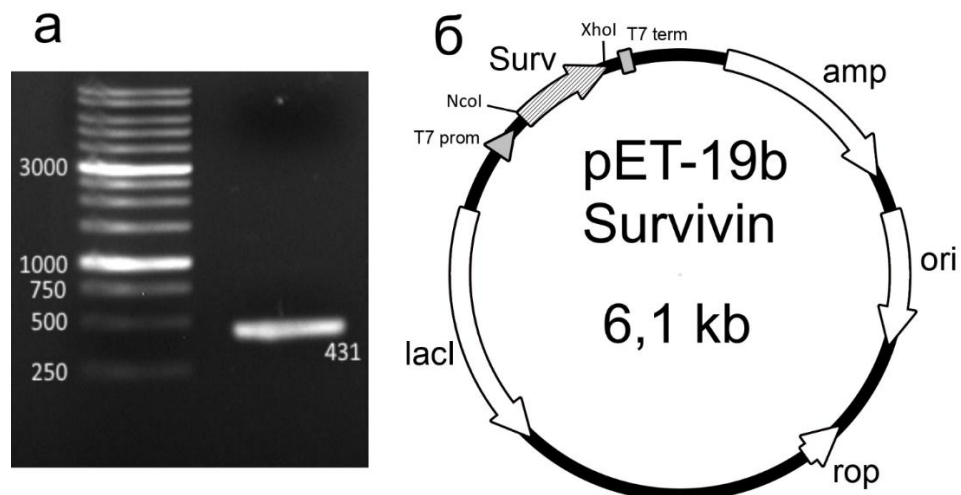


Рис.3.1. (а) – электрофореграмма ПЦР-вставки сурвивина после очистки препаративным электрофорезом; (б) – строение генетической конструкции, обеспечивающей экспрессию сурвивина в бактериальных клетках. *Surv* – ген, кодирующий сурвивин; *lacI* – репрессор лактозного оперона; *amp* –  $\beta$ -лактамазу; *NcoI*, *XhoI* – сайты рестрикции.

Таким образом, получена плазмида pET-19b-Survivin (рис.3.1б), обеспечивающая экспрессию целевого белка в клетках *E.coli*. Экспрессионная система pET обеспечивает высокий уровень продукции рекомбинантных белков за счёт использования T7 РНК-полимеразы, которая настолько активна и селективна, что направляет практически все ресурсы клетки на экспрессию целевого гена [124].

### 3.1.2 Получение очищенного препарата рекомбинантного сурвивина

Клетки *E. coli* штамма RIPL, трансформированные плазмидой pET-19b-Survivin культивировали, как описано в главе 2. Биомассу клеток-продуцентов сурвивина подвергали УЗ-дезинтеграции, центрифугировали и определяли содержание сурвивина в супернатанте и осадке с помощью гель-электрофореза по Лэммли (Рис. 3.2). Как видно из рисунка, подавляющее большинство рекомбинантного сурвивина агрегирует в клетках штамма-продуцента, формируя тельца-включения. Дальнейшую очистку белка из мочевинового экстракта телец-включений проводили хроматографически на колонке HiTrap DEAE FF в денатурирующих условиях (все буферные растворы содержали 6М мочевины). Для рефординга сурвивина из денатурированного состояния был проведён диализ полученной фракции против буферного раствора без мочевины. Однако, в ходе диализа из раствора выпал значительный осадок. После диализа состав осадка и надосадочной жидкости анализировали электрофоретически, полученные результаты представлены на рисунке 3.3.

Как показал электрофоретический анализ, в надосадочной жидкости осталось лишь незначительное количество целевого белка. Сурвивин агрегировал и выпал в осадок несмотря на то, что изоэлектрическая точка сурвивина находится при рН 5,7, в то время как рН буферного раствора был 8,0.

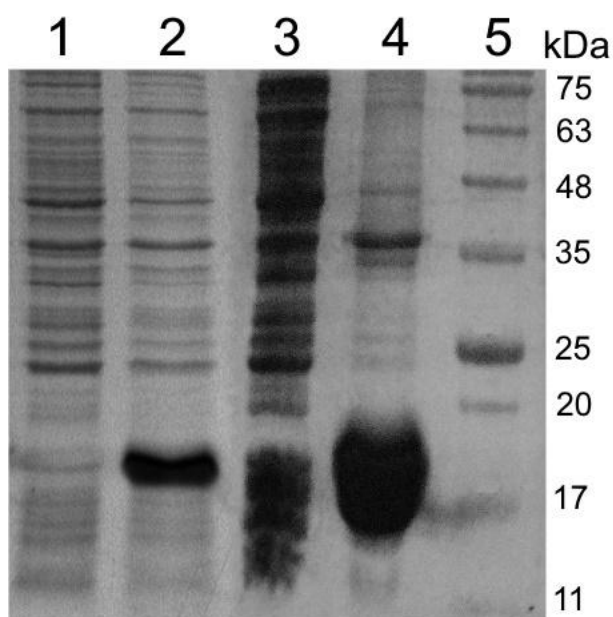


Рис.3.2. 15%-ПААГ электрофорез растворимой и нерастворимой фракции лизата клеток *E. coli*, несущих генетическую конструкцию рЕТ-19b-Survivin. 1,2 – клетки до и после индукции синтеза белка; 3 – осветлённый лизат; 4 – экстракт телец-включений в растворе 6М мочевины; 5 – маркерные белки.

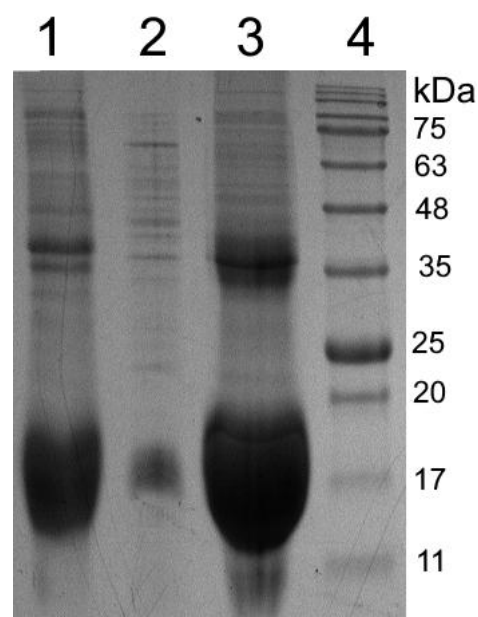


Рис.3.3. 15%-ПААГ электрофорез осадка (3) и надосадочной (2) жидкости после проведения диализа. 1 – экстракт телец-включений в 6М мочевины, 4 – маркерные белки.

Очевидно, данный белок не способен существовать в растворе при высоких концентрациях без присутствия хаотропных агентов, таких как мочевина.

Склонность сурвивина к образованию агрегатов можно объяснить его структурными особенностями (Рис. 1.1.): радикалы аминокислот вогнутой стороны димера сурвивина преимущественно гидрофобной природы, кроме того, С-концевая  $\alpha$ -спираль сурвивина имеет крупный гидрофобный кластер, при помощи которого белок связывается с митотическим веретеном при регуляции клеточного деления.

После проведения повторного диализа против буфера, дополнительно содержащем 0,6 М мочевины выпадение осадка замечено не было. Концентрация мочевины 0,6 М была выбрана как компромисс между поддержанием нативной структуры белка и предотвращением агрегации в белковые конгломераты.

Электрофоретический анализ очищенного препарата сурвивина после диализа приведён на рисунке 3.4а.

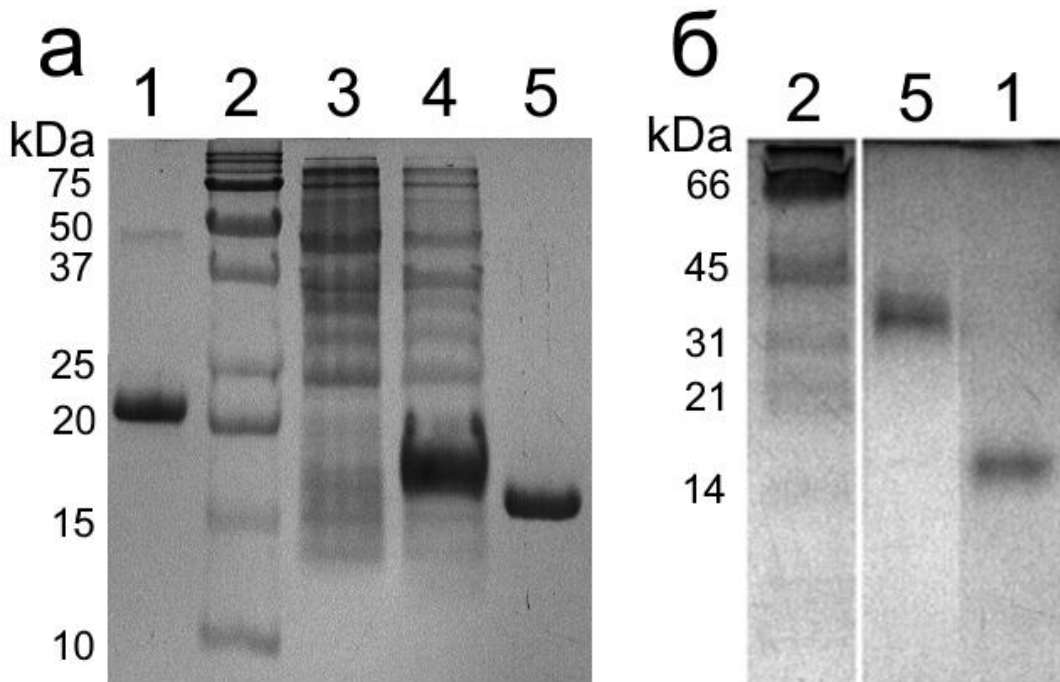


Рис.3.4. 15%-ПААГ электрофорез образцов сурвивина в денатурирующих (а) и нативных (б) условиях. 1 – обелин (22,2 кДа); 2 – маркерные белки; 3,4 – клетки до и после индукции; 5 – препарат очищенного сурвивина.

Для подтверждения димерной структуры сурвивина был проведён электрофоретический анализ полученного препарата белка в нативных условиях (рисунок 3.4б). Видно, что в нативных условиях сурвивин имеет примерно в 2 раза больший молекулярный вес, что подтверждает склонность полученного нами рекомбинантного сурвивина к образованию димера, как и у природного сурвивина.

Чистота полученного белкового препарата составила 96%, что является очень высоким показателем. Выход белка с 1 литра культуры составил 72,8 мг.

### 3.1.3 Проверка биоспецифичности полученного белка

Биоспецифичность полученного рекомбинантного сурвивина оценивали по его способности связываться с соответствующими анти-сурвивиновыми антителами в ходе биолюминесцентного твердофазного микроанализа. Сурвивин иммобилизовали на поверхности лунки планшета прямой сорбцией и выявляли,

последовательно добавив анти-сурвивиновые антитела и proZZ-OL (схема на рис. 3.5). Сформированные на поверхности лунки планшета комплексы выявляли по биолюминесценции при впрыске раствора кальция.

Как видно из рис. 3.5, получена зависимость биолюминесцентного сигнала от содержания сурвивина в образце, что подтверждает способность полученного рекомбинантного белка «быть узнаваемым и связанным» соответствующими антителами.

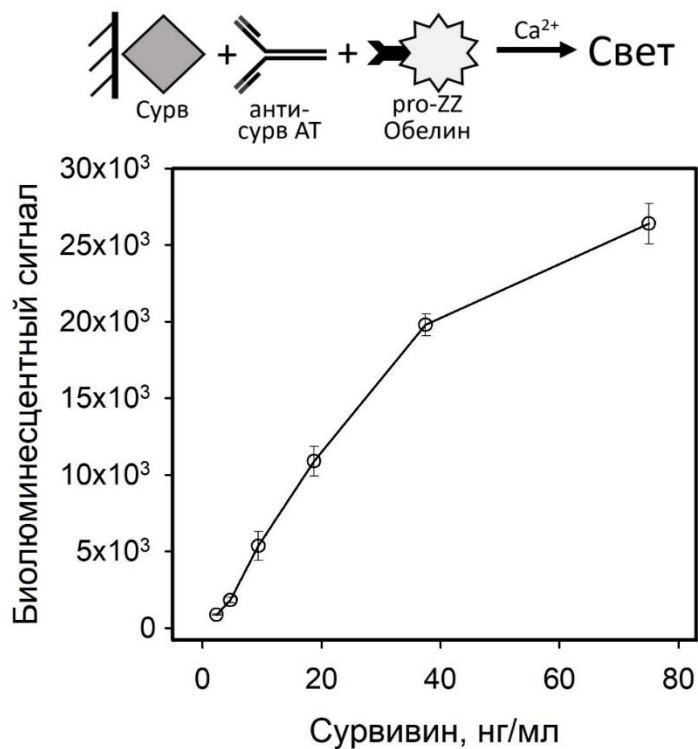


Рис.3.5. Анализ связывания рекомбинантного сурвивина анти-сурвивиновыми антителами

Для сравнения полученного образца сурвивина с коммерческим аналогом провели аналогичный анализ с использованием коммерческого образца белка, представляющего из себя гибрид сурвивина и кальмодулина. Результаты представлены на рисунке 3.6.

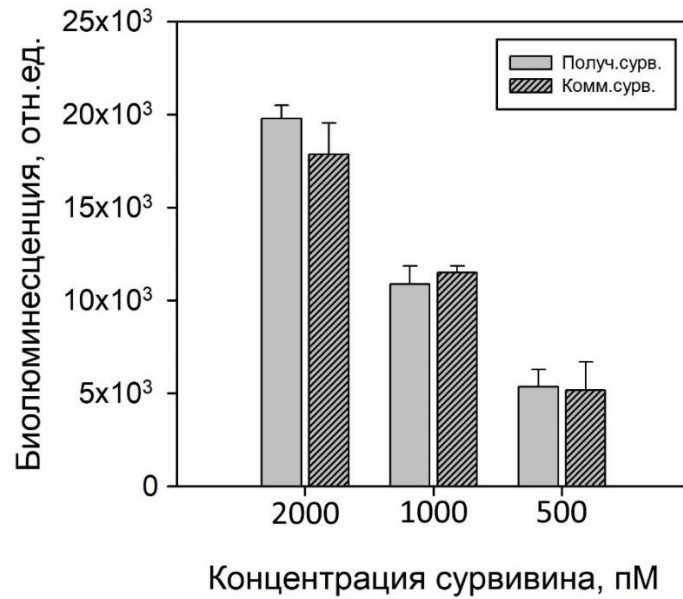


Рис.3.6. Сравнение полученного и коммерческого сурвивина в анализе связывания с иммуноглобулинами. N=3

Как видно из Рис.3.6, разница в сигналах оказалась незначительной и колебалась в пределах 10%. Данный эксперимент показал, что полученный рекомбинантный сурвивин не уступает коммерческому по эффективности связывания с антителами. Полученный высокоочищенный препарат рекомбинантного сурвивина использовали в дальнейшем в качестве аналита при разработке биолюминесцентного иммуноанализа сурвивина в моче.

### 3.1.4 Исследование аффинности образца поликлональных анти-сурвивин антител

Так как одним из важнейших параметров, определяющим чувствительность иммуноанализа является эффективность формирования иммунного комплекса, была исследована аффинность полученных коллегами из ИБХМ СО РАН мышинных поликлональных анти-сурвивин антител. Аффинность определяли при помощи анализа с использованием бифункционального гибридного белка proZZ-OL, который обладает способностью связываться с константными участками антител и биолюминесценцией обелина.

В лунки планшета, поверхность которого была активирована рекомбинантным сурвивином, вносили серию разведений исследуемых антител. После инкубации, иммунокомплексы выявляли раствором proZZ-OL, билюминесценцию запускали раствором кальция (схема аналогична анализу на рис.3.5). Точно таким же способом исследовали коммерческие моноклональные антитела к сурвивину от фирмы CloudClone (США). Билюминесцентный сигнал нормировали по максимуму. Полученная кривая нормированной билюминесценции в зависимости от концентрации антител приведена на рисунке 3.7.

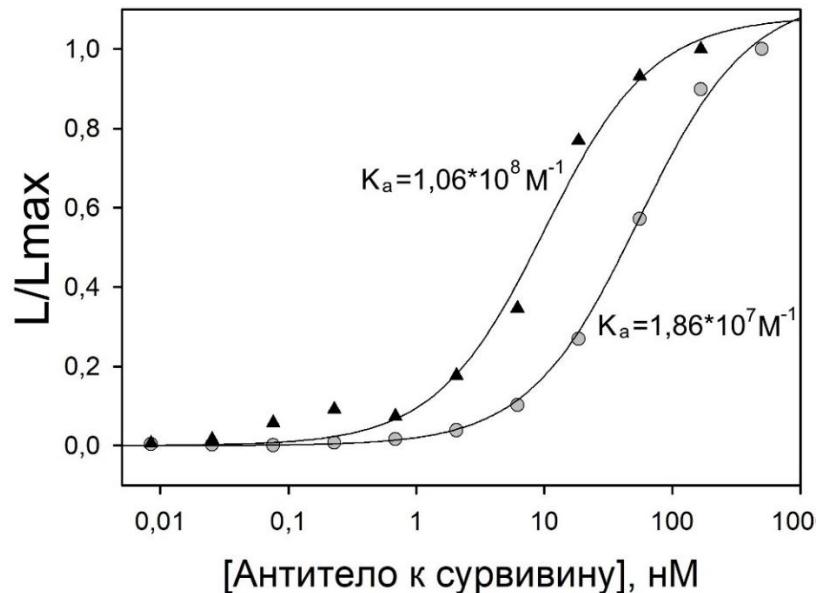


Рис.3.7. Билюминесцентный иммуноанализ связывания поликлональных (-●-) и коммерческих моноклональных (-▲-) анти-сурвивин антител с рекомбинантным сурвивином; билюминесцентные сигналы нормированы по максимуму. Каждая точка – среднее от трёх независимых измерений.

В результате эксперимента получена зависимость билюминесцентного сигнала от количества антител в широком концентрационном диапазоне, включающем как точки с пределом насыщения, так и с низкой концентрацией, билюминесценция которых не отличалась от лунок с буферным раствором. Это позволило рассчитать константу диссоциации антител по уравнению из работы Beatty с коллегами [125] (см. Главу 2). Константу аффинности ( $K_{aff}$ ) определяли как

величину, обратную константе диссоциации. В итоге, определённая  $K_{\text{aff}}$  поликлональных анти-сурвивин антител составила  $1,86 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ , а коммерческих моноклональных –  $1,06 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ .

Однако несмотря на то, что рассчитанная  $K_{\text{aff}}$  моноклональных антител примерно в 5 раз больше, биолюминесцентные сигналы при проведении анализа с этими антителами оказались примерно в 6 раз ниже (в диапазоне 5-120 нМ). Ненормированная биолюминесцентная кривая в зависимости от концентрации антител приведена на рисунке 3.8.

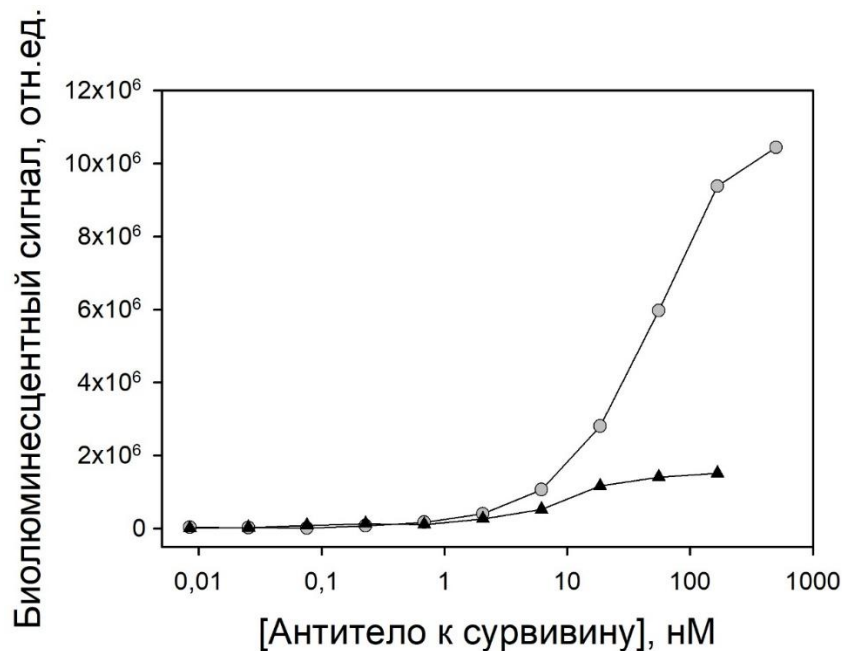


Рис.3.8. Биолюминесцентный иммуноанализ связывания поликлональных (-●-) и коммерческих моноклональных (-▲-) анти-сурвивин антител с рекомбинантным сурвивином, биолюминесцентный сигнал не нормирован. Каждая точка – среднее от трёх независимых измерений.

