

УДК 577.151;579.01/08;571.27

РЕКОМБИНАНТНЫЕ ЭНДОПЕПТИДАЗЫ IdeS И IdeZ И ВОЗМОЖНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

© 2023 И.С. Бокша^{1,2*}, В.Г. Лунин¹, Т.А. Данилова¹, М.С. Попонова¹,
Н.Б. Поляков¹, А.М. Ляшук¹, С.В. Константинова¹, З.М. Галушкина¹, Е.В. Устенко¹

¹ Национальный исследовательский центр эпидемиологии
и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи,
123098 Москва, Россия; электронная почта: boksha_irina@mail.ru

² ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», 115522 Москва, Россия

Поступила в редакцию 30.03.2023

После доработки 14.04.2023

Принята к публикации 15.04.2023

Эндопептидазы IdeS и IdeZ – факторы вирулентности стрептококков, специфически расщепляющие тяжёлые цепи IgG, интересны с точки зрения биотехнологии, медицины и ветеринарии. Гены *ideS* и *ideZ* (в случае *ideS* ген клонирован из коллекционного штамма *Streptococcus pyogenes*, в случае *ideZ* – синтетический из *Streptococcus zooepidemicus*) клонированы и экспрессированы в системе гетерологичной экспрессии в *Escherichia coli*, в аминокислотную последовательность каждой эндопептидазы введён аффинный домен 6His-tag. Ферменты IdeS и IdeZ выделены и очищены металл-аффинной хроматографией. Полученные IdeS и IdeZ гомогенны при электрофорезе в полиакриламидном геле и активны в отношении IgG человека и различных видов животных. Специфичность расщепления IgG человека эндопептидазами IdeS и IdeZ подтверждена методом электрофореза в полиакриламидном геле. Продемонстрировано применение рекомбинантной IdeZ для иммунологического анализа мыта лошадей (диагностики и определения титра специфических антител в крови). Таким образом, кроме применения в медицине и биотехнологии, IdeZ может применяться в ветеринарии и санитарной микробиологии для диагностики инфекций, вызываемых *Streptococcus equi* и *S. zooepidemicus*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: рекомбинантные эндопептидазы, IdeS, IdeZ, расщепление IgG, мыт лошадей, иммуноферментный анализ.

DOI: 10.31857/S0320972523060027, EDN: EDQMNВ

ВВЕДЕНИЕ

Наблюдаемое ныне широкое распространение устойчивых к антибиотикам бактериальных патогенов, вызванное зачастую неоправданным и неправильным применением антибиотиков в медицине и ветеринарии, а также в производстве продуктов питания, лишает нас возможности вести эффективную борьбу с патогенами. Обычные инфекции теперь всё чаще приводят к летальному исходу из-за неэффективности антибиотиков вследствие резистентности к ним микроорганизмов. Лучшее понимание механизмов взаимодействия между бактериальными патогенами и организмами-хозяевами на молекулярном уровне необходимо для разработки альтернативных стратегий лечения и профилактики бактериальных инфекций. Этими стратегия-

ми будущего могут стать разработки новых защитных вакцин, усилителей иммунитета организма-хозяина, а также поиск блокаторов факторов вирулентности. Поэтому иммунные реакции организма-хозяина и соответствующие стратегии, возникшие для уклонения от них и «используемые» микроорганизмами для избегания обнаружения и элиминации, представляют собой важную и интересную область исследований.

Один из ярких примеров – секреция патогенными стрептококками ряда протеолитических ферментов, действие которых нарушает нормальное функционирование IgG. Так, патоген человека *Streptococcus pyogenes* секретирует ферменты EndoS, SpeB и IdeS. EndoS гидролизует консервативный N-концевой гликан тяжёлых цепей IgG человека [1], что снижает их сродство к большинству рецепторов IgG-Fc [2]. SpeB – неспецифическая протеаза, расщепляющая в числе других субстратов

* Адресат для корреспонденции.

также и IgG [3]. Кроме того, *S. pyogenes* секретирует эндопептидазу IdeS, которая с высокой специфичностью расщепляет все 4 подкласса IgG человека в нижней части шарнирной области тяжёлой цепи с образованием F(ab)₂-фрагмента, полностью сохраняющего антигенсвязывающую активность, и димерного Fc-фрагмента [4, 5]. Как следствие, антитела IgG, расщепленные IdeS, оказываются лишёнными способности связываться с рецептором IgG-Fc и активировать систему комплемента.

Среди всех перечисленных факторов вирулентности *S. pyogenes* наиболее изучена IdeS, поскольку она является важнейшим антифагоцитарным фактором [5, 6]. Изучен механизм расщепления этой эндопептидазой молекул IgG [7]. Расщепление происходит в два этапа [8, 9]. Первый этап, значительно превосходящий по скорости последующую стадию, приводит к эффективному расщеплению одной из двух тяжёлых цепей с образованием иммуноглобулиновой молекулы (scIgG), сохраняющей целой одну из тяжёлых цепей. Такого расщепления уже оказывается достаточно для того, чтобы иммуноглобулин утратил свои функции [9]. Молекула scIgG менее чувствительна к расщеплению IdeS, чем молекула IgG с двумя целыми тяжёлыми цепями, и расщепление молекулы scIgG происходит в 100 раз медленнее, чем IgG, с образованием одного фрагмента F(ab')₂ и одного фрагмента Fc [9].

Примечательно, что IdeS уже нашла применение в качестве биофармацевтического средства. Биомедицинское применение эндопептидазы IdeS основано на высокоспецифичном расщеплении IgG при прямом введении IdeS пациентам в кровь [4]. Например, её применяют для расщепления IgG при аутоиммунных состояниях человека [10]. Также IdeS проходит клинические испытания в области нефрологии в качестве препарата, предотвращающего гуморальную реакцию отторжения у больных после трансплантации почки [11, 12]. Такой терапевтический подход уже нашёл применение при гломерулонефрите [13] и других заболеваниях почек [11]. В 2021 г. начата вторая фаза клинических испытаний IdeS при трансплантации почки у пациентов 18–70 лет [14], это международное исследование проводится США, Швецией и Францией.

В отличие от *S. pyogenes*, патогенного стрептококка группы А, атакующего исключительно человека, патогенные стрептококки группы С поражают животных и иногда — человека. Первый из двух рассматриваемых в нашей работе стрептококков группы С —

патогенов животных — *Streptococcus equi* — характеризуется узким спектром хозяев (поражает непарнокопытных), а второй — *Streptococcus zooepidemicus* — встречается у многих животных, включая непарнокопытных, а также у человека. Идентичность последовательностей ДНК штаммов *S. equi*, *S. zooepidemicus* и *S. pyogenes* составляет около 80% [15].

Актуальность изучения *S. equi* и *S. zooepidemicus* обусловлена не только тем, что оба эти вида вызывают «мыт» лошадей — остро протекающее, часто с тяжёлым течением и гибелью, быстро распространяющееся заболевание, поражающее иногда более 80% молодняка — жеребят и молодых лошадей. Важно, что *S. zooepidemicus*, ранее считавшийся оппортунистическим комменсалом, оказался способным вызывать острое инфекционное заболевание не только у лошадей, но также и у других млекопитающих, включая людей [16].

У *S. equi* и *S. zooepidemicus* были идентифицированы и охарактеризованы эндопептидазы IdeZ и IdeE — гомологи IdeS *S. pyogenes* [17]. Оба эти фермента (IdeZ и IdeE) тоже эффективно расщепляют иммуноглобулины класса IgG (включая IgG человека), содержащие субстратный участок LLGPP, что свидетельствует о сходстве субстратной специфичности с IdeS. IdeE является гомологом IdeZ (сходство достигает 86%) и EndoS *S. pyogenes* (70% сходства). Кроме того, у *S. equi* обнаружен ген ideE2, кодирующий дополнительную внеклеточную эндопептидазу IdeE2, сходную по последовательности с IdeE и IdeZ и также расщепляющую IgG. Более того, у *S. zooepidemicus* найден гомологичный белок IdeZ2.

По механизму действия IdeS, IdeZ и IdeE относятся к цистеиновым протеиназам [4]. Среди других прокариотических цистеиновых протеиназ IdeS уникальна тем, что, во-первых, она секретируется в зрелой активной форме и не подвергается процессингу, во-вторых, она обладает высокой специфичностью к своему субстрату IgG и расщепляет его в единственном месте — шарнирной области после остатка глицина-236 обеих тяжёлых цепей, в-третьих, её активность не ингибируется типичным ингибитором цистеиновых протеиназ E-64 [5]. Обе эндопептидазы — IdeS и IdeZ — расщепляют IgG человека [16].

Цели настоящей работы — получение рекомбинантных IdeS и IdeZ и оценка их ферментативной активности в отношении IgG человека; выявление и определение титров антител к IdeZ в крови лошадей, переболевших и не болевших мытом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все манипуляции генной инженерии (выделение гена, кодирующего IdeS, из штамма *S. pyogenes* Dochez NY 5 (тип 10), синтез гена, кодирующего IdeZ, из *S. equi* subsp. *zooepidemicus* [17], получение генетических конструкций) проводили по стандартным протоколам, описанным ранее [18].

Экспрессия генов и выращивание микроорганизма-продуцента. Клонирование, выращивание и отбор трансгенных *E. coli* клонов-продуцентов рекомбинантных белков проводили так же, как описано ранее [18].

На рис. 1, а Приложения представлена электрофоретическая картина экстрактов белков клеток-продуцентов IdeS и IdeZ до и после индукции изопропилтиогалактозидом.

Экстракт клеток, образцы которых нагружали на дорожки 1 или 2, готовили следующим образом: суспензию клеток в среде культивирования (1,5 мл) осаждали центрифугированием (при 5000 g), полученный осадок клеток суспендировали в 100 мкл раствора 8 М мочевины в воде, добавляли к нему (1 : 1 по объёму) 2-кратный буферный раствор Лэммли с дитиотреитолом (ДТТ) для нанесения образцов на гель, на каждую дорожку полиакриламидного геля (ПААГ) наносили 8 мкл полученного образца.

Разрушение биомассы трансгенных микроорганизмов-продуцентов, выделение и очистка рекомбинантных белков из клеток продуцентов. Ферменты IdeS и IdeZ выделяли однотипно. Биомассу бактериальных клеток, осаждённых центрифугированием из культуральной среды, хранили при -20°C . Разрушение биомассы проводили в «лизирующем буферном растворе»: 0,5 М NaCl, 1% (w/v) Triton X-100, 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM MgCl_2 , 10 Ед./мл раствора нуклеазы-бензоназы (выделена и очищена в лаборатории Биологически активных наноструктур НИЦ ЭМ им. Гамалеи) и 100 мкг/мл лизоцима («Panreac-Appli-Chem», Германия). Соотношение клеточной биомассы (мг) и «лизирующего буферного раствора» (мл) составляло 1 : 10. Лизис клеток проводили 25 мин при комнатной температуре на шейкере. Обработку ультразвуком суспензии лизированных клеток проводили в течение 5 мин при амплитуде 60% (по 2 с, с 2-секундными интервалами) на льду, используя установку Bandelin Sonopuls (HD2070) с микронасадкой («Bandelin», Германия). Центрифугировали суспензию при 22 000 g 15 мин при 4°C , пробы белка из полученных после центрифугирования «осадка» и «супернатанта»

отбирали и проводили электрофорез в 15%-ном ПААГ для того, чтобы определить, в какой из этих фракций содержится целевой белок.

Колоночную аффинную хроматографию проводили на сорбенте WorkBeads 40 Ni («Bio-Works», Швеция), объём сорбента в колонке — 2 мл суспензии, перед проведением хроматографии белка колонка была уравновешена 15 mM раствором имидазол-HCl (pH 8,0). Перед нанесением на колонку раствор белка разбавляли, добавляя к нему имидазол-HCl (pH 8,0) до конечной концентрации имидазола — 15 mM. Градиент концентрации имидазола в элюирующем буферном растворе был от 15 mM до 1 М, также в элюирующий раствор был добавлен 0,5 М NaCl. Хроматографию проводили, используя BioLogic LP («Bio-Rad», США).