По всей видимости, это можно объяснить различием в природе исследуемых антител – моноклональные антитела однородны и имеют всего 1 сайт связывания на антигене, благодаря чему быстро достигают предела насыщения с относительно небольшим сигналом. Поликлональные антитела представляют собой гетерогенную смесь иммуноглобулинов, распознающие разные эпитопы на поверхности мишени, из-за чего к антигену может присоединиться несколько антител. Благодаря этому, предел насыщения достигается при намного более

высоких концентрациях антител и, как следствие, более высоком биолюминесцентном сигналом в анализе. Поэтому поликлональные антитела не совсем корректно описывать с точки зрения аффинности, т.к. именно аффинностью обладают отдельные пулы антител в гетерогенной смеси, а их совокупная, функциональная сила связывания называется авидностью [126]. Таким образом, несмотря на более высокое значение  $K_{\text{aff}}$  полученное для моноклональных антител, было решено использовать поликлональные антитела к сурвивину в иммуноанализе «сэндвич» формата сурвивина из-за намного более высокого предела насыщения, а также их дешевизны и доступности.

### **3.2 Биолюминесцентный иммуноанализ сурвивина на основе фотопротеина обелина**

Люциферазы привлекают исследователей для использования в качестве репортёров благодаря высокому квантовому выходу реакции, которую они катализируют, и низкому уровню шумового сигнала, которым, например, не отличаются флуоресцентные репортёры. Фотопротеин обелин представляет собой фермент-субстратный комплекс, который при связывании ионов кальция окисляет субстрат с выделением углекислого газа и квантов света. Обелин всесторонне изучен относительно биохимических и биофизических свойств, третичной структуры, механизма биолюминесценции [см., напр., 127]. Эти знания, наряду с возможностью получения практически неограниченного количества рекомбинантного обелина и его различных генетически-модифицированных вариантов с новыми полезными свойствами, служат основой для разработки уникальной биолюминесцентной детекционной системы, которая является «автономной», легко запускаемой, быстрой и высокочувствительной.

### **3.2.1 Конкурентный вариант иммуноанализа**

Иммуноанализ – это разнообразная группа аналитических методов, используемых для качественного или количественного определения веществ в образце за счёт способности антитела специфично связываться с антигеном. Все иммуноаналитические методы можно разделить на конкурентные и неконкурентные.

В конкурентном варианте иммуноанализа выявление антигена происходит за счёт одновременного присутствия антигена и его меченого аналога в системе, конкурирующих за ограниченное количество мест специфического связывания. Преимуществами такого формата является скорость проведения анализа, а также требование всего 1 эпитопа на поверхности мишени и, соответственно, антитела, что удобно для анализа молекул небольшого размера [128].

Чаще всего используемым неконкурентным вариантом иммуноанализа является «сэндвич» формат. В ходе данного анализа антиген фиксируется между иммобилизованным антителом и меченым антителом, образуя трёхслойный комплекс, за счёт чего и получил своё название. Требуется больше времени для его проведения из-за большого количества стадий и по крайней мере 2 эпитопа на исследуемой молекуле. Преимуществом является высокая по сравнению с другими форматами чувствительность [129].

#### **3.2.1.1 Получение гибридного белка сурвивин-обелин (Surv- OL)**

Для проведения конкурентного иммуноанализа необходимо наличие антигена, меченого репортёрной молекулой. В случае с обелином, это может быть достигнуто за счёт химической конъюгации или за счёт слияния на уровне генов. При химической конъюгации неизбежно теряется часть специфической активности как антигена, так и метки, а также требуются дополнительные процедуры и реагенты для получения меченого антитела. Генетическое слияние требует предварительной работы по получению генетической конструкции, кодирующей

меченый антиген, но активность доменов, входящих в состав слитого белка, будет выше, т.к. при химической конъюгации неизбежно происходят нецелевые реакции ведущие к потере активности. Важно при этом чтобы домены, входяие в состав гибридного белка сохранили активность исходных белков и не ингибировали друг друга.

Были получены генетические вставки кодирующие сурвивин и обелин, а также гибкий линкер, которые клонированы в вектор рЕТ-19b. Полученной генетической конструкцией рЕТ-19b-Surv-OL (рисунок 3.9а) трансформировали клетки штамма RIPL. Клетки культивировали, полученную биомассу разрушали ультразвуковой обработкой. Белковый состав образцов, полученных при анализе экспрессии белка и его распределении в клетках определяли с помощью гель-электрофореза в денатурирующих условиях.

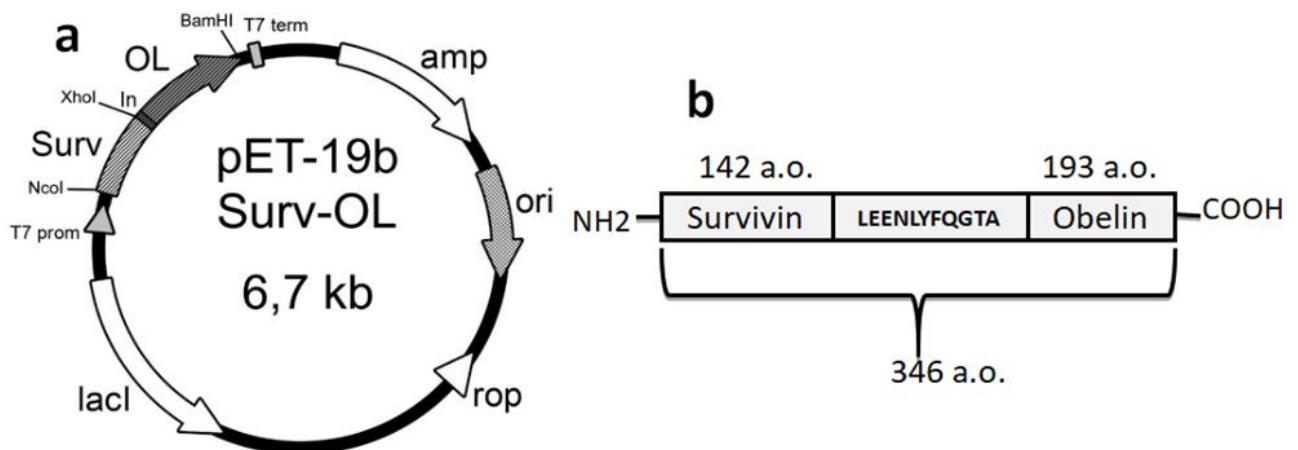


Рис.3.9. Строение плазмиды (а) и гибридного белка Surv-OL (b). Surv – ген, кодирующий сурвивин; OL – обелин; lacI – репрессор лактозного оперона; amp – β-лактамазу; ln - линкер; NcoI, XhoI, BamHI – сайты рестрикции.

По результатам электрофоретического анализа (рис. 3.10) видно, что после индукции ИПТГ в белковом составе культивируемых клеток появилась яркая полоса на уровне 39,6 кДа, что соответствует расчетной молекулярной массе гибридного белка. Подавляющая часть целевого белка находилась в нерастворимой фракции клеточного лизата.

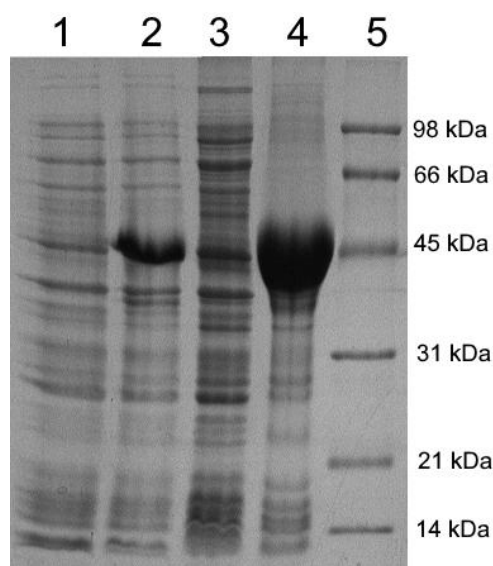


Рис.3.10. 12,5%-ПААГ электрофорез фракций лизата клеток *E.coli*, несущих генетическую конструкцию pET-19b-Surv-OL. 1,2 – клетки до и после индукции синтеза белка; 3 – осветлённый лизат; 4 –экстракт телец-включений в растворе 6М мочевины; 5 – маркерные белки.

Мочевинный экстракт телец-включений очищали хроматографически в денатурирующих условиях на колонке HiTrap DEAE FF в градиенте ацетата натрия. После хроматографической очистки, проводили активацию гибридного апобелка избытком целентеразина. Активированные фотопротеины отделяли от незаряженных белков с помощью ионообменной хроматографии на колонке Mono Q HP градиентом NaCl.

Чистоту полученного активированного субстратом Surv-OL определяли при помощи электрофоретического анализа в денатурирующих условиях (рис. 3.11).

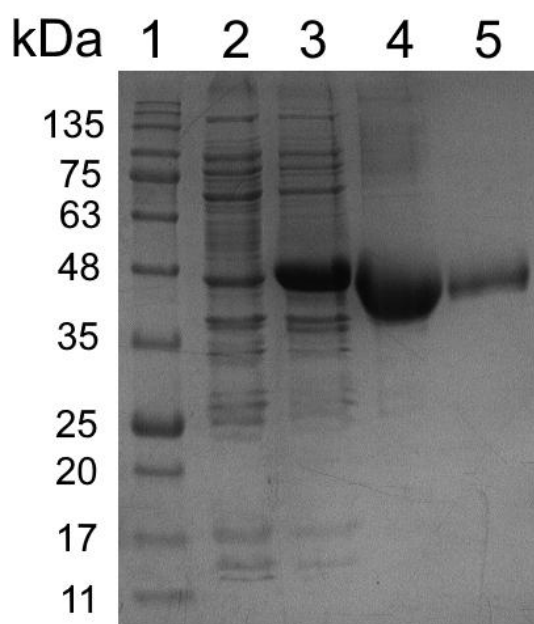


Рис.3.11. 12,5% ПААГ-электрофорез образцов при выделении и очистке гибрида Surv-OV. 1 – маркерные белки; 2,3 – клетки до и после индукции; 4 – экстракт телец-включений в растворе 6М мочевины; 5 – очищенный препарат сурвивина-обелина после активации целентеразином.

Полученный белковый препарат был 94% чистоты, выход целевого гибридного белка составил 17,5 мг с 1 литра бактериальной культуры.

### 3.2.1.2 Биохимические свойства гибридного белка

Предел обнаружения фотопротеина определяли по сигналу образца, в 2 раза превышающего сигнал от контрольной лунки, содержащей равный объем буфера. Серию разведений гибридного белка вносили в лунки иммунологического планшета, билюминесценцию запускали впрыском раствора  $\text{CaCl}_2$ . Зависимость билюминесцентного сигнала от количества внесённого белка представлена на рисунке 3.12.

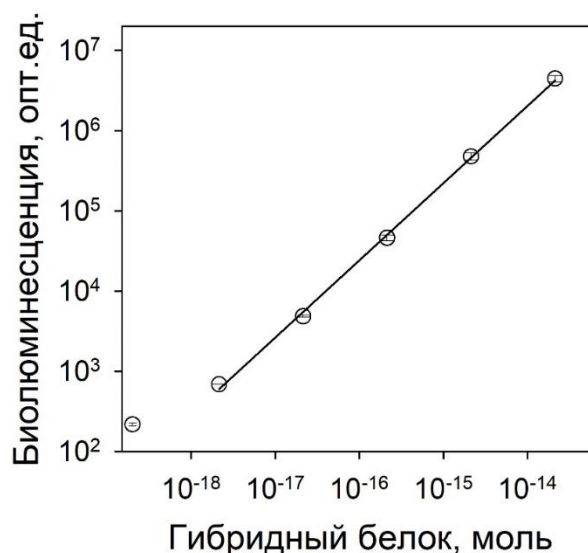


Рис.3.12. Зависимость билюминесценции гибридного белка от его количества. Отдельная точка – контрольная лунка (содержит буферный раствор). N=3.

Предел обнаружения полученного нами гибридного белка составил 2,1 амоль, что близко к таковому для рекомбинантного обелина дикого типа — 1,4 амоль [115].

Стабильность обелинового домена оценивали по отношению  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированной билюминесценции и  $\text{Ca}^{2+}$ -независимой билюминесценции. Константу спада билюминесцентного сигнала рассчитывали по 5 независимым кривым спада сигнала путём экспоненциальной аппроксимации. Полученные значения приведены в таблицу 3.

Таблица 3. Билюминесцентные характеристики Surv-OL и обелина дикого типа (WT-OL)

Характеристика	WT-OL	Surv-OL
$\text{Ca}^{2+}$ -независимая билюминесценция, $10^{-6}$ (0,1 мг/мл)	0,9	0,6
Константа спада билюминесцентного сигнала, $\text{с}^{-1}$	10,2	$7,27 \pm 0,05$
Предел обнаружения, амоль	1,4	2,1
Активность относительно WT-OL, %	100	94

По результатам изучения биолюминесцентных характеристик белка видно, что гибридный белок сопоставим с обелином дикого типа, что подтверждает пригодность гибридного белка для использования в качестве биолюминесцентного репортёра.

Для оценки способности сурвивинового домена белка связываться с соответствующими анти-сурвивиновыми антителами проводили биолюминесцентный твердофазный иммуноанализ. Антитела иммобилизовали на поверхности лунки планшета в разных концентрациях и затем добавили раствор Surv-OL. В качестве контроля использовались лунки без иммобилизованных антител. Была получена линейная зависимость биолюминесцентного сигнала от концентрации антител (рис.3.13).

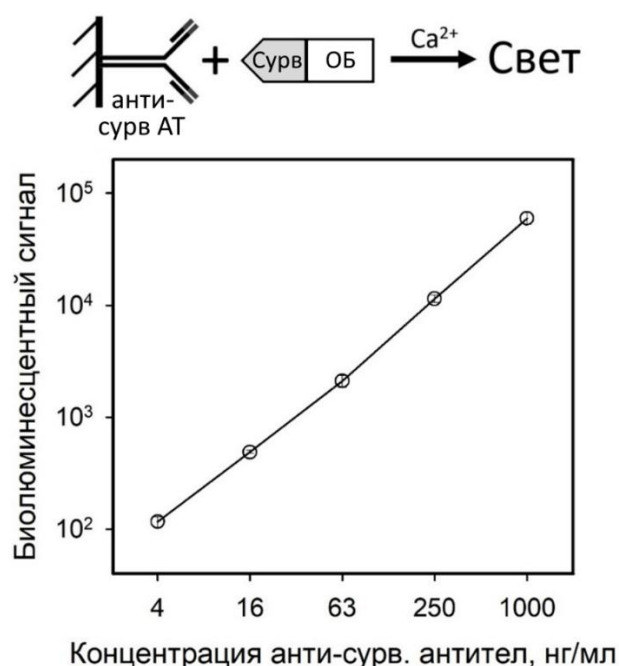


Рис.3.13. Зависимость биолюминесценции гибридного белка Surv-OL от концентрации антител к сурвивину, сорбированных на поверхности микропланшета. Схема анализа показана вверху. N=3.

Таким образом, оба домена полученного нами гибридного белка обладают свойствами исходных полипептидов — это означает, что данный белок можно использовать для создания конкурентного варианта иммуноанализа сурвивина.

### 3.2.1.3 Результаты конкурентного иммуноанализа сурвивина

Для определения концентрации белка в растворе или биологическом образце был предложен иммуноанализ конкурентного типа, в котором белок-мишень без метки и такой же белок с меткой конкурируют за связывание с иммобилизованным моноклональным антителом. Был проведён модельный анализ такого типа для определения концентрации сурвивина в буферном растворе и модельной моче. В качестве белка-мишени использовали образец полученного нами рекомбинантного сурвивина, а в качестве меченого белка - гибрид Surv-OL. Схема анализа и полученные результаты представлены на рисунке 3.14.

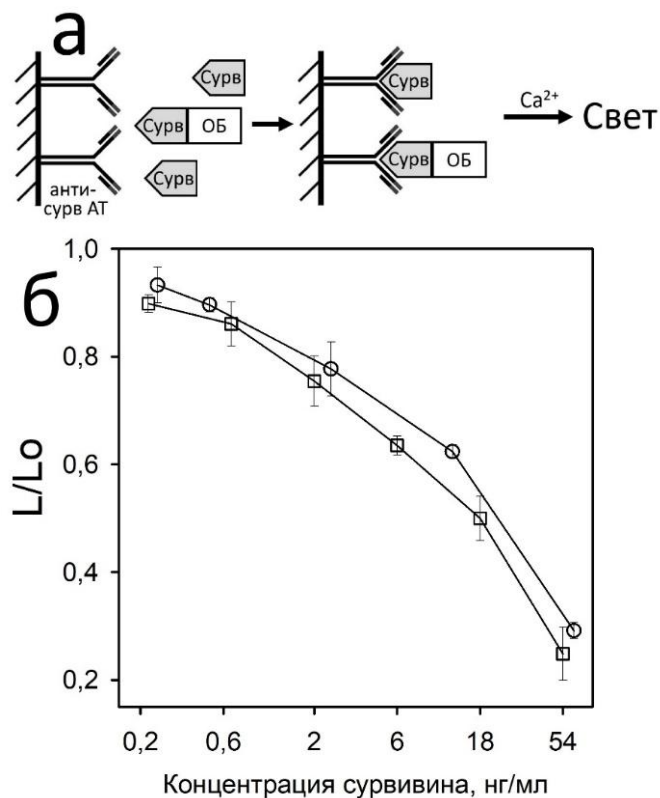


Рис.3.14. Схема (а) и калибровочная кривая (б) биолюминесцентного конкурентного анализа сурвивина в моче (-○-) и буферном растворе (-□-).  $L$  – биолюминесценция в лунке с образцом,  $L_0$  – в лунке с буферным раствором.  $N=3$ .

Из рисунка видно, что интенсивность биолюминесцентного сигнала находится в обратной зависимости от концентрации сурвивина в анализируемых образцах в диапазоне от 0,25 до 54 нг/мл, предел обнаружения составил 163,1 пг/мл

при анализе в буферных растворах. Таким образом аналитический диапазон и предел обнаружения этого анализа не соответствуют требованиям для определения сурвивина в моче пациентов.

### 3.2.2 «Сэндвич» вариант иммуноанализа сурвивина на основе обелина

Чтобы белок превратился в специфичную метку, пригодную для выявления определенной мишени в образце, нужно произвести определенные модификации – «пришивку» биоспецифических молекул (антител, олигонуклеотидов и др.), способных обеспечить аффинное связывание с молекулой аналита [130] с помощью химических методов.

Конъюгат рекомбинантного обелина с анти-сурвивиновым антителом получали двухэтапным способом синтеза с использованием гетеробифункционального реагента сукцинимидил-(N-малеимидометил) циклогексан-1-карбоксилата (SMCC) по схеме, показанной на рисунке 3.15.