Оценку наличия ферментативной активности — способности IdeS и IdeZ расщеплять IgG человека — проводили с купленным в аптеке фармпрепаратом «Иммуноглобулин человека нормальный, раствор для внутримышечного введения, 100 мг/мл» («Микроген», Россия).

Иммунологические тесты. Образцы крови лошадей, переболевших и не болевших мытом (со слов владельцев и ветеринаров, ставивших диагноз), были любезно предоставлены владельцами лошадей нескольких частных конюшен Подмосковья. Всего было собрано 18 образцов крови лошадей в возрасте от 1 года до 25 лет. Кровь (объёмом 5 мл) собирали летом 2022 г. в дневное время после утренних прогулок лошадей (в одно и то же время суток — как от переболевших, так и от не болевших мытом) в вакутейнеры без добавок, отделяли сыворотки после формирования тромба-сгустка при температуре окружающей среды (30°C), полученные сыворотки замораживали при -20°C и хранили до анализа, размораживая непосредственно перед постановкой экспериментов. Для дальнейшего хранения при 4°C и проведения повторных анализов в размороженные сыворотки добавляли азид натрия (до конечной концентрации 0,04%).

Иммуноблоттинг проводили в стандартных условиях, нагружая 2 мкг белка IdeZ на каждую дорожку при электрофорезе, перед проведением которого проводилась обработка IdeZ прогреванием при 95°C в течение 5 мин в 2-кратном «буферном растворе для образцов» по Лэммли с восстановителем ДТТ. После процедуры электроблоттинга белка IdeZ на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C Extra («Amersham», Швеция) её окрашивали для контроля качества и равномерности переноса

раствором Красного Понсо, блокировали раствором 0,5 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (Bovine Serum Albumin Fraction V, «Panreac-AppliChem») в 20 mM Tris-HCl, (pH 7,5), содержащем 0,025% (v/v) Tween-20 и 0,15 M NaCl, в течение ночи. После этого мембрану разрезали на полоски (в направлении вдоль дорожек геля), и каждую полоску обрабатывали отдельно сыворотками от разных лошадей (все в одинаковом разведении 1 : 100 в том же буфере) при комнатной температуре (25 °C) в течение 1 ч. Затем полоски промывали и обрабатывали вторичными антителами кролика к IgG лошади (разведение 1 : 1000), конъюгированными с пероксидазой хрена («ИМТЕК», Россия) в течение 1 ч, после чего проводили пероксидазную реакцию с субстратами — диаминобензидином и перекисью водорода.

При постановке твёрдофазного иммуноферментного анализа (ИФА) использовали иммунологические планшеты («Costar», США). Все операции проводили в стандартных условиях постановки ИФА, кроме одной дополнительной — предварительной термоинактивации IdeZ. Для этого перед сорбцией на иммунологический планшет раствор IdeZ прогревали 15 мин при 60 °C. Сорбцию IdeZ из раствора в концентрации 5 или 10 мкг/мл в 0,1 M карбонат-бикарбонатном буфере (pH 9,5) на иммунологический планшет проводили в течение ночи при 4 °C (или 1 ч при комнатной температуре).

Места неспецифической сорбции блокировали раствором (1 мг/мл) бычьего сывороточного альбумина (Albumin bovine RIA grade, «Sigma», США) в 10 mM K/Na-фосфатно-солевого буферного раствора, содержащего 0,137 M NaCl и 0,027 M KCl, (pH 7,5), с добавлением 0,1% (v/v) Tween-20. В том же растворе готовили разведения лошадиных сывороток, начиная от 1 : 250 или 1 : 500, исходя из различий в интенсивности окраски зоны при иммуноблоттинге, с шагом 1/2 — 1 : 500, 1 : 1000, 1 : 2000, 1 : 4000, 1 : 8000, 1 : 16 000, 1 : 32 000. В качестве вторичных антител использовали те же антитела кролика к IgG лошади, конъюгированные с пероксидазой хрена, что и в случае иммуноблоттинга, в разведении 1 : 5000. Для построения кривых титрования использовали онлайн-программу Arigo (<https://www.arigobio.com/elisa-analysis>), с её же помощью находили характеристики кривых титрования, т.е. титры сывороток.

При исследовании кинетики гидролиза IgG человека эндопептидазой IdeZ реакционную смесь инкубировали при 37 °C в течение

максимального времени (120 мин), отбирая пробы через определённые промежутки времени. Отобранные пробы смешивали с холодным буфером для образцов по Лэммли без восстанавливающих агентов и немедленно помещали на лед для остановки реакции. Перед проведением электрофореза (нанесением проб в карманы геля) их прогревали 5 мин при 95 °C. Изображения ПААГ, окрашенных Кумасси R250, обрабатывали в программе GelAnalyzer 19.1. Плотность (интенсивность в пикселях), соответствующую каждой белковой зоне, делили на плотность (интенсивность) зоны, соответствующей IdeZ, присутствующей во всех образцах в одинаковом количестве в качестве стандарта.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Конструкция плазмиды, кодирующей эндопептидазу IdeS. Получена плазида, содержащая нуклеотидную последовательность гена, кодирующего белок IdeS *S. pyogenes* с 6His в N-концевой области. Аминокислотная последовательность кодируемого плазмидой белка IdeS с 6His-tag на N-конце (5–10 а.о.) приведена в табл. 1.

Расчётная молекулярная масса рекомбинантного белка составляет 37,01 кДа, расчётный коэффициент молярной экстинкции ϵ_{molar} ($\text{M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) равен 52 370, предсказанное поглощение при 280 нм раствора с концентрацией 1 мг/мл равно 1,42. На основе этого коэффициента проводили оценку концентрации очищенного белка в растворе.

Конструкция плазмиды, кодирующей эндопептидазу IdeZ. Получена плазида, содержащая нуклеотидную последовательность гена, кодирующего белок IdeZ *S. equi* subsp. *zooepidemicus* с 6His в N-концевой области. Плазида кодирует белок с аминокислотной последовательностью, приведённой в табл. 1: 6His-tag (5–10 а.о.) и IdeZ (13–327 а.о.).

Расчётная молекулярная масса белка 6His-IdeZ составляет 36,87 кДа, расчётный коэффициент экстинкции ϵ_{molar} ($\text{M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) равен 52 370, предсказанное поглощение раствора с концентрацией 1 мг/мл составляет 1,42. На основе этого коэффициента проводили оценку концентрации очищенного белка в растворе.

Сравнение онлайн-программами BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins&PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=blast2seq) и Needle (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/) аминокис-

Таблица 1. Последовательности рекомбинантных белков IdeS и IdeZ

Белок	Аминокислотные последовательности 5'—3'
IdeS	MRGSHHHHHHSGSDSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPPAKFTQGEDVFHAPYVANQGWDITK TFNGKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKEKIEAYLKKHPDKQKIMFGDQELLDRVKVINTKGDQTN SELFNYFRDKAFPGLSARRIGVMPDLVLDMFINGYYLNVYKTQTDDVNRITYQEKDRRGGIFDAVFTRG DQSKLLTSRHDFFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDNSGNLKAIVT DSDSNASIGMKKYFVGVSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTNKIL
IdeZ	MRGSHHHHHHSGSDDYQRNAAEVYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVIHAPYLAHQGWY DITKVFDDGKDNLLCGAATAGNMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFFNNQELFDLKAADTKDSQ TNSQLFNYFRDKAFPNLSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRGGIFDAVF TRGDQTTLLTARHDLKKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINLWGADFNAEGNLEAIY VTDSANASIGMKKYFVGINAGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGKDIWQKLS

лотных последовательностей рекомбинантных IdeS и IdeZ показало, что степень идентичности составляет 74% (BLAST) и 72,4% (Needle), а степень сходства (гомология) составляет 86% (BLAST) и 85,8% (Needle).

Выделение и очистку рекомбинантных белков IdeS и IdeZ проводили в одинаковых условиях, при этом в случае IdeS брали 900 мг биомассы продуцента IdeS, а в случае IdeZ брали 525 мг биомассы продуцента IdeZ.

В случае IdeS биомассы брали исходно больше, чем в случае IdeZ, поскольку после разделения суспензии разрушенных клеток центрифугированием на «супернатант» и «осадок» в «супернатанте», который использовали далее для очистки целевых белков (IdeS и IdeZ), оказалась меньшая доля целевого белка (IdeS), чем в случае IdeZ, где целевой белок распределился поровну между «осадком» и «супернатантом» (данные электрофоретических исследований не приведены).

Биомассу в обоих случаях разрушали в 5 мл «лизирующего буфера» (состав см. в разделе «Материалы и методы»).

Поскольку генетические конструкции IdeS и IdeZ были спланированы так, что рекомбинантные белки содержали 6His-tag, их аффинная хроматография на Ni-сорбенте позволила практически за один этап получить гомогенные препараты белков. Хроматографический профиль в случае очистки IdeZ колоночной хроматографией, которая проводилась со скоростью потока 0,4 мл/мин, приведён на рис. 2 Приложения.

В случае очистки IdeS была получена аналогичная картина хроматографической элюции (не приведена).

На рис. 1, б Приложения показана картина электрофоретического разделения в ПААГ исходного «супернатанта» и фракций белка IdeZ, не связавшегося с сорбентом, а также элюатов с колонки WorkBeads 40Ni.

Полученные образцы IdeS и IdeZ диализовали против 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5).

Концентрации очищенных IdeS и IdeZ определяли спектрофотометрически по светопоглощению при 280 нм с учётом расчётных коэффициентов экстинкции, приведённых выше. Выход очищенного белка составил 7,95 мг — для IdeS из 900 мг биомассы продуцента и 10,6 мг — для IdeZ из 525 мг биомассы продуцента.

Активность IdeS и IdeZ в отношении IgG человека (см. «Материалы и методы») исследовали в одинаковых условиях. В случае IdeS готовили инкубационные смеси в трёх разных соотношениях фермента и субстрата, для чего к 20 мкл IgG (1 мг/мл) добавляли 20 мкл IdeS в различных концентрациях: 0,085 мг/мл (смесь 1), 0,17 мг/мл (смесь 2), 0,85 мг/мл (смесь 3). Инкубация продолжалась 1 ч при 37 °С. Останавливали реакцию добавлением равного объёма 2-кратного буферного раствора для образцов по Лэммли с восстанавливающим агентом ДТТ и инкубацией в течение 4 мин при 95 °С.

На рис. 3, а Приложения приведена картина электрофореза продуктов реакции смесей 1—3. Видно, что в случаях реакционных смесей (1) и (2) произошёл частичный гидролиз IgG, а в случае смеси (3), в которой соотношение концентраций субстрата IgG человека и фермента IdeS составило $\approx 1,17 : 1$, реакция протеолиза в данных условиях инкубации прошла практически полностью.

В случае IdeZ готовили инкубационные смеси в четырёх разных соотношениях фермента и субстрата, для чего к 50 мкл IgG (1 мкг/мкл) добавляли 20 мкл IdeZ в различных концентрациях: 0,55 мкг/мкл (смесь 1), 0,055 мкг/мкл (смесь 2), 0,011 мкг/мкл (смесь 3) и 0,006 мкг/мкл (смесь 4).

Инкубацию смесей проводили в течение 1 ч при 37 °С. Останавливали реакцию добав-

лением равного объёма 2-кратного буферного раствора для образцов по Лэммли с восстанавливающим агентом ДТТ и нагревом 4 мин при 95 °С. Картина электрофореза белковых продуктов реакции приведена на рис. 3, б Приложения. Видно, что в смесях (2)–(4) произошёл частичный гидролиз IgG, и только при наиболее высокой концентрации IdeZ – в случае смеси (1), в которой соотношение концентраций субстрата IgG и фермента IdeZ составило 4,5 : 1, в данных условиях инкубации гидролиз IgG произошёл практически полностью.

Исследована кинетика гидролиза IgG человека эндопептидазой IdeZ в растворе. Концентрации IgG и IdeZ в реакционной среде составили 0,87 мг/мл и 0,26 мг/мл соответственно.