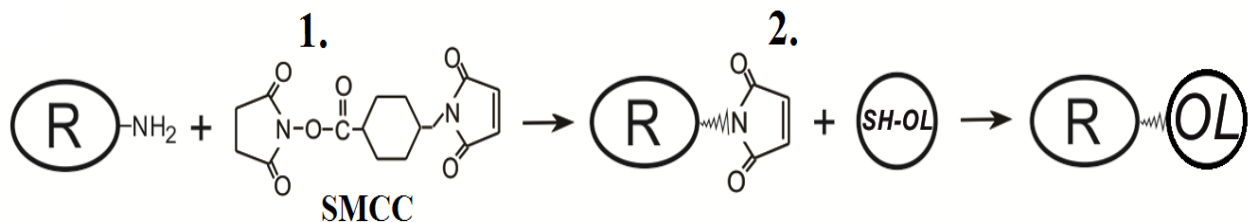


Рисунок 3.15. Химический синтез конъюгатов обелина с биоспецифическими молекулами. R-NH<sub>2</sub>- биоспецифическая молекула с доступной для модификации аминогруппой, OL – обелин, SH-OL – вариант обелина с уникальным остатком цистеина [131].

Процесс получения химического конъюгата включал в себя: 1) активацию антитела реакцией с SMCC; 2) взаимодействие SH-обелина и SMCC-активированного антитела, последующую очистку.

Очистку полученных конъюгатов с антителом осуществляли с помощью гель-фильтрации на колонке Superdex 200 10/300 GL. На рисунке 3.16 показан профиль элюции при выделении конъюгата анти-сурвивинового антитела с

обелином. Фракции, содержащие высокомолекулярные белки, обладающие биолюминесцентной активностью объединили. Следующий, низкомолекулярный пик, принадлежит фракции, содержащей непрореагировавший обелин, взятый в избытке.

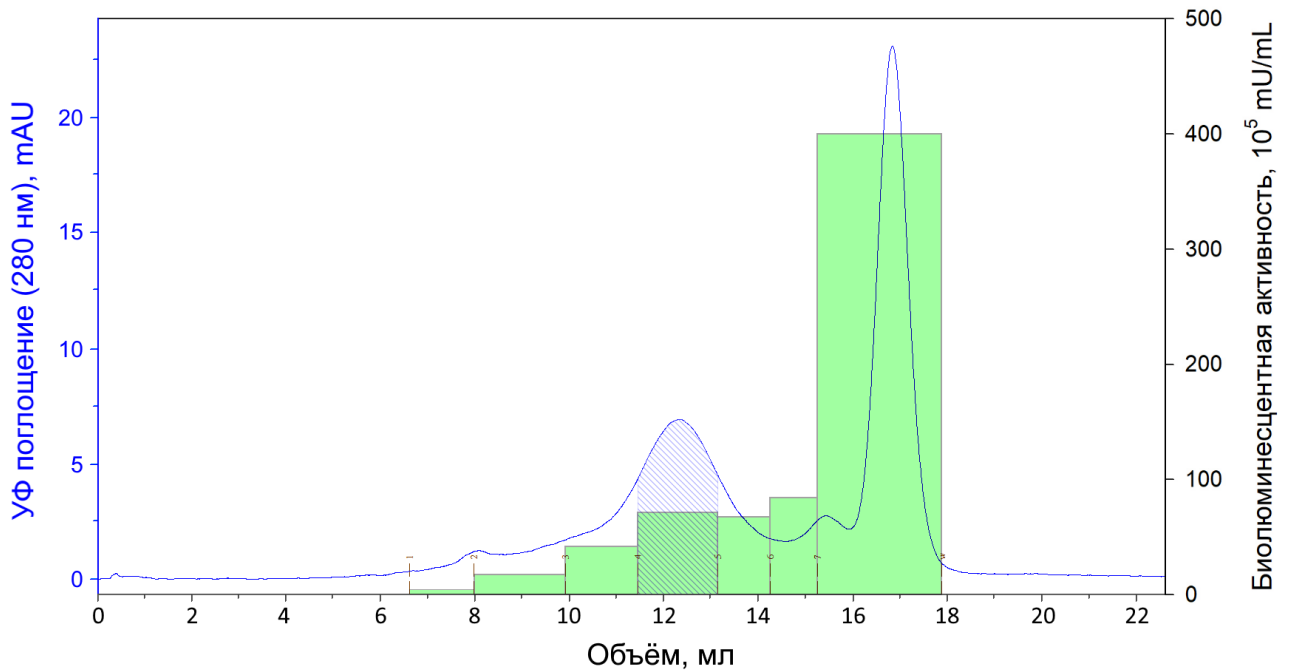


Рис.3.16. Профиль элюции при выделении конъюгата анти-сурвивинового антитела с обелином. Синяя линия – поглощение элюируемых веществ, зелёные столбики – биолюминесцентная активность выделенных фракций. Заштрихованная фракция содержит конъюгат, использовавшийся для дальнейшей работы.

Обелин в реакцию конъюгирования взят в 10-кратном молярном избытке, процент включения обелина составил 16,4%, т.е. на 1 молекулу антитела пришивается 1-2 молекулы фотопротейна. Предел обнаружения полученного конъюгата составил 0,6 амоль.

Полученный конъюгат использован в качестве метки в биолюминесцентном твердофазном иммуноанализе сурвивина сэндвич-типа. Поликлональные анти-сурвивиновые антитела сорбировали на планшете, далее вносили серию разведений сурвивина в диапазоне концентраций от 0,125 до 27 нг/мл в буфере и инкубировали, а затем после отмывок – добавляли полученный конъюгат.

Сформированные на поверхности лунки планшета комплексы выявляли по их биолюминесцентному сигналу при добавлении раствора хлорида кальция. Результаты анализа представлены на рисунке 3.17.

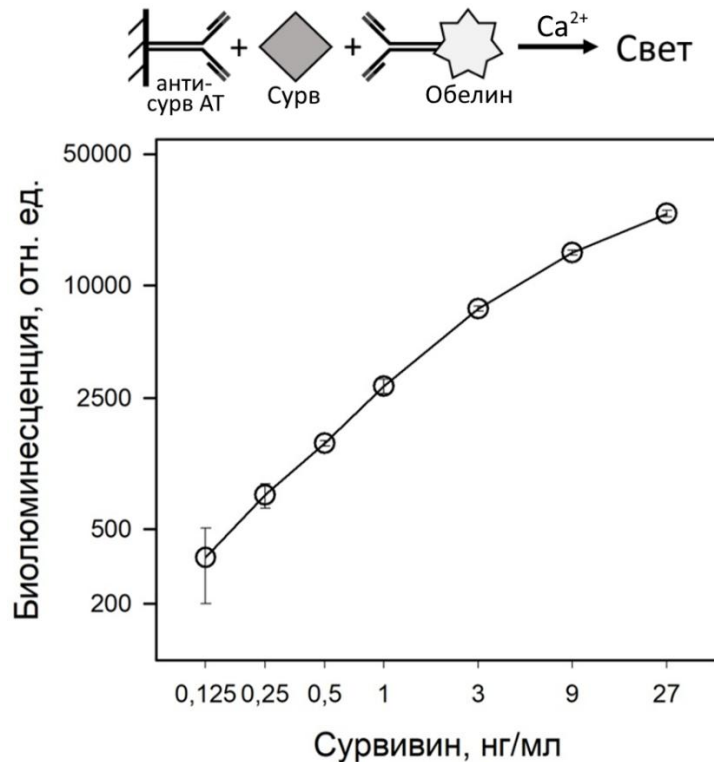


Рис. 3.17 - Биолюминесцентный иммуноанализ сурвивина «сэндвич» типа на основе конъюгата анти-сурвивинового антитела и обелина. N=3

Была получена зависимость биолюминесцентного сигнала от концентрации сурвивина в диапазоне от 125 пг/мл до 27 нг/мл. Предел обнаружения анализа составил 111,5 пг/мл. Биолюминесцентный сигнал для крайней точки (125 пг/мл) незначительно отличался от нулевой лунки, при попытке расширить диапазон в область низких концентраций были получены значения сигнала, не отличающиеся от нуля. Диапазон и чувствительность анализа на порядок меньше, чем необходимо для выявления сурвивина в диагностически значимом диапазоне концентраций (10-250 пг/мл) [9].

### 3.3 Билюминесцентный иммуноанализ сурвивина на основе люциферазы NanoLuc

Так как чувствительность анализа оказалась недостаточной, были предприняты попытки по её улучшению. Чувствительность аналитической системы главным образом зависит от аффинности биоспецифической молекулы (аптамера или антитела) и интенсивности сигнала, генерируемого репортёром. Билюминесценция обелина имеет кинетику типа «вспышка» из-за некаталитического механизма реакции: при присоединении ионов кальция происходит реакция декарбоксилирования пероксицелентеразина, в результате которой получается целентерамид в возбужденном состоянии, нековалентно связанный с белком. Переход системы в основное состояние сопровождается испусканием фотона. Таким образом, фотопротеиновая билюминесцентная реакция происходит однократно. Билюминесценция систем люциферазного типа имеет продолжительную кинетику по Михаэлису-Мэнтену и продолжается до тех пор, пока в системе остаётся свободный субстрат. Благодаря этому возможно интегрировать сигнал в течение времени, что может увеличивать чувствительность аналитической системы на основе люцифераз.

В лаборатории билюминесцентных и экологических технологий Института биофизики разработан вариант люциферазы NanoLuc(C164S)LCTPSR, несущей гексапептид с уникальным цистеиновым остатком, доступным для химической конъюгации. NanoLuc – искусственная люцифераза, созданная корпорацией Promega на основе люциферазы глубоководной креветки *Oplophorus gracilirostris*. Её активность более чем в 150 раз превышает традиционно используемые люциферазы светлячка и коралла *Renilla*, благодаря чему она обладает огромным потенциалом для диагностических приложений.

Нами был получен конъюгат поликлонального антитела к сурвивину и люциферазы NanoLuc химическим синтезом, по способу, описанному выше для получения конъюгата антитела с обелином (рис.3.15). Профиль элюции,

полученный в ходе выделения конъюгата из реакционной смеси гель-фильтрацией представлен на рисунке 3.18.

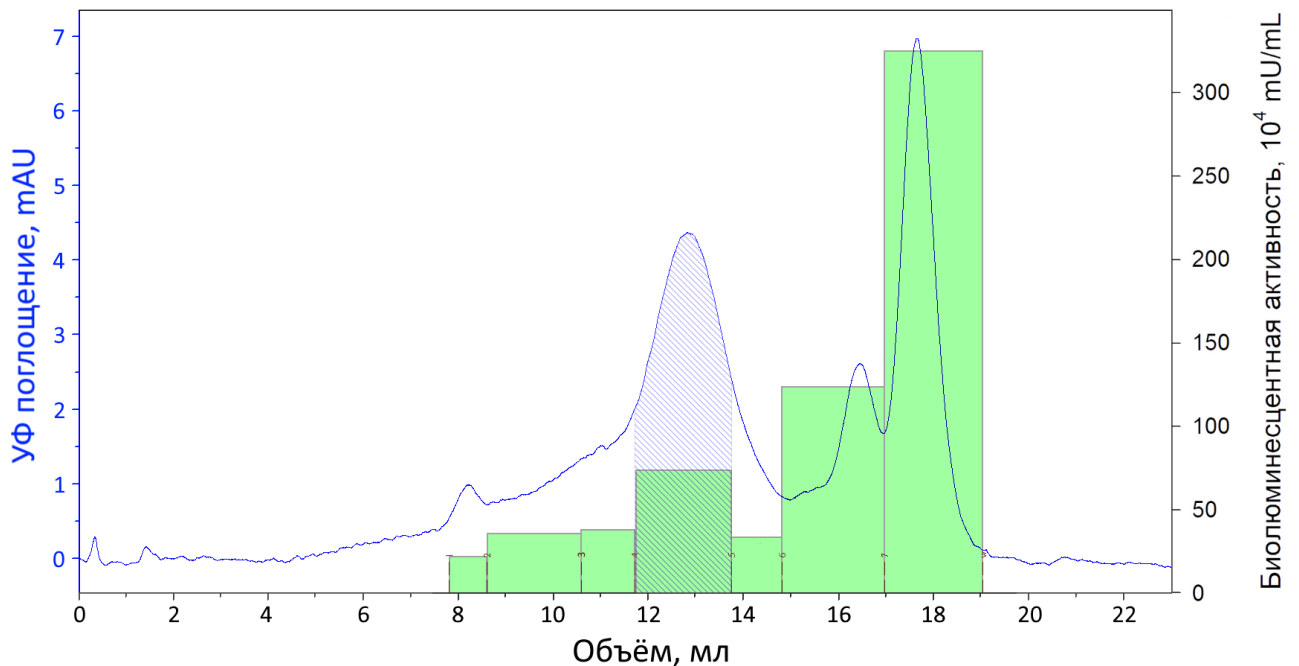


Рис.3.18. Профиль элюции гель-фильтрации при очистке химического конъюгата анти-сурвивинового антитела с люциферазой NanoLuc. Синяя линия – оптическое поглощение элюируемых веществ (280 нм); зелёные столбики – билюминесцентная активность выделенных фракций. Заштрихованная фракция содержит конъюгат, использованный для дальнейшей работы.

При 10-кратном молярном избытке, процент включения NanoLuc составил 24,5%, т.е. на 1 молекулу антитела пришивается 2-3 молекулы люциферазы. Предел обнаружения полученного конъюгата составил 1,7 амоль.

Полученный химический конъюгат был использован в качестве метки в билюминесцентном твердофазном иммуноанализе сурвивина. Аликвоты сурвивина (100 мкл, от 15,6 до 2000 пг/мл в буферном растворе), вносили в лунки планшета, активированные поликлональными антителами к сурвивину, и инкубировали, после чего добавляли метку. Билюминесцентную реакцию инициировали добавлением свежеприготовленного раствора 1 мкМ фуримазина. Результаты анализа представлены на рисунке 3.19.

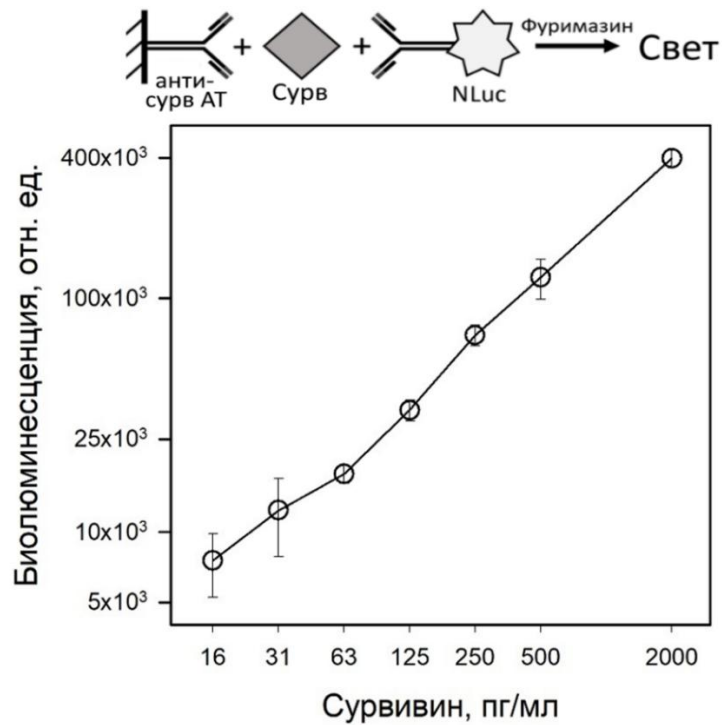


Рис. 3.19 - Биолюминесцентный иммуноанализ сурвивина «сэндвич» типа на основе конъюгата анти-сурвивинового антитела и NanoLuc. N=3

Была получена линейная зависимость концентрации сурвивина в диапазоне от 15,6 до 2000 пг/мл. Удалось измерить сурвивин в диагностически значимом диапазоне концентраций, предел обнаружения составил  $8,13 \pm 2,43$  пг/мл ( $0,49 \pm 0,15$  пМ) ( $n=6$ ). При исследовании внутрисерийной воспроизводимости значение коэффициента вариации (Coefficient of variability - CV) составило 7,1% для образца с низкой концентрацией аналита (50 пг/мл), 3,4 % для средней (200 пг/мл) и 2,9% для высокой (1000 пг/мл). Значения CV при исследовании межсерийной воспроизводимости составили 11,03% для низкой концентрации, 7,1% для средней и 5,8% для высокой.

### 3.3.1 Подбор раствора для построения калибровочной кривой в иммуноанализе сурвивина в моче

Для определения концентрации сурвивина в биологических образцах мочи необходимо учитывать эффект матрикса образца, взятого на анализ. Для этого состав растворителя для калибровочных образцов должен как можно более полно

соответствовать анализируемым образцам. Были приготовлены серии разведений сурвивина в моче здорового человека, контрольной моче (Вектор-Бест), калибровочном растворе RD-35 (R&D Systems, США) и протестированы в иммуноанализе (Рис.3.20.).

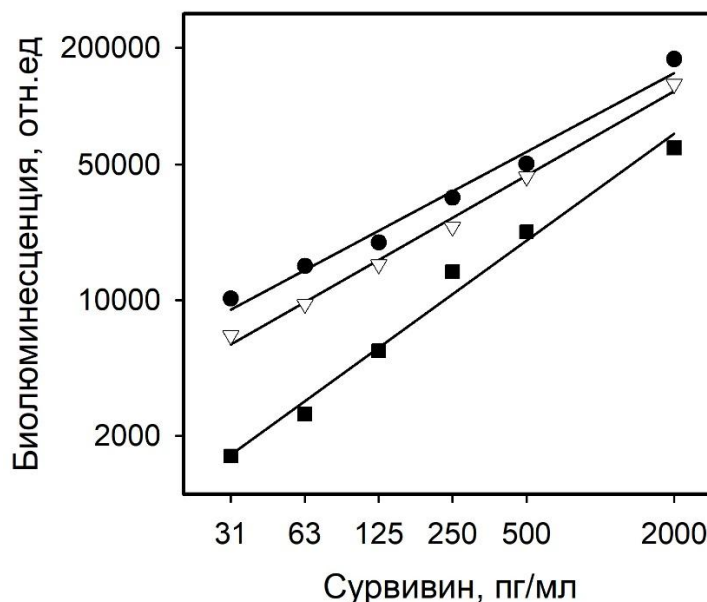


Рис.3.20. – Билюминесцентный иммуноанализ сурвивина в разных средах: моче здорового человека (-●-), калибраторе RD-35 (-▽-), контрольной моче «Вектор-Бест» (-■-). Каждая точка – среднее от 2-х измерений.

Близкие результаты были получены в случае использования мочи здорового человека и калибратора RD-35 из набора Human Survivin Quantikine ELISA Kit. При использовании искусственной контрольной мочи «Вектор-Бест» наблюдалось существенное уменьшение билюминесцентного сигнала, примерно в 3 раза по сравнению с мочой здорового человека, возможно, из-за наличия консервирующих добавок. Далее, в качестве калибратора использовали среднюю мочу здорового человека с подтверждённым отсутствием сурвивина.

### 3.3.2 Стабильность реагентов иммуноаналитической системы по определению сурвивина в моче человека при хранении

В нашем исследовании определили стабильность при хранении основных компонентов аналитической системы: анти-сурвивин антитела, рекомбинантного

сурвивина (аналит) и конъюгата антитела с люциферазой NanoLuc (биолюминесцентная метка).

Стабильность анти-сурвивин антител, использованных для активации поверхности планшетов, оценивали по результатам иммуноанализа на этих планшетах по схеме на рисунке 3.19 сверху. В качестве метки в анализе использовали гибридный белок Surv-OL. Хранение антител осуществляли в 20 мМ фосфатном буфере pH 7,3 с добавлением 150 мМ NaCl. Лиофилизацию белка проводили из этого же буфера. На рисунке 3.21а приведены результаты анализа мишени, где поверхность активировали антителами после хранения при 4 °С.