На рис. 4 Приложения приведено фото электрофоретического разделения в 10%-ном ПААГ, в карманы геля наносили пробы, отобранные из реакционной смеси IgG и IdeZ, инкубированной в течение 0, 0,5, 1, 2, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 и 120 мин при температуре 37 °С. Все пробы обрабатывали буферным раствором для образцов без восстанавливающего агента. На дорожке 1 – IgG без IdeZ (контроль).

Как показано на рис. 4 Приложения, в первые 5–10 мин нарастание образования продукта (интенсивность нижней зоны) и исчезновение самой верхней зоны (нерасщеплённые молекулы IgG) происходят с большой скоростью, тогда как окончательное расщепление тяжёлых цепей молекул scIgG (вторая сверху зона) происходит лишь за последующие 1–2 ч.

Параллельно из той же реакционной смеси отбирали пробы и смешивали их с буферным раствором для образцов с восстановителем ДТТ, подвергали электрофорезу в 10%-ном ПААГ, количественно обрабатывали изображение, и при этом кинетика убыли тяжёлых цепей во времени была такого же характера, как представлено на рис. 4 Приложения с пробами, обработанными без ДТТ, и после 1 ч инкубации тяжёлые цепи в геле практически не обнаруживались (данные не приведены).

Выделенные и очищенные IdeZ и IdeS хранили в 50%-ном растворе глицерина в 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) при –20 °С. За 3 месяца хранения снижение активности составило не более 5%.

Иммуноблоттинг с рекомбинантной IdeZ и сыворотками крови лошадей. Иммуноблоттинг с очищенным белком IdeZ в качестве антигена был проведён с целью дальнейшего подбора условий твёрдофазного ИФА. Оба анализа (иммуноблоттинг и ИФА) служили

целям обнаружения специфичных к IdeZ антител в крови лошадей и определения титров антител.

Иммуноблоттинг позволил, во-первых, убедиться в том, что антитела присутствуют в крови обследованных лошадей и качественно сравнить их титры в сыворотках. При одинаковом разведении сывороток (1 : 100) во всех 18 случаях наблюдалось окрашивание зоны IdeZ, но интенсивность окрашивания белковых зон качественно различалась, следовательно, титры сывороток были различными. Во-вторых, иммуноблоттинг позволил убедиться в том, что при обработке IdeZ нагреванием в течение 4 мин при 95 °С в буферном растворе для образцов по Лэммли при электрофорезе в ПААГ ферментативная активность IdeZ полностью подавляется, но такая обработка не мешает взаимодействию антигена (IdeZ) с антителами в сыворотке крови лошадей и проведению иммуноблоттинга в стандартных условиях с первичными и вторичными антителами (иммуноглобулинами класса IgG, которые расщепляются активной IdeZ). Пример окрашивания (фотография полосок нитроцеллюлозной мембраны) после иммуноблоттинга приведён на рис. 5, а Приложения.

Разработка твёрдофазного ИФА с использованием рекомбинантной IdeZ. В разработке твёрдофазного ИФА с целью определения наличия антител к IdeZ в лошадиных сыворотках существенный момент и узкое место – это наличие деградирующей IgG ферментативной активности IdeZ. Проведение ИФА с не инактивированной заранее IdeZ оказалось невозможным из-за расщепления ею иммуноглобулинов, использованных для анализа (данные не приведены). Поскольку было установлено, что при иммуноблоттинге IdeZ сохраняет антигенные свойства, будучи термически обработанной 4 мин при 95 °С в буферном растворе для образцов по Лэммли, для твёрдофазного ИФА тоже была проведена термоинактивация IdeZ. В данном случае обработка 15 мин при 60 °С раствора IdeZ в 0,1 М карбонат-бикарбонатном буфере (pH 9,5) оказалась достаточной для полной потери активности IdeZ с сохранением её антигенных свойств, и при этом белок IdeZ оставался в растворённом состоянии в этом буфере.

Пример кривой титрования для образца сыворотки № 3 приведён на рис. 5, б Приложения. Кривая построена программой Arigo онлайн, в которой также определены параметры кривой: $R^2 = 1,0$; $a = 1,593301$; $b = 1,105941$; $c = 2599,286145$; $d = 0,066838$.

Таблица 2. Титры антител к IdeZ в сыворотках лошадей, переболевших и не болевших мытом

Шифр животного	Информация о животных		Титр (разведение сыворотки)
	болели	не болели	
№ 2	♂ 15 лет		1523
№ 3	♂ (Мерин), 16 лет		2599
№ 4	♀ 22 года		659
№ 5	♂ 10 лет		1270
№ 6	♂ (Мерин), 12 лет		1148
№ 7	♂ (Мерин), 7 лет		966
№ 8	♀, 13 лет		526
№ 9	♀, 10 лет		2253
№ 10	♂, 2 года, повышалась температура		8026
№ 11	♂ (Мерин), 4 года, повышалась температура		1114
№ 12	♀, 24 года		447
№ 13		♂, 8 лет	1852
№ 1A		♀, 2 года	634
№ 2A		♂ (Мерин), 12 лет	438
№ 3A		♀, 5 лет	536
№ 4A		♀, 1 год	1025
№ 5A		♀, 20 лет	803
№ 1		♂ (Мерин), 25 лет	10

Кривые титрования сывороток описываются формулой (1):

$$y = d + \frac{a - d}{1 + (x \div c)^b}, \quad (1)$$

где x — концентрация сыворотки; y — ответ (оптическая плотность); a — теоретический ответ при нулевой концентрации; b — коэффициент наклона; c — точка перегиба (EC_{50}); d — теоретический ответ при бесконечно большой концентрации.

Результаты определения титров антител к IdeZ в сыворотках лошадей, переболевших и не болевших мытом, приведены в табл. 2.