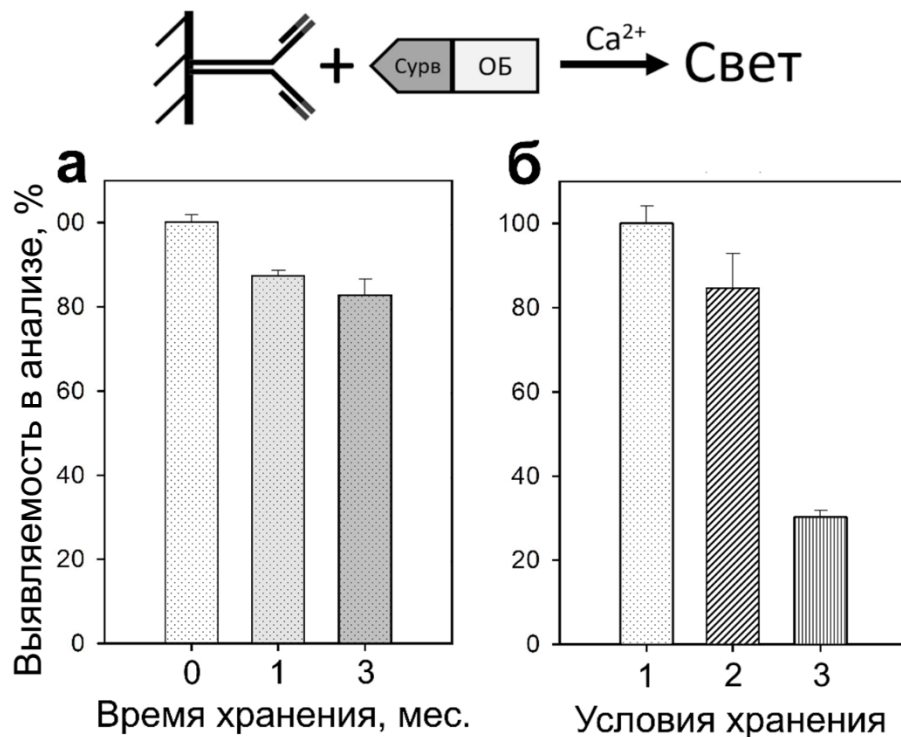


Рис.3.21. Эксперимент по исследованию стабильности анти-сурвивин антител при хранении в растворе при 4°С (а). и при хранении при -20°С в течение 3-х месяцев (б): 1 – хранение антител при заморозке; 2 – хранение лиофилизованных антител; 3 – хранение планшетов, активированных антителами. Схема анализа, с помощью которого проверяли стабильность реагента, приведена сверху.

Результат иммуноанализа, в котором поверхность планшета активировали анти-сурвивин антителами после 3-х месяцев хранения в растворённом виде при 4°C, оказалась на 18% меньше, чем при проведении такого же анализа с использованием антител, хранившихся в замороженном состоянии. На рисунке 3.21б показано, что использование антител, восстановленных после лиофилизации, привело к 13%-ной потере в результате иммуноанализа. Анти-сурвивин антитела оказались довольно стабильны при хранении в растворе и лиофилизации. Однако, предварительная сорбция с высушиванием антител на планшетах с последующим хранением при -20°C в течение 3-х месяцев привела к потере 70% результата анализа. Очевидно, для долговременного хранения планшетов, активированных анти-сурвивин антителами необходимы дальнейшие исследования.

Для исследования стабильности биолюминесцентной метки проводили иммуноанализ «сэндвич» типа по схеме на рисунке 3.22 сверху. Анализировали один и тот же образец сурвивина с концентрацией 10нг/мл. Метку хранили в 50 мМ фосфатном буфере рН 7,0 с добавлением 150 мМ NaCl и 0,1% БСА, лиофилизацию проводили из этого же буфера. Также исследовали вариант хранения в буфере с добавлением глицерина в качестве криопротектора до конечной концентрации 50%. Результаты анализа, с использованием метки после хранения при различных условиях, приведены на рисунке 3.22.

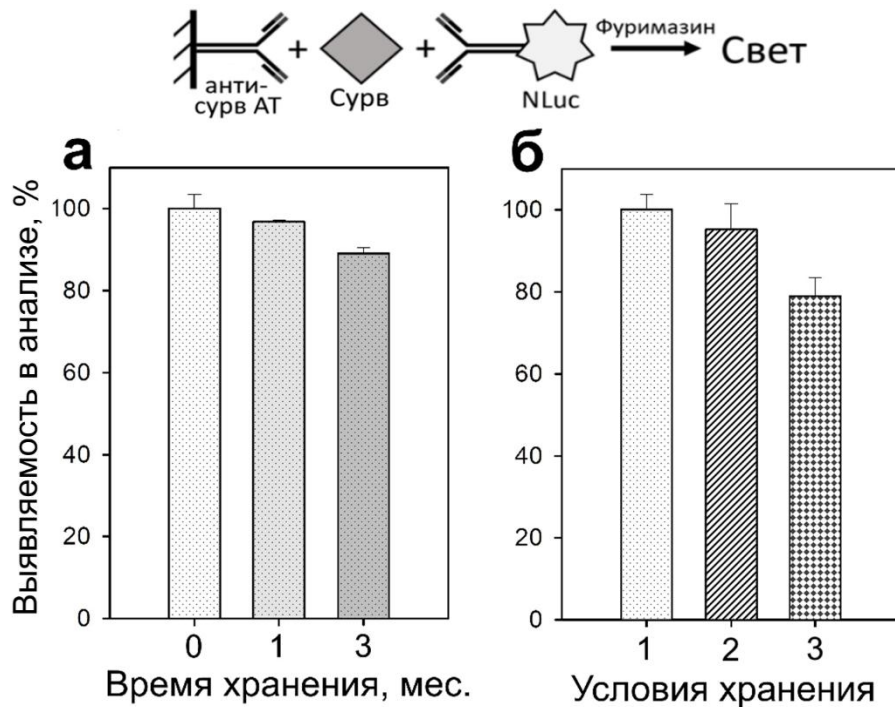


Рис.3.22. Результат иммуноанализа с использованием метки после хранения в растворе при 4°C (а) и при хранении при -20 °С в течение 3-х месяцев (б): 1 – хранение метки при заморозке; 2 – хранение лиофилизованной метки; 3 – хранение метки в буфере, содержащем 50% глицерина.

Хранение биолюминесцентной метки при 4°C в течение 3 месяцев привело к потере 11% результата «сэндвич» иммуноанализа, по сравнению с результатом анализа с замороженной меткой. Метка после лиофильной сушки сохранила свою активность практически нацело. Хранение метки в буфере, содержащем 50% глицерина в течение 3 месяцев хранения при -20°C, привело к потере 21% результата анализа.

Стабильность сурвивина, используемого в качестве аналита, оценивали по результатам биолюминесцентного иммуноанализа «сэндвич» формата по схеме на рисунке 3.22. В данном случае антитела и биолюминесцентная метка хранились в одинаковых условиях. Сурвивин хранили и лиофилизовали из буфера, содержащего 20 мМ Трис-НСl рН 8,0 и 0,6 М мочевины. Кроме того, исследовали вариант хранения в буфере, содержащем 50% глицерина, 10 мМ Трис-НСl рН 8,0 и

0,3М мочевины. Результаты анализа сурвивина после хранения в виде раствора при 4°C, приведены на рисунке 3.23а.

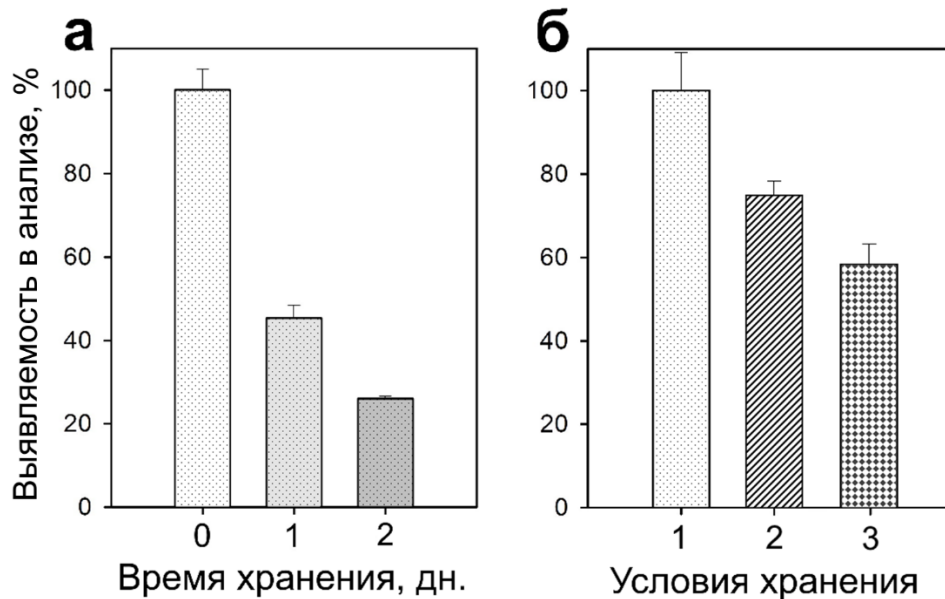


Рис.3.23. Стабильность сурвивина при хранении в растворе при 4°C (а) и при хранении при -20°C (б) в течение 3-х месяцев. 1 – хранение сурвивина при заморозке; 2 – хранение лиофилизованного сурвивина; 3 – хранение сурвивина в буфере, содержащем 50% глицерина и 0,3М мочевины.

Из рисунка видно, что уже после 2-х дней хранения раствора белка при 4°C произошло уменьшение в анализе регистрируется только 26% сурвивина. По всей видимости, это связано со склонностью белка к образованию агрегатов (см. п.3.1.2). Как видно из рисунка 3.23б, после хранения в лиофилизованном виде анализ выявляет 75% белка. Хранение сурвивина в буфере с глицерином после 3-х месяцев хранения привело к потере 42% выявляемого белка. Таким образом, оптимальным вариантом хранения сурвивина является его лиофилизация, препарат белка необходимо использовать непосредственно после его восстановления, после чего утилизировать из-за невозможности длительного хранения в виде раствора.

### 3.3.3 Сравнительный анализ результатов биолюминесцентного и колориметрического иммуноанализов

Для проверки разработанного биолюминесцентного иммуноанализа сурвивина проведено испытание на клинических образцах мочи человека. Образцы мочи исследовали на содержание сурвивина одновременно коммерческим колориметрическим и биолюминесцентным способом.

В качестве метода для сравнения выбран диагностикум Human Survivin Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, США) с линейным диапазоном от 31 до 2000 пг/мл и пределом обнаружения 9,96 пг/мл. Для построения калибровочной кривой биолюминесцентного анализа стандартные растворы готовили, используя раствор модельной мочи из коммерческого набора. Калибровочные кривые для разработанного и коммерческого иммуноанализа от R&D Systems, построенные на стандартных образцах мочи, представлены на рисунке 3.24.

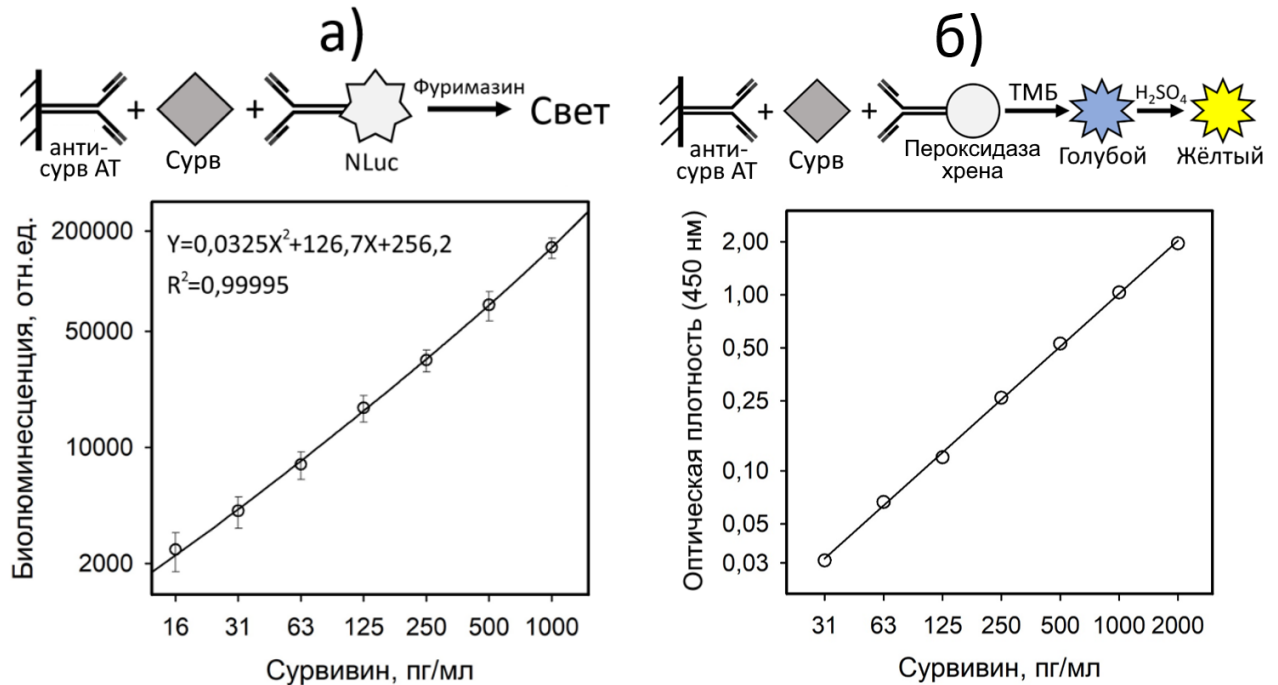


Рис. 3.24. Биолюминесцентный (а) и колориметрический (б) иммуноанализ сурвивина в стандартных образцах мочи. Измерения в ходе биолюминесцентного иммуноанализа проводили в трёх повторностях, в ходе коммерческого – в двух.

Затем, пользуясь полученными калибровками определили содержание сурвивина в образцах 4 здоровых добровольцев, а также у 15 больных РМП и другими заболеваниями мочеполовой системы. Корреляция полученных результатов изображена на рисунке 3.25.

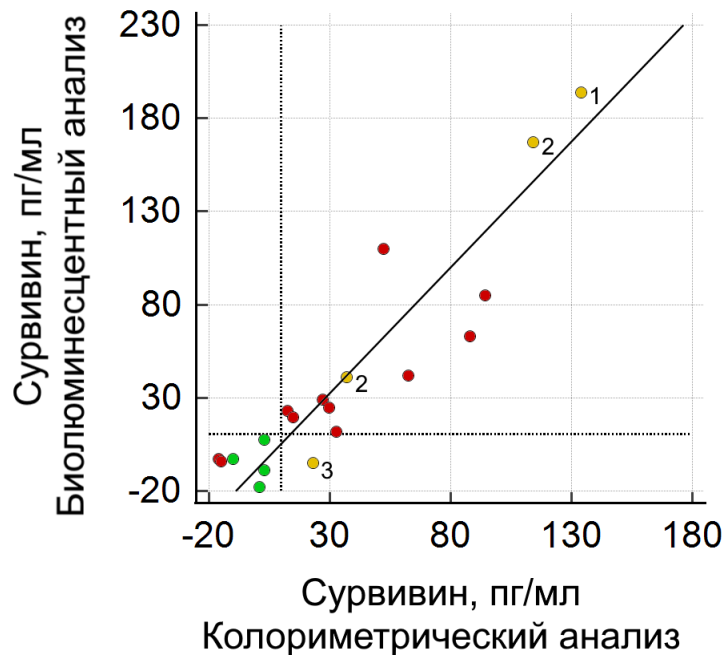


Рис.3.25. Корреляция результатов коммерческого колориметрического и билюминесцентного иммуноанализов. N=19. Зелёным отмечены здоровые доноры, красным – пациенты с РМП, жёлтым – с другими заболеваниями (1 – эндометриоз, 2 – рак кишечника, два разных образца, 3 – доброкачественная опухоль мочевого пузыря).

Коэффициент корреляции Пирсона составил 0,91 ( $p < 0,01$ ) при сопоставлении результатов билюминесцентного иммуноанализа и коммерческого колориметрического иммуноанализа от R&D Systems. Полученное значение свидетельствует о сильной положительной связи между результатами. Таким образом, сравнительный анализ показал надёжность разработанного метода для определения сурвивина в образцах мочи.

### 3.4 Исследование клинических образцов мочи

#### 3.4.1 Характеристика групп исследования

Состав групп пациентов и клинико-морфологические параметры заболевания были определены врачами Красноярского краевого онкологического диспансера. Возраст и половой состав исследуемой и контрольной групп представлен в таблице 4. Группы достоверно не отличались друг от друга по возрасту (критерий U Манна-Уитни) и соотношению полов (хи-квадрат),  $P > 0,05$ .

Таблица 4. Половой и возрастной состав контрольной и исследуемой групп

Группа	Возраст		P	Пол		P
	Me	Q1-Q3		М	Ж	
РМП (n=60)	69	62,75-74	0,362	99 (77,3%)	29 (23,7%)	0,121
Здоровые (n=128)	67	64-71,25		40 (66,7%)	20 (33,3%)	

У больных РМП оценивались основные клинико-морфологические параметры: стадия, степень дифференцировки, размер и количество новообразований.

Число больных с немышечно-инвазивным раком мочевого пузыря (НМИРМП) составило 77 (60,1%). Среди них наблюдались 41 (53,2%) пациент с низкой степенью злокачественности опухоли (G1 и G2) и 36 (46,8%) больных с высокой степенью злокачественности (G3). Среди 51 больного мышечно-инвазивной формой рака (МИРМП) низкая степень злокачественности встречалась в 12 (23,5%) случаях, а высокая - в 39 (76,5%).

### 3.4.2 Исследование образцов мочи пациентов на содержание сурвивина билюминесцентным иммуноанализом

Для определения концентрации сурвивина в моче использовали разработанный твердофазный билюминесцентный иммуноанализ на основе люциферазы NanoLuc. Используя полученную кривую (Рис. 3.24а) как калибровочную, определили содержание сурвивина в моче пациентов с подтверждённым РМП, а также у здоровых относительно заболеваний мочеполового тракта испытуемых (Рис. 3.26а).

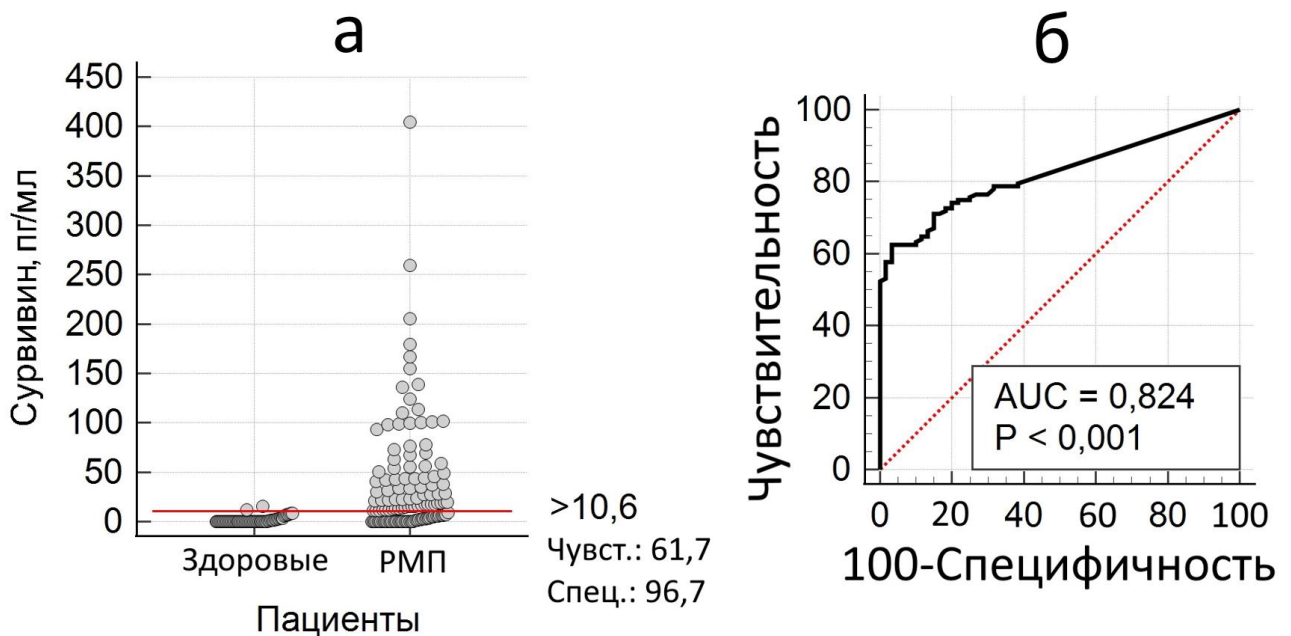


Рис. 3.26. (а) Концентрация сурвивина в исследованных образцах мочи. Красной линией показан пороговый уровень сурвивина. (б) ROC-анализ. В группу РМП входят пациенты с НМИРМП и МИРМП.

В качестве порогового использовали значение предела обнаружения сурвивина в разработанном нами анализе. Как видно из рисунка практически у всех здоровых добровольцев измеренный уровень сурвивина был меньше порогового значения, специфичность анализа составила 96,7%. При этом чувствительность сурвивина как онкомаркера для диагностики РМП составила 61,7%. Рассчитанная площадь под кривой (AUC) для ROC-анализа (рис.3.26б) составила 0,824,  $p < 0,001$ ,

что свидетельствует о способности разработанного анализа достоверно различать группы больных и здоровых пациентов.

### 3.4.2.1 Влияние клинико-морфологических характеристик РМП на концентрацию сурвивина в моче

Сурвивин, как белок, интенсивно экспрессирующийся при пролиферации клеток, должен быть значительно повышен в образцах пациентов с высокой стадией заболевания, поскольку на распространенных стадиях уровень дифференциации тканей падает, а скорость клеточного деления увеличивается. Исходя из вышеописанного концентрация сурвивина должна быть максимальна в группе МИРМП и при низкодифференцированном (G3) НМИРМП.

Так, при анализе распределения уровня сурвивина среди больных РМП была обнаружена зависимость доли больных с повышенным сурвивином от глубины инвазии опухоли мочевого пузыря (распределение на Рис. 3.27а, количественные данные в табл. 4).

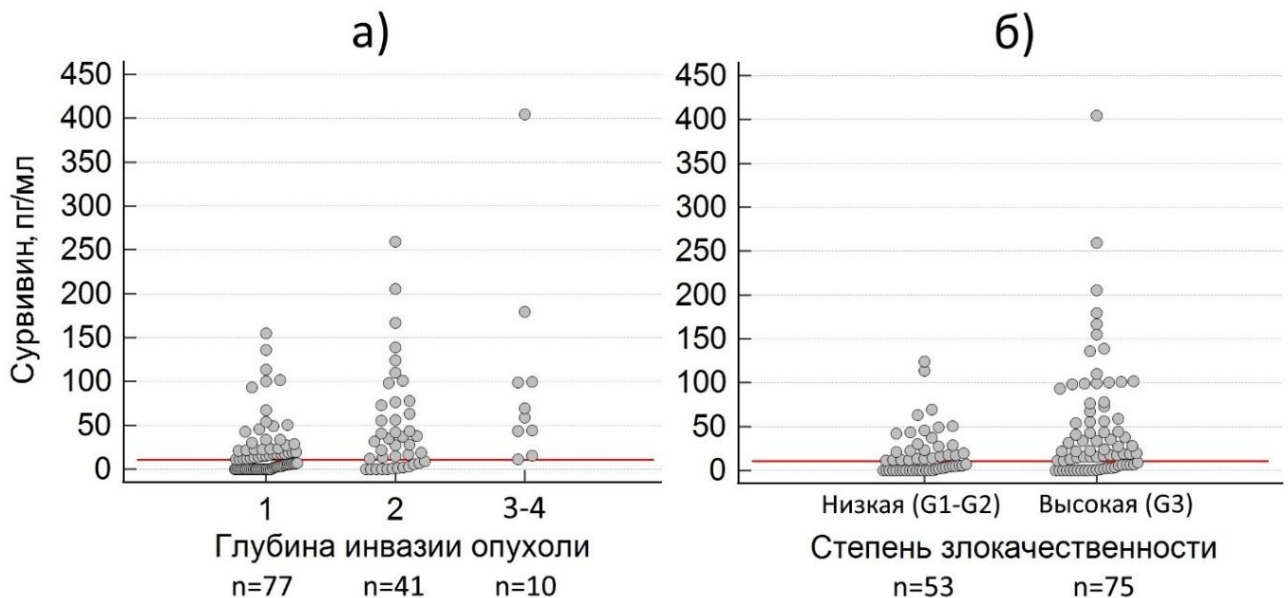


Рис.3.27. Уровень мочевого сурвивина в зависимости от глубины инвазии опухоли (а) и степени злокачественности (б).

При анализе распределения уровня сурвивина среди больных РМП была обнаружена зависимость доли больных с повышенным сурвивином от глубины инвазии опухоли мочевого пузыря (табл. 5). Процент больных с повышенным сурвивином среди группы НМИРМП (Ta, Tis, T1) составил 51,9%, среди МИРМП (T2-T4) - 76,5%, увеличение относительного риска (ОР) наличия мышечной инвазии среди сурвивин положительных пациентов составило 1,47 с доверительным интервалом (ДИ) 1,13-1,92. Кроме этого, обнаружена взаимосвязь количества пациентов с сурвивином и степенью злокачественности опухоли. При низкой степени злокачественности (G1-G2) повышенный сурвивин встречается у 50,9%, а при высокой (G3) у 69,3% пациентов, ОР 1,36; ДИ: 1,01-1,85.

Также была обнаружена взаимосвязь доли сурвивин-положительных пациентов от размера опухоли ( $p < 0,001$ ; ОР 1,71; ДИ: 1,26-2,32). По всей видимости, при большей площади контакта мочи с опухолью, уровень сурвивина в моче повышается. При этом не было обнаружено взаимосвязи с количеством новообразований ( $p = 0,888$ ).

Таблица 5. Содержание сурвивина в моче пациентов в зависимости от клинико-морфологических характеристик РМП

Характеристика	Категория	Сурвивин			P
		Повышен	Норма	Me (Q1-Q3), пг/мл	
Размер новообразования	$\geq 3$ см (n=56)	44 (78,6%)	12 (21,4%)	34,2 (11,8-76,9)	<b>&lt;0,001</b>
	<3 см (n=61)	28 (45,1%)	33 (54,1%)	5,5 (0-20,7)	
Количество новообразований	Множественные (n=44)	27 (61,4%)	17 (38,6%)	12,7 (0-31,3)	0,888
	Единичные (n=75)	47 (62,7%)	28 (37,3%)	18,2 (3,1-56,7)	
Степень злокачественности и опухоли	Низкая G1-G2 (n=53)	27 (50,9%)	26 (40,1%)	5,9 (0-22,1)	<b>0,036</b>
	Высокая G3 (n=75)	52 (69,3%)	23 (30,7%)	21,8 (5,4-67)	
Распространенность первичной опухоли	НМИРМП (n=77)	40 (51,9%)	37 (48,1%)	7,2 (0-21,8)	<b>0,006</b>
	МИРМП (n=51)	39 (76,5%)	12 (23,5%)	37,8 (11,7-77,3)	

Данные, приведенные в Таблице 5, показывают, что повышенная концентрация сурвивина в моче является крайне умеренным по своей диагностической значимости маркером относительно НМИРМП и может диагностировать опухоль лишь в половине случаев (51,9%, AUC=0,771,  $p < 0,001$ ). Это ограничивает использование данного онкомаркера в качестве единственного диагностического фактора для обнаружения НМИРМП. Для случаев МИРМП чувствительность анализа намного выше – 76,5% (AUC=0,903,  $p < 0,001$ ).

#### **3.4.2.2 Мониторинг больных по уровню содержания сурвивина в моче после специализированного лечения**

Разработка способа наблюдения за состоянием больных РМП, прошедших курс лечения, с помощью неинвазивного лабораторного анализа является актуальной задачей, так как ежеквартальное введение цистоскопа, при помощи которого исследуется наличие рецидива, является тяжёлой процедурой для пациента. Нами была исследована возможность использования показателя содержания сурвивина в моче в качестве неинвазивного инструмента мониторинга течения заболевания. Было изучено изменение уровня сурвивина в моче у 38 пациентов до и спустя 1,5-2 месяца после проведённого специализированного лечения (Рис. 3.28).

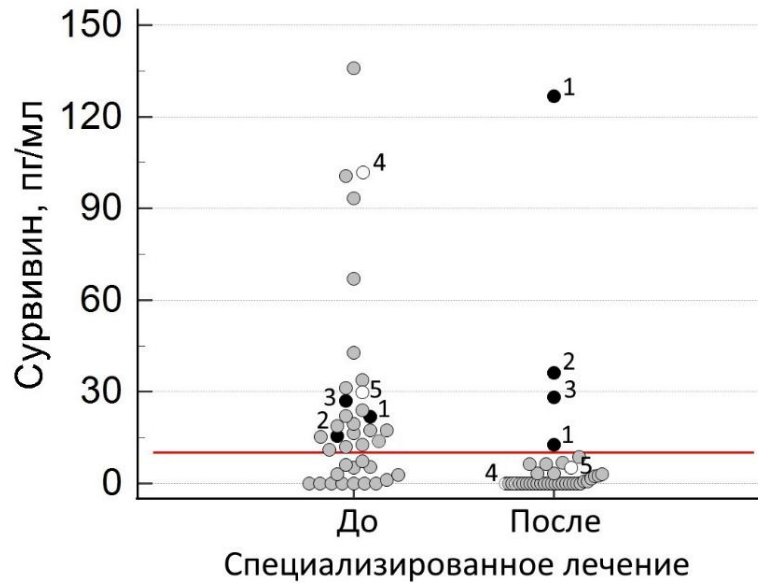


Рис.3.28. Содержание сурвивина в моче пациентов РМП до и после специализированного лечения. Случаи: (-●-) – концентрация сурвивина после лечения не упала ниже порогового уровня; (-○-) концентрация снизилась, без улучшения клинико-морфологических характеристик.

Среди 38 пациентов с диагнозом РМП до лечения повышенное содержание сурвивина отмечалось у 24 (63,2%). После проведённого специализированного лечения сурвивин был обнаружен только у 3 пациентов (7,9%). Как оказалось, это пациенты, с неблагоприятными морфологическими характеристиками опухоли, такими как высокая гистологическая стадия и степень распространённости.

Таким образом, мочевой сурвивин, несмотря на свою ограниченную диагностическую ценность, потенциально может быть использован для неинвазивного мониторинга опухолевого процесса после специализированного лечения.

### 3.4.2.3 Сурвивин как предиктор рецидивирования немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря

Неинвазивно-мышечный рак мочевого пузыря хорошо поддаётся лечению, однако требует пожизненного наблюдения из-за большой склонности к рецидивированию (до 60-70% случаев [132]). Наличие сурвивина может указывать

на свойства опухоли – агрессивные, склонные к рецидивированию должны содержать много сурвивина, а более доброкачественные – мало, или вообще его не содержать. По результатам наблюдения за 54 пациентами с немышечно-инвазивным раком мочевого пузыря после проведённого специализированного лечения, был проведён анализ безрецидивной выживаемости по Каплану-Мейеру (Рис.3.29). Пациенты были поделены на 2 подгруппы – сурвивин-положительных (N=26) и сурвивин-отрицательных (N=28).

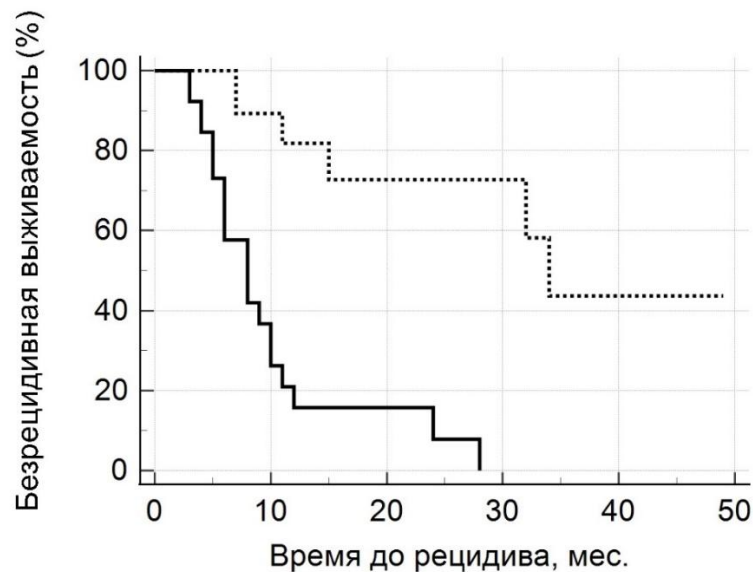


Рис.3.29. Кривая безрецидивной выживаемости в зависимости от наличия сурвивина до проведения специализированного лечения. Сплошной линией отображены сурвивин-положительные пациенты, пунктирной – сурвивин-отрицательные.

Среднее время безрецидивной выживаемости среди сурвивин-положительных больных составило  $10,1 \pm 1,6$  мес., а среди сурвивин-отрицательных –  $33,9 \pm 4,4$  мес. Оказалось, что отсутствие сурвивина является положительным прогностическим фактором для безрецидивной выживаемости, увеличивающим срок дожития у пациентов на 2 года.

Исходя из вышеизложенного, повышенная экспрессия сурвивина указывает на худший прогноз у пациентов, значительно уменьшая время до возникновения рецидива. Несмотря на ограниченную диагностическую значимость при использовании в качестве единственного маркера заболевания, сурвивин

демонстрирует потенциал как независимый предиктор безрецидивной выживаемости РМП. Прогностическая значимость сурвивина также отмечена другими авторами [133,134], которые связывают сверхэкспрессию сурвивина с высоким риском рецидива и прогрессирования заболевания, а также повышенной смертностью.

### **3.4.3 Комбинированное определение сурвивина и CYFRA 21-1 в моче**

Так как индивидуальной чувствительности сурвивина оказалось недостаточно для выявления НМИРМП, было предложено дополнить лабораторный анализ определением другого онкомаркера. Для этого выбран маркер CYFRA 21-1, представляющий собой ряд растворимых фрагментов цитокератина 19, попадающих в мочу после отслоения и лизиса уротелиальных клеток [135]. В сравнительном исследовании [136] показано, что CYFRA 21-1 превосходит по диагностической ценности такие маркеры как UBC и FDP (продукты деградации фибрина) в моче. Так как сурвивин является регуляторным белком, а CYFRA 21-1 структурным, это может увеличить долю выявляемых пациентов с заболеваниями из-за охвата большего количества функций, которые могут нарушаться в ходе онкологического процесса.

#### **3.4.3.1 Исследование пригодности набора «CYFRA 21-1-ИФА-БЕСТ» для анализа образцов мочи**

Российская фирма «Вектор-Бест» выпускает набор для измерения концентрации CYFRA 21-1 в сыворотке крови. Нами было проведено исследование пригодности набора «CYFRA 21-1-ИФА-БЕСТ» для определения этого анализита в моче человека. График калибровочной кривой, построенный в соответствии с рекомендациями производителя (Рис. 3.30а), использовали для определения концентрации CYFRA 21-1 в образцах мочи.

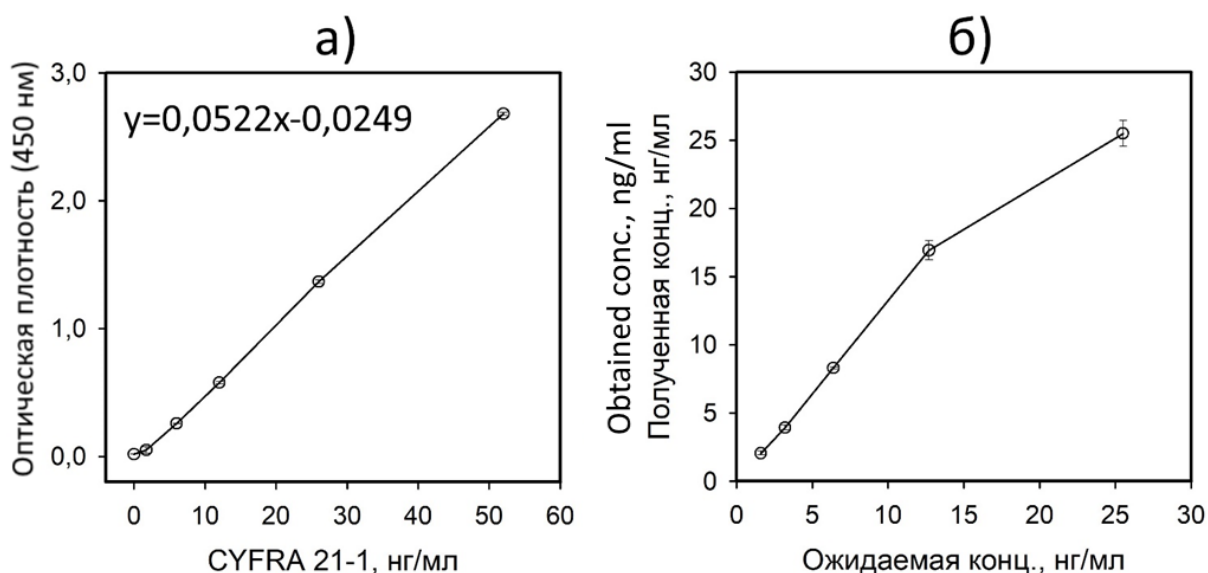


Рис.3.30. Колориметрический иммуноанализ CYFRA 21-1 в стандартных образцах набора «CYFRA 21-1-ИФА-БЕСТ» (а),  $n=3$ ; анализ линейности полученных значений при разведении одного из образцов мочи больного РМП (б); каждая точка – среднее значение от 3-х измерений.

Были исследованы параметры линейности (dilution linearity) и восстановления (spike and recovery) набора при анализе образцов мочи. Изменение концентрации при последовательном разведении одного из образцов приведено на рисунке 3.28б. Всего в эксперименте были исследованы 5 разных образцов мочи пациентов. Полученное среднее значение процента линейности при первом разбавлении составило 86,5%. Процент восстановления составил 90,2% в моче по сравнению со стандартным разбавителем. Таким образом, небольшое влияние матрикса неразбавленного образца мочи на проведение ИФА находится в пределах допустимого ( $\pm 20\%$  для параметров линейности и восстановления). Полученные данные свидетельствуют о возможности применения данного набора для измерения концентрации CYFRA 21-1 в образцах мочи.

### 3.4.3.2 Исследование образцов мочи пациентов на содержание онкомаркера CYFRA 21-1

Концентрацию CYFRA 21-1 определили в моче 124 пациентов с верифицированным РМП и 53 здоровых добровольцев. Распределение концентрации в образцах мочи представлено на рис.3.31а и ROC-анализ на рис.3.31б.

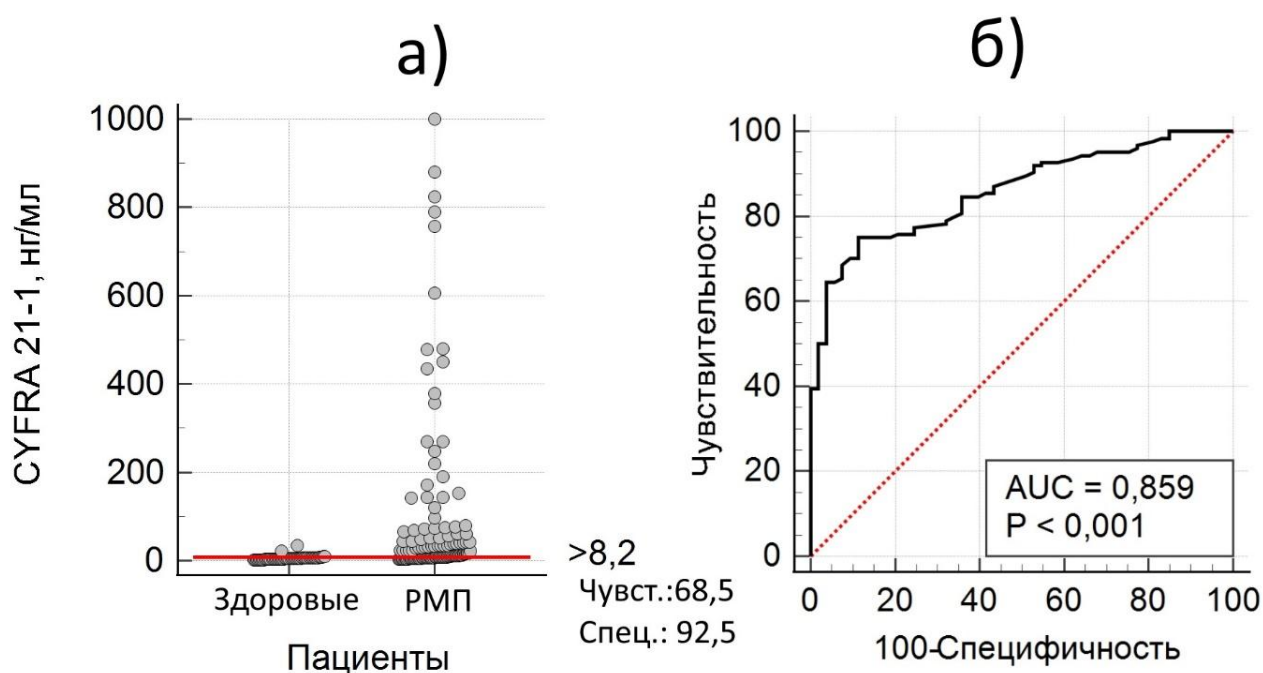


Рис.3.31. Концентрация CYFRA 21-1 в исследованных образцах мочи (а) и ROC-анализ полученных результатов (б).