Как видно по результатам, приведённым в табл. 2, титры сывороток практически всех лошадей, как болевших, так и не перенёсших зарегистрированного ветеринарами заболе-

вания, находились в диапазоне определения системы ИФА. У переболевших животных титры были выше, чем у не болевших, при этом у переболевших молодых лошадей титры оказались выше, чем у лошадей старше 20 лет.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные в нашей работе рекомбинантные IdeS и IdeZ по свойствам и активности сходны с описанными в литературе [9]. Кинетика расщепления IgG была описана ранее только для IdeS [9], а в нашей работе описана кинетика расщепления IgG человека ферментом IdeZ. Кинетика оказалась сходной: расщепление первой тяжёлой цепи в молекуле IgG происходит быстро, в течение первых

минут инкубации, тогда как для полного расщепления второй цепи требовалось 1–2 ч.

Если рассматривать биотехнологическое применение IdeS и IdeZ, то можно отметить, что, по данным литературы, использование гидролиза IdeS упрощает процедуру расщепления аминокислотной последовательности моноклональных антител [19]. Кроме того, из данных литературы известно, что расщепление IdeZ иммуноглобулинов также было успешно применено для облегчения идентификации белков с такой посттрансляционной модификацией, как O-GlcNAc [20]. Действительно, идентификация белков, имеющих молекулярные массы в области 50 кДа и предварительно выделенных иммунопреципитацией с антителами, затруднена из-за близости их молекулярной массы к массе полноразмерной тяжёлой цепи иммуноглобулинов. Особенно затруднён масс-спектрометрический анализ гликозилированных O-GlcNAc-белков, причём даже после электрофоретического разделения и вырезания белковых зон из геля анализ сложен, поскольку иммуноглобулиновые молекулы тоже гликозилированы, а области молекулярных масс (50 кДа) перекрываются с тяжёлыми цепями иммуноглобулинов. Благодаря «укорачиванию» IdeZ тяжёлых цепей иммуноглобулинов наложение и перекрытие с ними анализируемых белков в области молекулярной массы 50 кДа исключается.

Другой важнейшей областью применения протеолитических ферментов IdeS и IdeZ, расщепляющих иммуноглобулины человека с высокой специфичностью, является медицина [10]. Недавно было предложено применить IdeS (препарат «imlifidase») в лечении угрожающих жизни гепарин-индуцированной тромбоцитопении (Heparin-induced thrombocytopenia, HIT) и сходных по механизму развития поствакцинальных осложнений после вакцинации от SARS-CoV-2: тромбоза и тромбоцитопении, связанных с наличием в крови пациентов антител к тромбоцитарному фактору 4 (PF-4) [21–23].

Однако при внутривенном введении IdeS в кровь в качестве терапевтического агента для удаления иммуноглобулинов [24] возникает проблема наличия изначально циркулирующего пула антител к IdeS у тех пациентов, которые ранее встречались со стрептококковой инфекцией [25]. Действительно, известно, что большая доля взрослых людей в популяции обладает сформировавшимся пулом антител IgG к IdeS вследствие ранее перенесённой инфекции *S. pyogenes* [26]. При введении в кровь IdeS с терапевтической целью эти циркулирующие

анти-IdeS антитела могут увеличивать риск реакций, подобных гиперчувствительности. Фирма «Thermo Fisher Scientific» («Phadia», Швеция) разработала специфическую тест-систему *in vitro* (IdeS-ImmunoCAP) для количественного определения анти-IdeS антител, причём нижний порог чувствительности системы в 7 раз ниже минимального уровня измеряемых в крови людей антител (2 мг/литр). Лица с уровнем антител >15 мг/литр, по данным этой тест-системы, из клинических испытаний исключались.

Логично было бы попытаться разработать системы экстракорпоральной гемокоррекции – расщепления IgG крови вне тела больного – ферментами IdeS или IdeZ, иммобилизованными на сорбентах. Данные нашей работы свидетельствуют о том, что расщепление иммуноглобулинов происходит и в случае «иммобилизованной» IdeZ, т.е. связанной на поверхности лунки иммунологического планшета. Сохранность ферментативной активности в этом случае создала трудности в разработке ИФА, которые удалось преодолеть посредством термоинактивации IdeZ. Мы также наблюдали проявление IgG-расщепляющей активности IdeZ, связанной с Workbeads 40Ni за 6His-tag (данные не приведены). Всё это указывает на возможность применения сорбированных на носителе эндопептидаз IdeS или IdeZ для экстракорпоральной обработки крови с целью частичного расщепления IgG. Применить сорбированную IdeS можно было бы и для элиминации циркулирующих анти-IdeS антител.

Продемонстрированная в нашей работе возможность получения больших количеств рекомбинантных активных IdeS и IdeZ в системе гетерологичной экспрессии в *E. coli* в будущем, возможно, позволит иммобилизовать эти ферменты и создать как аффинный сорбент для проведения гемосорбции и удаления циркулирующих анти-IdeS антител из крови пациентов, так и обеспечить экстракорпоральное расщепление IgG.

Другим подходом в преодолении проблем, возникающих при введении в кровь пациентов IdeS, может быть использование вместо неё IdeZ. Действительно, уже начала реализовываться идея использования IdeZ на пути развития такого направления в медицине, как применение векторов рекомбинантных аденоассоциированных вирусов (AAV) для генной терапии редких заболеваний. Так, в моделях на мышах и нечеловекообразных приматах (макаках), пассивно иммунизированных человеческой антисывороткой, уже

оценён потенциал IdeZ для элиминирования ранее выработанных и циркулирующих нейтрализующих антител (Nab) против рекомбинантных AAV [27]. Продемонстрирована способность рекомбинантной GST-IdeZ и коммерческой IdeZ («New England Biolabs», США) расщеплять человеческие иммуноглобулины, циркулирующие в крови различных лабораторных животных, в том числе при введении им AAV в печень и сердце, и тем самым смягчать побочное действие генной терапии [27].