При пороговом значении концентрации CYFRA 21-1 в 8,2 нг/мл чувствительность анализа составила 68,5%, а специфичность 92,5%. Если сравнивать с сурвивином, чувствительность CYFRA 21-1 как онкомаркера для диагностики РМП выше (на 8%), а специфичность немного хуже (на 3,7%). Также была исследована зависимость концентрации CYFRA 21-1 от клинико-морфологических характеристик (таблица 6).

Таблица 6. Уровень CYFRA 21-1 в моче пациентов в зависимости от клинико-морфологических характеристик РМП

Характеристика	Категория	CYFRA 21-1			P
		повышен	норма	МЕ (Q1-Q3), нг/мл	
Размер новообразования	≥3 см (n=56)	46 (82,1%)	10 (17,9%)	41 (22,5-226,6)	<b>0,003</b>
	<3 см (n=57)	32 (56,1%)	25 (43,9%)	9,1 (5,5-16,8)	
Количество новообразований	Множественные (n=41)	25 (58,5%)	17 (41,5%)	21,9 (8-49,1)	0,099
	Единичные (n=72)	53 (73,6%)	19 (26,4%)	15,7 (5-119,2)	
Степень злокачественности опухоли	Низкая G1-G2 (n=47)	28 (59,6%)	14 (40,4%)	10,3 (5,6-31,1)	0,093
	Высокая G3 (n=77)	57 (74%)	20 (26%)	34,8 (7,8-96,5)	
Глубина инвазии	НМИРМП (n=73)	40 (54,8%)	33 (45,2%)	9,8 (5,5-27,7)	<b>0,001</b>
	МИРМП (n=51)	45 (88,2%)	6 (11,8%)	41,5 (26,1-244,6)	
Гистологический тип	Уротелиальный (n=97)	65 (67%)	32 (33%)	21,1 (6,5-71,1)	0,054
	Атипичный (n=13)	12 (92,3%)	1 (7,7%)	40,6 (31,5-74,3)	

Была обнаружена взаимосвязь доли пациентов, у которых уровень CYFRA 21-1 повышен, с размером и глубиной инвазии опухоли. Чувствительность CYFRA 21-1 для диагностики НМИРМП оказалась невелика, также как и у сурвивина (54,8% vs 49,3%). Для мышечно-инвазивной формы рака чувствительность оказалась выше (88,2% vs 76,5%).

### 3.4.3.3 Результаты применения комбинированного анализа сурвивин/CYFRA 21-1

Если принять за условие положительного результата лабораторного теста на РМП превышение порогового уровня концентрации хотя бы одного из двух онкомаркеров, то чувствительность такой комбинации составит 82,3%, а специфичность 88,7%. Таким образом, улучшение чувствительности при

использовании комбинации сурвивин/СУFRA 21-1, по сравнению только с СУFRA 21-1 отдельно, составляет 13,8%, а специфичность снижается лишь на 3,8% (Рис. 3.32).

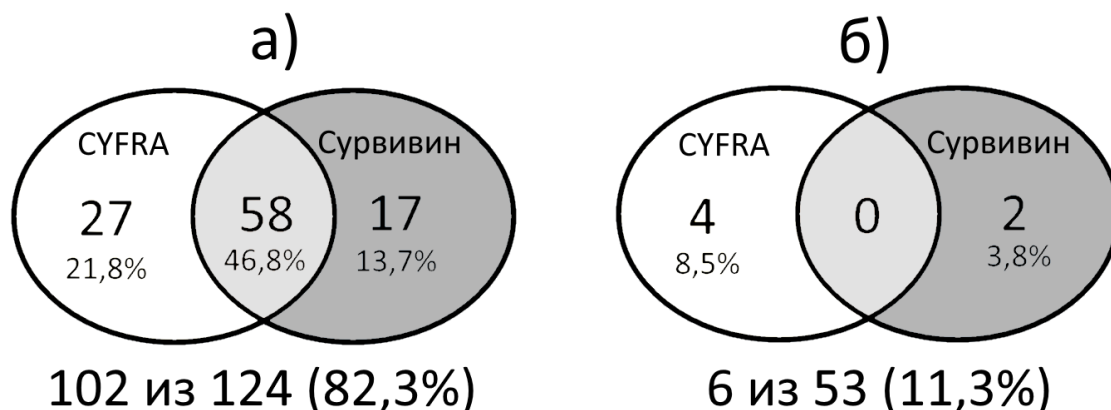


Рис. 3.32. Диаграмма Венна положительных случаев теста на РМП, (а) – для больных РМП, (б) – для здоровой группы.

Точность комбинированного анализа составила 85,5%. Подробные диагностические характеристики при отдельном и совместном использовании маркеров для теста на РМП приведены в Таблице 7.

Таблица 7. Сопоставление диагностических показателей маркеров и их комбинации

Маркер/комбинация	Чувст.	Спец.	PPV, %	NPV, %	Точность, %
Сурвивин	60,5	96,2	94,1	70,9	78,4
СУFRA 21-1	68,5	92,5	90,1	74,6	80,5
Сурв/СУFRA 21-1	82,3	88,7	87,9	83,3	85,5

Анализ корреляции клиничко-морфологических показателей РМП с уровнем сурвивина и СУFRA 21-1 продемонстрировал статистически значимое повышение данных онкомаркеров при наличии неблагоприятных предикторов течения заболевания: крупный размер опухоли  $\geq 3$  см, высокая степень злокачественности опухоли, а также мышечной инвазии (Таблица 8).

Таблица 8. Доля пациентов с превышенным порогом онкомаркеров в зависимости от клинико-морфологических характеристик РМП

Характеристика	Категория	Сурв. или CYFRA 21-1			Сурв. и CYFRA 21-1		
		повышен	норма	P	повышены	норма или 1 пов.	P
Размер новообразования	<3 см (n=57)	42 (73,7%)	15 (26,3%)	<b>0,016</b>	15 (26,3%)	42 (73,7%)	<b>0,001</b>
	≥3 см (n=56)	51 (91,1%)	5 (8,9%)		38 (67,9%)	18 (32,1%)	
Количество новообразований	Множественные (n=41)	30 (73,2%)	11 (26,8%)	0,055	17 (41,5%)	24 (58,5%)	0,310
	Единичные (n=72)	63 (87,5%)	9 (12,5%)		37 (51,4%)	35 (48,6%)	
Степень злокачественности опухоли	Низкая G1-G2 (n=47)	18 (72%)	7 (28%)	0,317	6 (24%)	19 (76%)	<b>0,009</b>
	Высокая G3 (n=77)	65 (84,4%)	12 (15,6%)		44 (57,1%)	33 (42,9%)	
Глубина инвазии опухоли	НМИРМП (n=73)	54 (74%)	19 (26%)	<b>0,004</b>	22 (30,1%)	51 (69,9%)	<b>0,001</b>
	МИРМП (n=51)	48 (94,1%)	3 (5,9%)		36 (70,6%)	15 (29,4%)	
Гистологический тип	Уротелиальный (n=97)	80 (82,5%)	17 (17,5%)	0,369	47 (48,5%)	50 (51,5%)	0,376
	Атипичный (n=13)	12 (92,3%)	1 (7,7%)		8 (61,5%)	5 (38,5%)	

Превышение порога концентрации хотя бы по одному из онкомаркеров наблюдается у пациентов с НМИРМП в 74% случаев, т.е. комбинированная тест система на 19,2% более чувствительна, чем определение CYFRA 21-1 в отдельности. У больных с МИРМП повышение концентрации одного из онкомаркеров определяется в 94,1% случаев, а только CYFRA 21-1 в 88,2%, т.е. увеличение чувствительности составило 5,9%. Таким образом, использование комбинации онкомаркеров сурвивин/CYFRA 21-1 имеет особую ценность для выявления НМИРМП.

Обнаружено, что превышение порогового уровня одновременно по двум онкомаркерам в моче у пациентов может служить фактором риска мышечной инвазии, высокой степени злокачественности и большого размера опухоли  $\geq 3$  см (таблица 9). Как видно из таблицы, применение одновременно двух онкомаркеров позволяет стратифицировать больных с большей степенью достоверности, нежели чем при использовании сурвивина в качестве индивидуального маркера.

Таблица 9. Стратификация больных по клинко-морфологическим характеристикам при использовании маркеров и их комбинации

Маркер/комбинация	Наличие инвазии	Высокая степень злокачественности	Размер новообразования $\geq 3$ см
	Отношение рисков, ОР (Доверительный интервал, ДИ)		
Сурвивин	1,47 (1,13 - 1,92)	1,36 (1,01 - 1,85)	1,71 (1,26 - 2,32)
CYFRA 21-1	1,61 (1,28 - 2,03)	1,24 (0,95 - 1,63)	1,46 (1,13 - 1,90)
Сурвивин и CYFRA 21-1	2,34 (1,58 - 3,47)	1,92 (1,19 - 3,10)	2,58 (1,61 - 4,13)

Исходя из этого, комбинированное использование онкомаркеров сурвивин/CYFRA 21-1 «открывает окно» возможностей не только для диагностики рака мочевого пузыря, но и для дооперационной стратификации больных в отношении рисков неблагоприятного прогноза, лабораторной оценки вероятного рецидива и/или прогрессирования заболевания.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Доля рака мочевого пузыря составляет 3-5% всех злокачественных новообразований и около 40% от опухолевых заболеваний мочеполовой системы [137]. Стандартные методы диагностики РМП – дорогие и инвазивные, с низкой чувствительностью для опухолей на ранних стадиях. В связи с этим требуется разработка лабораторных методов выявления РМП, лишённых данных недостатков. Поэтому поиск чувствительных и достоверных онкомаркеров в

настоящее время является актуальной задачей современной биотехнологии и биомедицины.

Данная работа посвящена разработке аналитической системы для обнаружения сурвивина в моче на основе целентеразин-зависимых люцифераз в качестве репортёрных молекул и оценке значимости белка сурвивина для диагностики и прогнозирования рака мочевого пузыря.

В ходе исследования нами разработан биолюминесцентный иммуноанализ «сэндвич» типа на основе люциферазы NanoLuc, способный выявлять сурвивин в диагностически значимом диапазоне концентраций. Разработанный метод успешно испытан на образцах мочи больных с клинически подтверждённым РМП. По диагностическим показателям разработанный способ выявления сурвивина не уступает коммерческим колориметрическим диагностикумам импортного производства.

Биолюминесцентным иммуноанализом было проанализировано значительное количество образцов пациентов с РМП. Показано, что сурвивин может использоваться для неинвазивной диагностики данного заболевания, хотя в случае немышечно-инвазивной формы рака рекомендуется использовать данный параметр в комбинации с другими онкомаркерами, такими как CYFRA 21-1. Кроме того, сурвивин позволяет проводить мониторинг пациентов, закончивших специализированное лечение, а также проводить стратификацию больных в отношении неблагоприятных прогностических факторов.

## ВЫВОДЫ

1. Сконструированы и получены все основные компоненты разрабатываемой аналитической системы: рекомбинантный сурвивин, гибридный белок сурвивин-обелин, конъюгаты обелина и NanoLuc с анти-сурвивин антителами. Изучены их основные биохимические свойства.
2. Разработан дизайн билюминесцентного микроанализа сурвивина в моче с использованием меток на основе фотопротеина обелина в конкурентном и «сэндвич» формате. Предел обнаружения сурвивина для конкурентного варианта анализа составил 163 пг/мл (9,8 пМ), для «сэндвич» варианта – 112 пг/мл (6,8 пМ), что не может обеспечить необходимую чувствительность для выявления этого онкомаркера.
3. Разработан дизайн билюминесцентного высокопроизводительного иммуноанализа сурвивина в моче на основе люциферазы NLuc. Рабочий диапазон определения сурвивина составляет от 15,6 до 1000 пг/мл, предел обнаружения –  $8,13 \pm 2,43$  пг/мл ( $0,49 \pm 0,15$  пМ), что позволяет выявлять данный онкомаркер в диагностически значимом диапазоне концентраций. Определены условия для стабильного хранения всех реагентов аналитической системы в течение 3-х месяцев.
4. Исследовано 188 клинических образцов мочи на содержание сурвивина разработанным билюминесцентным методом. Диагностическая чувствительность сурвивина как онкомаркера для выявления РМП составила 62%, специфичность – 97%. Результаты ROC анализа свидетельствует о способности разработанного анализа достоверно различать группы больных и здоровых пациентов ( $AUC = 0,824$ ,  $p < 0,001$ ).
5. Показана прогностическая значимость онкомаркера сурвивина при заболевании РМП. Повышенное содержание сурвивина в моче больных РМП является фактором

риска мышечной инвазии (ОР 1,47; ДИ: 1,13-1,92), высокой гистологической стадии (ОР 1,36; ДИ: 1,01-1,85) и большого размера опухоли (ОР 1,71; ДИ: 1,26-2,32). Отсутствие сурвивина в моче является благоприятным прогностическим фактором, увеличивающим медианный срок безрецидивной выживаемости пациентов на 2 года. Концентрация сурвивина снижается ниже порогового уровня после проведения специализированного лечения у сурвивин-положительных больных в 87,5% случаев.

6. При использовании сурвивина в качестве индивидуального маркера диагностическая чувствительность относительно ранних стадий заболевания (случаев НМИРМП) составила 52%. Одновременное выявление сурвивина с онкомаркером CYFRA 21-1 в моче больных позволяет увеличить чувствительность до 74% при специфичности анализа 89%. Превышение порогового уровня одновременно по двум онкомаркерам повышает риски мышечной инвазии (ОР 2,34; ДИ 1,58-3,47), высокой степени злокачественности (ОР 1,92; ДИ 1,19-3,10) и увеличения размера опухоли  $\geq 3$  см (ОР 2,58; ДИ 1,61-4,13).

## БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает сердечную благодарность своему научному руководителю доктору биологических наук Франк Людмиле Алексеевне и кандидату биологических наук Денисовой (Башмаковой) Евгении Евгеньевне, а также коллегам из лаборатории биолюминесцентных и экологических технологий ИБФ СО РАН за помощь в постановке и проведении экспериментов, интерес к работе и обсуждение полученных результатов.

Также автор выражает благодарность врачам из Красноярского краевого клинического онкологического диспансера имени А.И. Крыжановского и Красноярского государственного медицинского университета имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого за сбор и характеризацию биологических образцов, обсуждение полученных результатов и совместную подготовку публикаций, в особенности доктору медицинских наук Руслану Александровичу Зукову и Денису Владимировичу Черняеву.

Отдельно автор благодарит кандидата биологических наук Андрея Леонидовича Матвеева из лаборатории противомикробных препаратов Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН за получение мышинных поликлональных антител к сурвивину.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

PMPI – рак мочевого пузыря

HMIPMI – немышечно-инвазивный рак мочевого пузыря

MIPMI – мышечно-инвазивный рак мочевого пузыря

IAP – белки ингибиторы апоптоза

kDa – килодальтон

CPC – комплекс белков-хромосомных пассажиров

HVHP – белок, взаимодействующий с X-белком вируса гепатита В

XIAP – белок X-связанного ингибитора апоптоза

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ИФА – иммуноферментный анализ

IgG – иммуноглобулин G

CTZ – целентеразин

FMZ – фуримазин

RLuc – люцифераза коралла *Renilla*

BRET – резонансный перенос энергии биолюминесценции

GLuc – люцифераза *Gaussia princeps*

MLuc – люцифераза рачка *Metridia longa*

ВКЭ – вирус клещевого энцефалита

NLuc – люцифераза NanoLuc

SAV-OL – гибридный белок стрептавидин-обелин

proZZ-OL – гибридный белок proZZ-обелин

SOC – супероптимальный бульон

LB-среда – среда Лурия-Бертани

PBS – фосфатно-солевой буфер

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота, Na соль

ИПТГ – изопропил- $\beta$ -D-тиогалактопиранозид

ДМСО – диметилсульфоксид

БСА – бычий сывороточный альбумин

ТЕМЕД – тетраметилэтилендиамин

R1PL – штамм *E. coli* BL21(DE3) Codon Plus

ПААГ – полиакриламидный гель

SMCC – сукцинимидный эфир 4-(N-малеимидометил-) циклогексановой кислоты

PPV – положительная прогностическая ценность

NPV – отрицательная прогностическая ценность

$K_{aff}$  – константа аффинности

OL – фотопротеин обелин

Surv-OL – гибридный белок сурвивин-обелин

WT-OL – обелин дикого типа

CV – коэффициент вариации

ОР – относительный риск

ДИ – доверительный интервал

AUC – площадь под кривой

**СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Злокачественные новообразования в России в 2022 году (заболеваемость и смертность) / под ред. А. Д. Каприна, В. В. Старинского, А. О. Шахзадовой. И.В. Лисичниковой. – Москва: МНИОИ им. П. А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2023. – 252 с.
2. Charpentier, M. Noninvasive urine-based tests to diagnose or detect recurrence of bladder cancer / M. Charpentier, C. Gutierrez, T. Guillaudeau, G. Verhoest, R. Pedeux // *Cancers (Basel)*. – 2021. – Vol. 13. – № 7. – P. 1650.
3. Eissa, S. Detection of bladder carcinoma by combined testing of urine for hyaluronidase and cytokeratin 20 RNAs / S. Eissa, S.K. Kassim, R.A. Labib, I.M. El-Khouly, T.M. Ghaffer, M. Sadek, O.A. Razek, O. El-Ahmady // *Cancer*. – 2005. – Vol. 103. – № 7. – P. 1356-1362.
4. Vrooman, O.P. Urinary markers in bladder cancer / O. P. Vrooman, J. A. Witjes // *European urology*. – 2008. – Vol. 53. – № 5. – P. 909-916.
5. Fang, X. L. Overview of role of survivin in cancer: expression, regulation, functions, and its potential as a therapeutic target / X. L. Fang, X. P. Cao, J. Xiao, Y. Hu, M. Chen, H.K. Raza, H.Y. Wang, X. He, J.F. Gu, K.J. Zhang // *Journal of drug targeting*. – 2024. – Vol. 32. – № 3. – P. 223-240.
6. Shariat, S.F. Urine detection of survivin is a sensitive marker for the noninvasive diagnosis of bladder cancer / S.F. Shariat, R. Casella, S.M. Khoddami, G. Hernandez, T. Sulser, T.C. Gasser, S.P. Lerner // *The Journal of urology*. – 2004. – Vol. 171. – № 2. – P. 626-630.
7. Li, X. Sandwich ELISA for detecting urinary survivin in bladder cancer / X. Li, Y. Wang, J. Xu, Q. Zhang // *Chinese journal of cancer research*. – 2013. – Vol. 25. – № 4. – P. 375-381.

8. Ku, J.H. Urine survivin as a diagnostic biomarker for bladder cancer: a systematic review / J.H. Ku, G. Godoy, G.E. Amiel, S.P. Lerner // *BJU international*. – 2012. – Vol. 110. – № 5. – P. 630-636.
9. Srivastava, A. K. Diagnostic role of survivin in urinary bladder cancer / A.K. Srivastava, P.K. Singh, K. Srivastava, D. Singh, D. Dalela, S.K. Rath, M.M. Goel, M.L. Brahma Bhatt // *Asian Pacific journal of cancer prevention*. – 2013. – Vol. 14. – № 1. – P. 81-85.
10. Маркова С.В. Целентеразин–зависимые люциферазы / С.В. Маркова, Е.С. Высоцкий // *Биохимия*. – 2015. – Т. 6. – С. 845-866.
11. Johnson, M.E. Survivin: a bifunctional inhibitor of apoptosis protein / M.E. Johnson, E.W. Howerth // *Veterinary pathology*. – 2004. – Vol. 41. – № 6. – P. 599-607.
12. Garg, H. Survivin: a unique target for tumor therapy / H. Garg, P. Suri, J.C. Gupta, G.P. Talwar, S. Dubey // *Cancer cell international*. – 2016. – Vol. 16. – P. 49.
13. Li, Y. Survivin as a biological biomarker for diagnosis and therapy / Y. Li, W. Lu, J. Yang, M. Edwards, S. Jiang // *Expert opinion on biological therapy*. – 2021. – Vol. 21. – № 11. – P. 1429-1441.
14. Verdecia, M.A. Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement / M.A. Verdecia, H. Huang, E. Dutil, D.A. Kaiser, T. Hunter, J.P. Noel // *Nature structural biology*. – 2000. – Vol. 7. – № 77. – P. 602-608.
15. Chantalat, L. Crystal structure of human survivin reveals a bow tie-shaped dimer with two unusual alpha-helical extensions / L. Chantalat, D.A. Skoufias, J.P. Kleman, B. Jung, O. Dideberg, R.L. Margolis // *Molecular cell*. – 2000. – Vol. 6. – № 1. – P. 183-189.
16. Li, Z. Effects of survivin on angiogenesis in vivo and in vitro / Z. Li, W. Ren, Q. Zeng, S. Chen, M. Zhang, Y. Zhao, J. Cheng, X. Wang // *American journal of translational research*. – 2016. – Vol. 8. – № 2. – P. 270-283.

17. Lens, S.M. The case for survivin as mitotic regulator / S.M. Lens, G. Vader, R.H. Medema // *Current opinion in cell biology*. – 2006. – Vol. 18. – № 6. – P. 616-622.
18. Martínez-García, D. Therapeutic strategies involving survivin inhibition in cancer / D. Martínez-García, N. Manero-Rupérez, R. Quesada, L. Korrodi-Gregório, V. Soto-Cerrato // *Medicinal research reviews*. – 2019. – Vol. 39. – № 3. – P. 887-909.
19. Margulis, V. Survivin: a promising biomarker for detection and prognosis of bladder cancer / V. Margulis, Y. Lotan, S.F. Shariat // *World journal of urology*. – 2019. – Vol. 26. – № 1. – P. 59-65.
20. Mita, A.C. Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics / A.C. Mita, M.M. Mita, S.T. Nawrocki, F.J. Giles // *Clinical cancer research*. – 2008. – Vol. 14. – № 16. – P. 5000-5005.
21. Carmena, M. The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis / M. Carmena, M. Wheelock, H. Funabiki, W.C. Earnshaw // *Molecular cell biology*. – 2012. – Vol. 32. – № 12. – P. 789-803.
22. Reed, J.C. The Survivin saga goes in vivo / J.C. Reed // *The Journal of clinical investigation*. – 2001. – Vol. 108. – № 7. – P. 965-969.
23. Marusawa, H. HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression / H. Marusawa, S. Matsuzawa, K. Welsh, H. Zou, R. Armstrong, I. Tamm, J.C. Reed // *The EMBO journal*. – 2003. – Vol. 22. – № 11. – P. 2729-2740.
24. Sanhueza, C. The twisted survivin connection to angiogenesis / C. Sanhueza, S. Wehinger, J. Castillo Bennett, M. Valenzuela, G.I. Owen, A.F. Quest // *Molecular cancer*. – 2015. – Vol. 14. – P. 198.
25. Jaiswal, P. Survivin: A molecular biomarker in cancer / P.K. Jaiswal, A. Goel, R.D. Mittal // *The Indian journal of medical research*. – 2015. – Vol. 141. – № 4. – P. 389-397.

26. Sharp, J.D. Bladder cancer detection with urinary survivin, an inhibitor of apoptosis / J.D. Sharp, D.A. Hausladen, M.G. Maher, M.A. Wheeler, D.C. Altieri, R.M. Weiss // *Frontiers in bioscience*. – 2002. – Vol. 7. – P. 36-41.
27. Ziaee, S.A. Diagnosis of bladder cancer by urine survivin, an inhibitor of apoptosis: a preliminary report / S.A. Ziaee, S.J. Moula, S.M. Hosseini Moghaddam, D. Eskandar-Shiri // *Urology journal*. – 2006. – Vol. 3. – № 3. – P. 150-153.
28. Johnen, G. Performance of survivin mRNA as a biomarker for bladder cancer in the prospective study UroScreen / G. Johnen, K. Gawrych, H. Bontrup, B. Pesch, D. Taeger, S. Banek, M. Kluckert, H. Wellhäußer, F. Eberle, M. Nasterlack, G. Leng, A. Stenzl, T. Brüning // *PloS one*. – 2012. – Vol. 7. – № 4. – P. e35363.
29. Horstmann, M. Clinical experience with survivin as a biomarker for urothelial bladder cancer / M. Horstmann, H. Bontrup, J. Hennenlotter, D. Taeger, A. Weber, B. Pesch, G. Feil, O. Patschan, G. Johnen, A. Stenzl, T. Brüning // *World journal of urology*. – 2010. – Vol. 28. – № 3. – P. 399-404.
30. Gunaldi, M. The value of serum survivin level in early diagnosis of cancer / M. Gunaldi, N. Isiksacan, H. Kocoglu, Y. Okuturlar, O. Gunaldi, T.O. Topcu, M. Karabulut // *Journal of cancer research and therapeutics*. – 2018. – Vol. 14. – № 3. – P. 570-573.
31. Dobrzycka, B. Prognostic significance of pretreatment VEGF, survivin, and Smac/DIABLO serum levels in patients with serous ovarian carcinoma / B. Dobrzycka, B. Mackowiak-Matejczyk, K.M. Terlikowska, B. Kulesza-Bronczyk, M. Kinalski, S.J. Terlikowski // *Tumour biology*. – 2015. – Vol. 36. – № 6. – P. 4157-4165.
32. Muhammad, A.S. Performance of urinary survivin as a non-invasive molecular marker of bladder carcinoma in a schistosomiasis endemic area / A.S. Muhammad, I.A. Mungadi, E.D. Ndo, G.D. Kalayi // *Ghana medical journal*. – 2018. – Vol. 52. – № 2. – P. 74-78.

33. Sharaf, S. Evaluation of tissue and urinary survivin expression in non-muscle-invasive bladder cancer / S. Sharaf, A. Ketat, I. Diab, F. Dwidar, W. Sameh // African journal of urology. – 2012. – Vol. 18. – № 4. – P. 143-148.
34. Fisher, W.G. A method for isolation and identification of urinary biomarkers in patients with diabetic nephropathy / W.G. Fisher, J.E. Lucas, U.F. Mehdi, D.W. Qunibi, H.R. Garner, K.P. Rosenblatt, R.D. Toto // Proteomics. Clinical applications. – 2011. – Vol. 5. – № 11-12. – P. 603-612.
35. Crowther, J.R. The ELISA guidebook. Methods in molecular biology / J.R. Crowther. — Clifton, New Jersey: Humana Press, 2001. – 413 p.
36. Wu, A.H. A selected history and future of immunoassay development and applications in clinical chemistry / A.H. Wu // Clinica chimica acta. – 2006. – Vol. 369. – № 2. – P. 119-124.
37. Максимова, Н.Е. Основы иммуноанализа: учебное пособие / Н.Е. Максимова, Н.Н. Мочульская, В.В. Емельянов; под ред. Н.Н. Мочульской. – Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2021. — 148 с.
38. Марданлы, С.Г. Иммунохимические методы в клинической лабораторной диагностике": учебное пособие / С.Г. Марданлы, В.В. Симонов, Т.Ю. Гашенко, А.Г. Морозова, А.И. Жданович, П.В. Самосадова, М.С. Шарикова, И.И. Ильин. – Орехово-Зуево: ГГТУ, 2024. – 336 с.
39. Frank, L.A. Application of enzyme bioluminescence for medical diagnostics / L.A. Frank, V.V. Krasitskaya // Advances in biochemical engineering/biotechnology. – 2014. – Vol. 144. – P. 175-197.
40. Morales, M.A. Guide to selecting a biorecognition element for biosensors / M.A. Morales, J.M. Halpern // Bioconjugate chemistry. – 2018. – Vol. 29. – № 10. – P. 3231-3239.

41. Aydin, S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA / S. Aydin // *Peptides*. – 2015. – Vol. 72. – P. 4-15.
42. Li, M. Application of an efficient medium for chromogenic catalysis of tetramethylbenzidine with horseradish peroxidase / M. Li, H. Su, Y. Tu, Y. Shang, Y. Liu, C. Peng, H. Liu // *ACS Omega*. – 2019. – Vol. 4. – № 3. – P. 5459-5470.
43. Mishra, M. Improving the sensitivity of traditional Western blotting via Streptavidin containing Poly-horseradish peroxidase (PolyHRP) / M. Mishra, S. Tiwari, A. D. Gunaseelan, Li, B.D. Hammock, A.V. Gomes // *Electrophoresis*. – 2019. – Vol. 40. – № 12-13. – P. 1731-1739.
44. Li, D. Comparison of monomeric and polymeric horseradish peroxidase as labels in competitive ELISA for small molecule detection / Li, D., Ying, Y., Wu, J., R. Niessner, D. Knopp // *Microchimica acta*. – 2013. – Vol. 180. – P. 711-717.
45. Gleichenhagen, J. Evaluation of a new survivin ELISA and UBC® rapid for the detection of bladder cancer in urine / J. Gleichenhagen, C. Arndt, S. Casjens, C. Meinig, H. Gerullis, I. Raiko, T. Brüning, T. Ecke, G. Johnen // *International journal of molecular sciences*. – 2018. – Vol. 19. – № 1. – P. 226.
46. Gleichenhagen, J. Exploring solid-phase proximity ligation assay for survivin detection in urine / J. Gleichenhagen, C. Arndt, S. Casjens, C. Töpfer, H. Gerullis, I. Raiko, D. Taeger, T. Ecke, T. Brüning, G. Johnen // *PloS one*. – 2022. – Vol. 17. – № 6. – P. e0270535.
47. Chang, Y. Microplate magnetic chemiluminescence immunoassay for detecting urinary survivin in bladder cancer / Y. Chang, J. Xu, Q. Zhang // *Oncology letters*. – 2017. – Vol. 14. – № 4. – P. 4043–4052.
48. Yang, Y. Detection of urinary survivin using a magnetic particles-based chemiluminescence immunoassay for the preliminary diagnosis of bladder cancer and

renal cell carcinoma combined with LAPT4B / Y. Yang, J. Xu, Q. Zhang // *Oncology letters*. – 2018. – Vol. 15. – № 5. – P. 7923-7933.

49. Geka, G. Comparison of survivin determination by surface-enhanced fluorescence and Raman Spectroscopy on nanostructured silver substrates / G. Geka, A. Kanioura, I. Kochylas, V. Likodimos, S. Gardelis, A. Dimitriou, N. Papanikolaou, A. Economou, S. Kakabakos, P. Petrou // *Biosensors*. – 2024. – Vol. 14. – № 10. – P. 479.

50. Jazayeri, M.H. Rapid noninvasive detection of bladder cancer using survivin antibody-conjugated gold nanoparticles (GNPs) based on localized surface plasmon resonance (LSPR) / M.H. Jazayeri, T. Aghaie, R. Nedaeinia, M. Manian, H. Nickho // *Cancer immunology, immunotherapy*. – 2020. – Vol. 69. – № 9. – P. 1833-1840.

51. Xu, P. Combination of ultrathin micro-patterned MXene and PEDOT: Poly(styrenesulfonate) enables organic electrochemical transistor for amperometric determination of survivin protein in children osteosarcoma / P. Xu, C. Lu, D. Wang, D. Fu // *Microchimica acta*. – 2021. – Vol. 188. – P. 301.

52. Shimomura, O. *Bioluminescence: chemical principles and methods* / O. Shimomura, I. Yampolsky. – Singapore: World Scientific, 2019. – 522 p.

53. Bessho-Uehara, M. Evidence for de novo biosynthesis of the luminous substrate coelenterazine in ctenophores / M. Bessho-Uehara, W. Huang, W.L. Patry, W.E. Browne, J.K. Weng, S.H.D. Haddock // *iScience*. – 2020. – Vol. 23. – № 12. – P. 101859.

54. Oba, Y. Biosynthesis of coelenterazine in the deep-sea copepod, *Metridia pacifica* / Y. Oba, S. Kato, M. Ojika, S. Inouye // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2009. – Vol. 390. – № 3. – P. 684-688.

55. Adamczyk, M. Synthesis of coelenterazine / M. Adamczyk, D.D. Johnson, P.G. Mattingly, Y. Pan, R.E. Reddy // *Organic preparations and procedures international*. – 2001. – Vol. 33. – № 5. – P. 477-485.

56. Lu, Y. Efficient synthesis and antioxidant activity of coelenterazine analogues / Y. Lu, R. Hendra, A.J. Oakley, P.A. Keller // *Tetrahedron letters*. – 2014. – Vol. 55. – № 45. – P. 6212-6215.
57. Shrestha, T.B. Strategies for large-scale synthesis of coelenterazine for in vivo applications / T.B. Shrestha, D.L. Troyer, S.H. Bossmann // *Synthesis*. – 2014. – Vol. 46. – № 5. – P. 646-652.
58. Франк, Л.А. Целентеразин-зависимые люциферазы: свойства и применение в молекулярном анализе / Л.А. Франк, В.В. Красицкая // *Вестник Московского университета. Серия 2: Химия*. – 2024. – Т. 65. – № 3. – С. 245-254.
59. Kaskova, Z.M. 1001 lights: luciferins, luciferases, their mechanisms of action and applications in chemical analysis, biology and medicine / Z.M. Kaskova, A.S. Tsarkova, I.V. Yampolsky // *Chemical Society reviews*. – 2016. – Vol. 45. – № 21. – P. 6048-6077.
60. Endo, M. Advanced bioluminescence system for in vivo imaging with brighter and red-shifted light emission / M. Endo, T. Ozawa // *International journal of molecular sciences*. – 2020. – Vol. 21. – № 18. – P. 6538.
61. Кудрявцев, А.Н. Тест-система для выявления вируса клещевого энцефалита биолюминесцентным иммуноанализом / А.Н. Кудрявцев, Л.П. Буракова, К.А. Баринаова, Л.А. Франк // *Журнал Сибирского федерального университета. Серия: Биология*. – 2020. – Т. 13. – № 3. – С. 310-321.
62. Burbelo, P.D. Rapid, simple, quantitative, and highly sensitive antibody detection for lyme disease / P.D. Burbelo, A.T. Issa, K.H. Ching, J.I. Cohen, M.J. Iadarola, A. Marques // *Clinical and vaccine immunology*. – 2010. – Vol. 17. – № 6. – P. 904-909.
63. Burbelo, P.D. A simplified immunoprecipitation method for quantitatively measuring antibody responses in clinical sera samples by using mammalian-produced Renilla luciferase-antigen fusion proteins / P.D. Burbelo, R. Goldman, T.L. Mattson // *BMC biotechnology*. – 2005. – Vol. 5. – P. 22.

64. Verhaegent, M. Recombinant Gaussia luciferase. Overexpression, purification, and analytical application of a bioluminescent reporter for DNA hybridization / M. Verhaegent, T.K. Christopoulos // *Analytical chemistry*. – 2002. – Vol. 74. – № 17. – P. 4378-4385.
65. Tannous, B.A. Gaussia luciferase reporter assay for monitoring biological processes in culture and in vivo / B.A. Tannous // *Nature protocols*. – 2009. – Vol. 4. – № 4. – P. 582-591.
66. Kim, S.B. Superluminescent variants of marine luciferases for bioassays / S.B. Kim, H. Suzuki, M. Sato, H. Tao // *Analytical chemistry*. – 2011. – Vol. 83. – № 22. – P. 8732–8740.
67. Remy, I. A highly sensitive protein-protein interaction assay based on Gaussia luciferase / I. Remy, S.W. Michnick // *Nature methods*. – 2006. – Vol. 3. – № 12. – P. 977-979.
68. Markova, S.V. Cloning and expression of cDNA for a luciferase from the marine copepod *Metridia longa*. A novel secreted bioluminescent reporter enzyme // S.V. Markova, S. Golz, L.A. Frank, B. Kalthof, E.S. Vysotski // *The Journal of biological chemistry*. – 2004. – Vol. 279. – № 5. – P. 3212-3217.
69. Markova, S.V. The smallest natural high-active luciferase: cloning and characterization of novel 16.5-kDa luciferase from copepod *Metridia longa* / S.V. Markova, M.D. Larionova, L.P. Burakova, E.S. Vysotski // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2015. – Vol. 457. – № 1. – P. 77-82.
70. Borisova, V.V. Recombinant *Metridia* luciferase isoforms: expression, refolding and applicability for in vitro assay / V.V. Borisova, L.A. Frank, S.V. Markova, L.P. Burakova, E.S. Vysotski // *Photochemical and photobiological sciences*. – 2008. – Vol. 7. – № 9. – P. 1025-1031.

71. Larionova, M.D. The smallest isoform of *Metridia longa* luciferase as a fusion partner for hybrid proteins / M.D. Larionova, S.V. Markova, N.V. Tikunova, E.S. Vysotski // *International journal of molecular sciences*. – 2020. – Vol. 21. – № 14. – P. 4971.
72. Lupold, S.E. A real time *Metridia* luciferase based non-invasive reporter assay of mammalian cell viability and cytotoxicity via the  $\beta$ -actin promoter and enhancer / S.E. Lupold, T. Johnson, W.H. Chowdhury, R. Rodriguez // *PloS one*. – 2012. – Vol. 7. – № 5. – P. e36535.
73. Маркова, С.В. Биолюминесцентный мониторинг обеспечивает наблюдение за экспрессией генов в живых клетках и тканях / С.В. Маркова, Н.П. Маликова, Е.С. Высоцкий, Л.А. Франк, И.И. Гительзон // *Биофизика*. – 2017. – Т. 62. – № 3. – С. 618-624
74. Inouye, S. Secretional luciferase of the luminous shrimp *Oplophorus gracilirostris*: cDNA cloning of a novel imidazopyrazinone luciferase / S. Inouye, K. Watanabe, H. Nakamura, O. Shimomura // *FEBS letters*. – 2000. – Vol. 481. – № 1. – P. 19–25.
75. Inouye, S. Overexpression, purification and characterization of the catalytic component of *Oplophorus* luciferase in the deep-sea shrimp, *Oplophorus gracilirostris* / S. Inouye, S. Sasaki // *Protein expression and purification*. – 2007. – Vol. 56. – № 2. – P. 261-268.
76. England, C.G. NanoLuc: A small luciferase is brightening up the field of bioluminescence / C.G. England, E.B. Ehlerding, W. Cai // *Bioconjugate chemistry*. – 2016. – Vol. 27. – № 6. – P. 1175-1187.
77. Walker, J.R. Highly potent cell-permeable and impermeable NanoLuc luciferase inhibitors / J.R. Walker, M.P. Hall., C.A. Zimprich, M.B. Robers, S.J. Duellman, T. Machleidt, J. Rodriguez, W. Zhou // *ACS chemical biology*. – 2017. – Vol. 12. – № 4. – P. 1028–1037.