Также представляется обширным потенциал применения IdeZ в ветеринарии и санитарной микробиологии. В нашей работе с помощью рекомбинантной IdeZ впервые проведён Вестерн-блоттинг и ИФА-анализ антител к IdeZ в крови лошадей. Обнаружено наличие высоких титров антител к IdeZ у лошадей как переболевших мытом с явными симптомами, так и не болевших, но встречавшихся с инфекцией и/или перенёсших заболевание в лёгкой форме, не зарегистрированной ветеринарами как острое заболевание. Поскольку известно, что IdeZ синтезируют оба стрептококка — *S. equi* и *S. zooepidemicus*, полученные нами данные свидетельствует о том, что заболевание обследованных лошадей могло быть вызвано не только *S. equi*, но и *S. zooepidemicus*. Этот факт настораживает, если учесть высокую активность IdeZ с IgG человека и широкий спектр хозяев *S. zooepidemicus*, и указывает на необходимость подключения генетических тестов (ПЦР-анализов) для дифференциальной диагностики этих стрептококков в случае вспышек заболевания среди лошадей и других животных. Действительно, спектр организмов-хозяев у *S. zooepidemicus* значительно шире, чем у *S. equi* — специфического возбудителя мыта лошадей, и включает человека [28–30], хотя в конюшнях, где были собраны образцы крови для нашего исследования, не было отмечено случаев заражения и заболевания среди людей. Поскольку описаны случаи передачи патогенного *S. zooepidemicus* людям [31, 32], было бы интересно в будущем проверить наличие антител к IdeZ в сыворотке крови людей, контактировавших с заражёнными животными. Разработанная в нашем исследовании тест-система твёрдофазного ИФА может пригодиться в будущем для отслеживания эпизоотий, вызванных вирулентными штаммами *S. equi* или *S. zooepidemicus*.

Следует, видимо, также повысить внимание к *S. zooepidemicus*. Благодаря молекулярно-генетическим исследованиям пересмотрена классификация этого стрептококка: ранее он считался подвидом *S. equi*, но теперь выде-

лен в самостоятельный вид *S. zooepidemicus*, являющийся эволюционным предшественником *S. equi* [33]. Несмотря на пересмотр классификации, во многих современных публикациях встречается старая классификация *S. zooepidemicus* как подвида — *S. equi* ssp. *zooepidemicus*. По данным молекулярно-генетических исследований [33], *S. equi* является биоваром *S. zooepidemicus*, причём ограничение только непарнокопытными спектра хозяев *S. equi* возникло вследствие полной утраты *S. equi* локусов CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)—Cas (CRISPR-associated), наделяющих микроорганизмы «адаптивной иммунной системой», или способностью сохранять устойчивость генома при заселении широкого спектра хозяев. По микробиологической классификации, оба вида (*S. zooepidemicus* и *S. equi*) относятся к группе С по Лэнсфилд (Lancefield). К настоящему времени стало широко известно и общепризнано, что *S. zooepidemicus* является не только комменсалом, но и способен давать патогенные штаммы [33, 34], вызывающие, кроме заболеваний лошадей [35], также вспышки геморрагической пневмонии собак в питомниках [36] и мастита жвачных — на фермах [37]. Источником эпидемической вспышки могут быть бессимптомные носители, включая животных, но известны также случаи заражения и заболевания людей [28–32, 38]. Описан случай массового заражения людей, носивший характер эпидемии. Так, эпидемиологические исследования, проведённые в Бразилии в начале этого века, выявили многочисленные случаи фарингита и гломерулонефрита, вызванные заражением *S. zooepidemicus* при употреблении сыра, приготовленного из сырого молока от болеющих маститом коров [39], что привело к госпитализации около сотни человек и гибели троих из них.

Что касается исследований распространённости микроорганизмов *S. equi* и *S. zooepidemicus* в популяции лошадей, то опубликована американская [35] и индийская [40] работы. Американские исследователи применяли иммунохимические подходы, а индийские исследователи использовали метод ПЦР с праймерами генов *SeM* и *SodA* для идентификации *S. equi* ssp. *equi* и *S. equi* ssp. *zooepidemicus* соответственно (индийскими исследователями дана старая классификация этих стрептококков, как подвидов). Большинство изолятов стрептококков, выделенных в Индии от сотни больных мытом и здоровых лошадей, классифицировано как *S. equi* ssp. *zooepidemicus*, наряду с которым встречался

также и *S. equi* ssp. *equi*. Таким образом, хотя и не был оценён уровень антител к антигенам стрептококков (в том числе к IdeZ) в сыворотках обследованных лошадей, индийскими учёными была зарегистрирована высокая частота встречаемости у лошадей стрептококков, теоретически способных продуцировать IdeZ.

Результаты нашей работы не противоречат данным американских и индийских учёных: почти у всех обследованных лошадей мы обнаружили антитела к IdeZ. То, что у переболевших молодых лошадей титры оказались выше, чем у лошадей старшего возраста, может свидетельствовать о снижении иммунного ответа с возрастом животных. Так, в сыворотке одной не болевшей мытом лошади (№ 1, мерин, 25 лет) титр антител к IdeZ оказался, по сравнению с другими лошадьми, аномально низким. Это, возможно, указывает на ослабленный иммунитет старого животного, либо на отсутствие недавних контактов с патогенными стрептококками, и, вероятно, стрептококковая инфекция для этой лошади представляет потенциальную опасность. Напротив, у одного молодого жеребца (2 года) наблюдался чрезвычайно высокий титр антител, вышедший за верхний предел диапазона нашей системы ИФА и свидетельствующий о сильной иммунной реакции.

Относительно защиты от стрептококковой инфекции можно, к сожалению, констатировать, что на сегодняшний день пока не удаётся создать субъединичную вакцину, защищающую от *S. pyogenes*, относящегося к группе А, однако ведутся обнадёживающие разработки по созданию вакцин против стрептококков группы С. Известно, что животные, переболевшие инфекциями, вызванными как *S. equi*, так и *S. zooepidemicus*, повторно не заражаются и вырабатывают устойчивый иммунитет, но известно и об отсутствии перекрёстной защитной реакции. Что касается опубликованных подходов к разработке субъединичных вакцин против стрептококков группы С, то на экспериментальной мышинной модели было показано, что вакцинация с использованием IdeE или IdeE2 в качестве антигенов индуцировала защиту от экспериментальной инфекции *S. equi* ssp. *equi* [16], тогда как вакцинация рекомбинантным белком membrane attack

complex (MAC) — IdeZ — защищала от экспериментальной инфекции *S. zooepidemicus* [41]. Также описаны разработки субъединичных вакцин с протективными свойствами в отношении инфекции *S. equi* ssp. *equi* и разработанных на основе нескольких расщепляющих иммуноглобулины эндопептидаз в качестве антигенов [28]. Кажется перспективным подход к разработке универсальной субъединичной вакцины, включающей антиген IdeZ, синтезируемый обоими видами — *S. equi* и *S. zooepidemicus*. В заключение отметим важный факт: наличие высоких титров антител к IdeZ у лошадей, перенёсших стрептококковую инфекцию, служит основанием для того, чтобы предположить, что субъединичная вакцина, включающая IdeZ в качестве антигена, может оказаться эффективной и, возможно, будет защищать от заболевания как лошадей, подверженных инфекции и *S. equi*, и *S. zooepidemicus*, так и других животных, заражающихся *S. zooepidemicus*.