78. Nemergut, M. Illuminating the mechanism and allosteric behavior of NanoLuc luciferase / M. Nemergut, D. Pluskal, J. Horackova, T. Sustrova, J. Tulis, T. Barta, R. Baatallah, G. Gagnot, V. Novakova, M. Majerova, K. Sedlackova, S.M. Marques, M. Toul, J. Damborsky, Z. Prokop, D. Bednar, Y.L. Janin, M. Marek // *Nature communications*. – 2023. – Vol. 14. – № 1. – P. 7864.
79. Hall, M.P. Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate // M.P. Hall, J. Unch, B.F. Binkowski, M.P. Valley, B.L. Butler, M.G. Wood, P. Otto, K. Zimmerman, G. Vidugiris, T. Machleidt, M.B. Robers, H.A. Benink, C.T. Eggers, M.R. Slater, P.L. Meisenheimer, D.H. Klaubert, F. Fan, L.P. Encell, K.V. Wood // *ACS chemical biology*. – 2012. – Vol. 7. – № 11. – P. 1848-1857.
80. Dixon, A.S. NanoLuc complementation reporter optimized for accurate measurement of protein interactions in cells / A.S. Dixon, M.K. Schwinn, M.P. Hall, K. Zimmerman, P. Otto, T.H. Lubben, B.L. Butler, B.F. Binkowski, T. Machleidt, T.A. Kirkland, M.G. Wood, C.T. Eggers, L.P. Encell, K.V. Wood // *ACS chemical biology*. – 2016. – Vol. 11. – № 2. – P. 400–408.
81. Shetty S.K. A novel NanoBiT-based assay monitors the interaction between lipoprotein lipase and GPIHBP1 in real time / S.K. Shetty, R.L. Walzem, B.S.J. Davies // *Journal of lipid research*. – 2020. – Vol. 61. – № 4. – P. 546-559.
82. Adamson, H. Rapid Quantification of *C. difficile* glutamate dehydrogenase and toxin B (TcdB) with a NanoBiT split-luciferase assay / H. Adamson, M.O. Ajayi, K.E. Gilroy, M.J. McPherson, D.C. Tomlinson, L.J.C. Jeuken // *Analytical chemistry*. – 2022. – Vol. 94. – № 23. – P. 8156-8163.
83. Azad, T. A High-Throughput NanoBiT-based serological assay detects SARS-CoV-2 Seroconversion / T. Azad, R. Rezaei, R. Singaravelu, T.R. Jamieson, M.J.F. Crupi, A. Surendran, J. Poutou, P. Taklifi, J. Cowan, D.W. Cameron, C.S. Ilkow // *Nanomaterials (Basel)*. – 2021. – Vol. 11. – № 3. – P. 807.

84. Campbell, E. Therapeutic drug monitoring of immunotherapies with novel Affimer-NanoBiT sensor construct / E. Campbell, H. Adamson, T. Luxton, C. Tiede, C. Wälti, D.C. Tomlinson, L.J.C. Jeuken // *Sensors and diagnostics*. – 2023. – Vol. 3. – № 1. – P. 104-111.
85. Xie, X. Nanobody/NanoBiT system-mediated bioluminescence immunosensor for one-step homogeneous detection of trace ochratoxin A in food / X. Xie, Z. He, C. Qu, Z. Sun, H. Cao, X. Liu // *Journal of hazardous materials*. – 2022. – Vol. 437. – P. 129435.
86. Kudryavtsev A.N. Designing the homogeneous competitive bioluminescence-based assay for tick-borne encephalitis virus (TBEV) point-of-care detection / A.N. Kudryavtsev, E.E. Denisova, V.V. Krasitskaya, I.K. Baykov, N.V. Tikunova, L.A. Frank // *Analytical and bioanalytical chemistry*. – 2025. – Vol. 417. – № 26. – P. 5931-5939.
87. Dale, N.C. NanoBRET: The Bright Future of Proximity-Based Assays / N.C. Dale, E.K.M. Johnstone, C.W. White, K.D.G. Pflieger // *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. – 2019. – Vol. 7. – P. 56.
88. Mo, X.L. Enabling systematic interrogation of protein-protein interactions in live cells with a versatile ultra-high-throughput biosensor platform / X.L. Mo, Y. Luo, A.A. Ivanov, R. Su, J.J. Havel, Z. Li, F.R. Khuri, Y. Du, H. Fu // *Journal of molecular cell biology*. – 2016. – Vol. 8. – № 3. – P. 271–281.
89. Park, I.S. Identification of inhibitors of Bcl-2 family protein-protein interaction by combining the BRET screening platform with virtual screening / I.S. Park, H.R. Seo, K. Kim, H. Lee, D. Shum, I. Choi, J. Kim // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2020. – Vol. 527. – № 3. – P. 709–715.
90. Robers, M.B. Target engagement and drug residence time can be observed in living cells with BRET / M.B. Robers, M.L. Dart, C.C. Woodrooffe, C.A. Zimprich, T.A. Kirkland, T. Machleidt, K.R. Kupcho, S. Levin, J.R. Hartnett, K. Zimmerman, A.L. Niles, R.F. Ohana, D.L. Daniels, M. Slater, M.G. Wood, M. Cong, Y.Q. Cheng, K.V. Wood // *Nature communications*. – 2015. – Vol. 6. – P. 10091.

91. Stoddart, L.A. NanoBRET Approaches to Study Ligand Binding to GPCRs and RTKs / L.A. Stoddart, L.E. Kilpatrick, S.J. Hill // Trends in pharmacological sciences. – 2018. – Vol. 39. – № 2. – P. 136-147.
92. Stacer, A.C. NanoLuc reporter for dual luciferase imaging in living animals / A.C. Stacer, S. Nyati, P. Moudgil, R. Iyengar, K.E. Luker, A. Rehemtulla, G.D. Luker // Molecular imaging. – 2013. – Vol. 12. – № 7. – P. 1-13.
93. Chu, J. A bright cyan-excitable orange fluorescent protein facilitates dual-emission microscopy and enhances bioluminescence imaging in vivo / J. Chu, Y. Oh, A. Sens, N. Ataie, H. Dana, J.J. Macklin, T. Laviv, E.S. Welf, K. M. Dean, F. Zhang, B.B. Kim, C.T. Tang, M. Hu, M.A. Baird, M.W. Davidson, M.A. Kay, R. Fiolka, R. Yasuda, D.S. Kim, H.L. Ng, M.Z. Lin // Nature biotechnology. – 2016. – Vol. 34. – № 7. – P. 760-767.
94. Kamiya, G. NanoLuc-Driven Multiplex Imaging Platforms Incorporating Novel G-series Coelenterazine Variants / G. Kamiya, N. Kitada, T. Furuta, S. Thangudu, A. Natarajan, R. Paulmurugan, S. Maki, S. Kim // Bioconjugate chemistry. – 2026. – Vol. 37. – № 5. – P. 930-941.
95. Wang, H. A simple and high-throughput luciferase immunosorbent assay for both qualitative and semi-quantitative detection of anti-HIV-1 antibodies / H. Wang, Q. Cai, Y. Liang, J. Shui, S. Tang // Virus research. – 2019. – Vol. 263. – P. 9-15.
96. Liang, Y. A luciferase immunosorbent assay for quantitative detection of IgG antibodies against SARS-CoV-2 nucleoprotein / Y. Liang, H. Yan, L. Huang, J. Zhao, H. Wang, M. Kang, Z. Wan, J. Shui, S. Tang // Journal of virological methods. – 2021. – Vol. 292. – P. 114141.
97. Oyama, H. NanoLuc luciferase as a suitable fusion partner of recombinant antibody fragments for developing sensitive luminescent immunoassays / H. Oyama, Y. Kiguchi, I. Morita, T. Miyashita, A. Ichimura, H. Miyaoka, A. Izumi, S. Terasawa, N. Osumi, H. Tanaka, T. Niwa, N. Kobayashi // Analytica chimica acta. – 2021. – Vol. 1161. – P. 238180.

98. Kiguchi, Y. Framework-Directed Amino-Acid Insertions Generated over 55-Fold Affinity-Matured Antibody Fragments That Enabled Sensitive Luminescent Immunoassays of Cortisol / Y. Kiguchi, I. Morita, K. Yamaki, S. Takegami, N. Kobayashi // *Biological and pharmaceutical bulletin*. – 2023. – Vol. 46. – № 12. – P. 1661-1665.
99. Ren, W. One-Step Ultrasensitive Bioluminescent Enzyme Immunoassay Based on Nanobody/Nanoluciferase Fusion for Detection of Aflatoxin B1 in Cereal / W. Ren, Z. Li, Y. Xu, D. Wan, B. Barnych, Y. Li, Z. Tu, Q. He, J. Fu, B.D. Hammock // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 2019. – Vol. 68. – № 18. – P. 5221-5229.
100. Krasitskaya, V.V. Luciferase NLuc Site-Specific Conjugation to Generate Reporters for In Vitro Assays // V.V. Krasitskaya, M.K. Efremov, L.A. Frank // *Bioconjugate chemistry*. – 2023. – Vol. 34. – № 7. – P. 1282-1289.
101. Высоцкий, Е.С. Кальций-регулируемые фотопротейны морских кишечнорастворимых / Е.С. Высоцкий, С.В. Маркова, Л.А. Франк // *Молекулярная биология*. – 2006. – Т. 40. – № 3. – С. 404-317.
102. Frank, L.A. Ca<sup>2+</sup>-Regulated Photoproteins: Effective Immunoassay Reporters / L.A. Frank // *Sensors*. – 2010. – Vol. 10. – № 12. – P. 11287–11300.
103. Brini, M. Calcium-sensitive photoproteins / M. Brini // *Methods*. – 2008. – Vol. 46. – № 3. – P. 160–166.
104. Inouye, S. Cloning and sequence analysis of cDNA for the luminescent protein aequorin / S. Inouye, M. Noguchi, Y. Sakaki, Y. Takagi, T. Miyata, S. Iwanaga, T. Miyata, F.I. Tsuji // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1985. – Vol. 82. – № 10. – P. 3154–3158.
105. *Measuring Calcium and Calmodulin Inside and Outside Cells* / ed. O. H. Petersen. – Berlin, Heidelberg: Springer, 2001. – 301 p.

106. Rogers, K.L. Non-invasive in vivo imaging of calcium signaling in mice / K.L. Rogers, S. Picaud, E. Roncali, R. Boisgard, C. Colasante, J. Stinnakre, B. Tavitian, P. Brûlet // *PloS one*. – 2007. – Vol. 2. – № 10. – P. e974.
107. Kudryavtsev, A.N. Simultaneous bioluminescent immunoassay of serum total and IgG-bound prolactins / Kudryavtsev A.N., Krasitskaya V.V., Petunin A.I., Burakov A.Y., Frank L.A. // *Analytical chemistry*. – 2012. – Vol. 84. – № 7. – P. 3119-3124.
108. Frank, L.A. Bioluminescent immunoassay of thyrotropin and thyroxine using obelin as a label / L.A. Frank, A.I. Petunin, E.S. Vysotski // *Analytical biochemistry*. – 2004. – Vol. 325. – № 2. – P. 240-246.
109. Davydova, A. Reporter-recruiting bifunctional aptasensor for bioluminescent analytical assays / A. Davydova, V. Krasitskaya, P. Vorobjev, V. Timoshenko, A. Tupikin, M. Kabilov, L. Frank, A. Venyaminova, M. Vorobyeva // *RSC advances*. – 2020. – Vol. 10. – № 54. – P. 32393–32399.
110. Davydova, A. Development and characterization of novel 2'-F-RNA aptamers specific to human total and glycated hemoglobins / A. Davydova, M. Vorobyeva, E. Bashmakova, P. Vorobjev, O. Krasheninina, A. Tupikin, M. Kabilov, V. Krasitskaya, L. Frank, A. Venyaminova // *Analytical biochemistry*. – 2019. – Vol. 570. – P. 43-50.
111. Krasitskaya, V.V. Bioluminescent aptamer-based sandwich-type assay of anti-myelin basic protein autoantibodies associated with multiple sclerosis / V.V. Krasitskaya, V.V. Chaukina, M.V. Abroskina, M.A. Vorobyeva, A.A. Ilminskaya, M.R. Kabilov, S.V. Prokopenko, G.A. Nevinsky, A.G. Venyaminova, L.A. Frank // *Analytica chimica acta*. – 2019. – Vol. 1064. – P. 112-118.
112. Krasitskaya, V.V. Obelin mutants as reporters in bioluminescent dual-analyte binding assay / V.V. Krasitskaya, A.N. Kudryavtsev, L.A. Frank, O. Shimomura // *Analytical methods*. – 2013. – Vol. 5. – № 3. – P. 636-640.

113. Bashmakova, E.E. Bioluminescent SNP genotyping technique: Development and application for detection of melanocortin 1 receptor gene polymorphisms / E.E. Bashmakova, V.V. Krasitskaya, A.A. Bondar, E.N. Eremina, E.V. Slepov, R.A. Zukov, L.A. Frank // *Talanta*. – 2018. – Vol. 189. – P. 111-115.
114. Frank L.A. Creation of Artificial Luciferases to Expand their Analytical Potential / L.A. Frank // *Combinatorial chemistry and high throughput screening*. – 2015. – Vol. 18. – № 10. – P. 919-929.
115. Bashmakova, E.E. Hybrid Minimal Core Streptavidin-Obelin as a Versatile Reporter for Bioluminescence-based Bioassay / Bashmakova E.E., Krasitskaya V.V., Kudryavtsev A.N., Grigorenko V.G., Frank L.A. // *Photochemistry and photobiology*. – 2017. – Vol. 93. – № 2. – P. 548-552.
116. Frank, L.A. Use of proZZ-obelin fusion protein in bioluminescent immunoassay / L.A. Frank, V.A. Illarionova, E.S. Vysotski // *Biochemical and biophysical research communications*. – 1996. – Vol. 219. – № 2. – P. 475-479.
117. Ereemeeva, E.V. Hydrogen-bond networks between the C-terminus and Arg from the first  $\alpha$ -helix stabilize photoprotein molecules / E.V. Ereemeeva, L.P. Burakova, V.V. Krasitskaya, A.N. Kudryavtsev, O. Shimomura, L.A. Frank // *Photochemical and photobiological sciences*. – 2014. – Vol. 13. – P. 541–547.
118. Hori, K. Structure of native *Renilla reinformis* luciferin / K. Hori, H. Charbonneau, R.C. Hart, M.J. Cormier // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1977. – Vol. 74. – P. 4285-4287.
119. Krasitskaya, V.V. The Hybrid Protein ZZ–OL as an Analytical Tool for Biotechnology Research / V.V. Krasitskaya, E.E. Bashmakova, A.N. Kudryavtsev, M.A. Vorobjeva, E.A. Shatunova, L.A. Frank // *Russian journal of bioorganic chemistry*. – 2020. – Vol. 46. – № 6. – P. 1004-1010.

120. Krasitskaya, V.V. Mutants of Ca<sup>2+</sup>-regulated Photoprotein Obelin for Site-specific Conjugation / Krasitskaya V.V., Burakova L.P., Komarova A.A., Bashmakova E.E., Frank L.A. // *Photochemistry and photobiology*. – 2017. – Vol. 93. – P. 553-557.
121. Panamarev, N.S. Urine survivin (BIRC5) bioluminescence-based immunoassay / N.S. Panamarev, A.L. Matveev, D.V. Chernyaev, R.A. Zukov, L.A. Frank // *Analytical methods*. – 2025. – Vol.17. – №23. – P. 4718–4722.
122. Laemli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4 / U. K. Laemli // *Nature*. – 1970. – Vol. 227. – P. 680–685.
123. Burakova, L.P. Bioluminescent detection probe for tick-borne encephalitis virus immunoassay / L.P. Burakova, A.N. Kudryavtsev, G.A. Stepanyuk, I.K. Baykov, V.V. Morozova, N.V. Tikunova, M.A. Dubova, V.N. Lyapustin, V.V. Yakimenko, L.A. Frank // *Analytical and bioanalytical chemistry*. – 2015. – Vol.407. – № 18. – P. 5417-5423.
124. pET System Manual. 11th ed. – San Diego: Novagen; EMD Biosciences, Inc., 2005. – 45 p.
125. Beatty, J.D. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay / J.D. Beatty, B.J Beatty, W.G. Vlahos // *Journal of immunological methods*. – 1987. – Vol. 100. – P. 173–179.
126. Correa, V.A. Modified ELISA for antibody avidity evaluation: The need for standardization / V.A. Correa, T.S. Rodrigues, A.I. Portilho, G. Trzewikoswki de Lima, E. De Gaspari // *Biomedical journal*. – 2021. – Vol. 44. – № 4. – P. 433-438.
127. Belogurova, N.V. Spectral components of bioluminescence of aequorin and obelin / N.V. Belogurova, N.S. Kudryasheva, R.R. Alieva, A.G. Sizykh // *Journal of Photochemistry and photobiology B: Biology*. – 2008. – Vol. 92. – № 2. – P. 117-122.
128. Жебентяев, А. И. Иммуноферментный метод анализа / А.И. Жебентяев, Е.Н. Каткова // *Вестник фармации*. – 2013. – № 2 (60). – С. 90-97.

129. Dixit, C.K. Development of a high sensitivity rapid sandwich ELISA procedure and its comparison with the conventional approach / C.K. Dixit, S.K. Vashist, F.T. O'Neill, B. O'Reilly, B.D. MacCraith, R. O'Kennedy // *Analytical chemistry*. – 2010. – Vol. 82. – № 16. – P. 7049–7052.
130. Франк, Л.А. Синтез конъюгатов Ca<sup>2+</sup>-регулируемого фотопротеина обелина с иммуноглобулинами и их использование в качестве меток в иммуноанализе / Л.А. Франк, А.И. Петунин., Е.С. Высоцкий // *Биоорганическая химия*. – 2004. – Т. 30. – № 4. – С. 364-368.
131. Башмакова, Е. Е. Выявление однонуклеотидных полиморфизмов на основе производных Ca<sup>2+</sup>-регулируемого фотопротеина обелина: дисс. канд-та биол. наук: 03.01.06 / Башмакова Евгения Евгеньевна. – Красноярск, 2017. – 98 с.
132. Kamat, A. M. Bladder cancer / A.M. Kamat, N.M. Hahn, J.A. Efstathiou, S.P. Lerner, P.U. Malmström, W. Choi, C.C. Guo, Y. Lotan, W. Kassouf // *Lancet*. – 2016. – Vol. 388. – №. 10061. – P. 2796-2810.
133. Jeon, C. Prognostic role of survivin in bladder cancer: a systematic review and meta-analysis / C. Jeon, M. Kim, C. Kwak, H.H. Kim, J.H. Ku // *PloS one*. – 2013. – Vol. 8. – №. 10. – P. e76719.
134. Shariat, S. F. Survivin as a prognostic marker for urothelial carcinoma of the bladder: a multicenter external validation study / S.F. Shariat, P.I. Karakiewicz, G. Godoy, J.A. Karam, R. Ashfaq, Y. Fradet, H. Isbarn, F. Montorsi, C. Jeldres, P.J. Bastian, M.E. Nielsen, S.C. Müller, A.I. Sagalowsky, Y. Lotan // *Clinical cancer research*. – 2009. – Vol. 15. – №. 22. – P. 7012-7019.
135. Setianingsih, Y.A. Diagnostic accuracy of urinary cytokeratin fragment-19 (CYFRA21-1) for bladder cancer / Y.A. Setianingsih, W. Djatisoesanto, T.B. Laksita, A. Aryati // *Narra J*. – 2024. – Vol. 4. – №. 3. – P. e1142.

136. Jeong, S. Diagnostic values of urine CYFRA21-1, NMP22, UBC, and FDP for the detection of bladder cancer. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* / S. Jeong, Y. Park, Y. Cho, Y.R. Kim, H.S. Kim // *Clinica chimica acta*. – 2012. – Vol. 414. – P. 93-100.

137. Аксель, Е.М. Статистика злокачественных новообразований мочевых и мужских половых органов в России и странах бывшего СССР / Е.М. Аксель, В.Б. Матвеев // *Онкоурология*. – 2019. – Т15. – № 2. – С.15-24.