Вклад авторов. В.Г. Лунин — концепция и руководство работой; И.С. Бокша, М.С. Попонина, А.М. Ляшук, З.М. Галушкина, Е.В. Устенко — проведение экспериментов; Т.А. Данилова, Н.Б. Поляков — обсуждение результатов исследования; И.С. Бокша, С.В. Константинова — написание текста; Т.А. Данилова — редактирование текста статьи.

Благодарности. Авторы глубоко благодарны всем владельцам лошадей за предоставленные образцы крови животных и информацию о них.

Конфликт интересов. Авторы заявляют о том, что не имеют никаких конфликтов интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов. Образцы крови лошадей были взяты с соблюдением биоэтических норм в рамках плановой оценки состояния здоровья домашних животных и любезно предоставлены нам для исследований ветеринарными врачами.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Collin, M. (2001) EndoS, a novel secreted protein from *Streptococcus pyogenes* with endoglycosidase activity on human IgG, *EMBO J.*, **20**, 3046-3055, doi: 10.1093/emboj/20.12.3046.
2. Allhorn, M., Olin, A. I., Nimmerjahn, F., and Collin, M. (2008) Human IgG/FcγR interactions are modulated by streptococcal IgG glycan hydrolysis, *PLoS One*, **3**, e1413, doi: 10.1371/journal.pone.0001413.

3. Collin, M., Svensson, M. D., Sjöholm, A. G., Jensenius, J. C., Sjöbring, U., and Olsén, A. (2002) EndoS and SpeB from *Streptococcus pyogenes* inhibit immunoglobulin-mediated opsonophagocytosis, *Infect. Immun.*, **70**, 6646-6651, doi: 10.1128/IAI.70.12.6646-6651.2002.
4. Wenig, K., Chatwell, L., von Pawel-Rammingen, U., Björck, L., Huber, R., and Sondermann, P. (2004) Structure of the streptococcal endopeptidase IdeS, a cysteine proteinase with strict specificity for IgG, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 17371-17376, doi: 10.1073/pnas.0407965101.
5. Von Pawel-Rammingen, U., Johansson, B. P., Tapper, H., and Björck, L. (2002) *Streptococcus pyogenes* and phagocytic killing, *Nat. Med.*, **8**, 1044-1045, doi: 10.1038/nm1002-1044.
6. Von Pawel-Rammingen, U. (2012) Streptococcal IdeS and its impact on immune response and inflammation, *J. Innate Immun.*, **4**, 132-140, doi: 10.1159/000332940.
7. Spoerry, Ch. (2017) Streptococcal immunoglobulin degrading enzymes of the IdeS and IgdE family, *Umeå University*, Thesis for: PhD Advisor: von Pawel-Rammingen, Ulrich, Associate Prof., URL: https://www.researchgate.net/publication/320078854_Streptococcal_Immunoglobulin_degrading_Enzymes_of_the_IdeS_and_IgdE_Family.
8. Ryan, M. H., Petrone, D., Nemeth, J. F., Barnathan, E., Björck, L., and Jordan, R. E. (2008) Proteolysis of purified IgGs by human and bacterial enzymes *in vitro* and the detection of specific proteolytic fragments of endogenous IgG in rheumatoid synovial fluid, *Mol. Immunol.*, **45**, 1837-1846, doi: 10.1016/j.molimm.2007.10.043.
9. Vindebro, R., Spoerry, C., and von Pawel-Rammingen, U. (2013) Rapid IgG heavy chain cleavage by the streptococcal IgG endopeptidase IdeS is mediated by IdeS monomers and is not due to enzyme dimerization, *FEBS Lett.*, **587**, 1818-1822, doi: 10.1016/j.febslet.2013.04.039.
10. Collin, M., and Björck, L. (2017) Toward clinical use of the IgG specific enzymes IdeS and EndoS against antibody-mediated diseases, *Methods Mol. Biol.*, **1535**, 339-351, doi: 10.1007/978-1-4939-6673-8_23.
11. Winstedt, L., Järnum, S., Nordahl, E. A., Olsson, A., Runström, A., Bockermann, R., Karlsson, C., Malmström, J., Palmgren, G. S., Malmqvist, U., Björck, L., and Kjellman, C. (2015) Complete removal of extracellular IgG antibodies in a randomized dose-escalation phase I study with the bacterial enzyme IdeS – a novel therapeutic opportunity, *PLoS One*, **10**, e0132011, doi: 10.1371/journal.pone.0132011.
12. Jordan, S. C., Lorant, T., Choi, J., Kjellman, C., Winstedt, L., Bengtsson, M., Zhang, X., Eich, T., Toyoda, M., Eriksson, B.-M., Ge, S., Peng, A., Järnum, S., Wood, K. J., Lundgren, T., Wennberg, L., Bäckman, L., Larsson, E., Villicana, R., Kahwaji, J., Louie, S., Kang, A., Haas, M., Nast, C., Vo, A., and Tufveson, G. (2017) IgG Endopeptidase in Highly Sensitized Patients Undergoing Transplantation, *N. Engl. J. Med.*, **377**, 442-453, doi: 10.1056/NEJMoal612567.
13. Yang, R., Otten, M. A., Hellmark, T., Collin, M., Björck, L., Zhao, M.-H., Daha, M. R., and Segelmark, M. (2010) Successful treatment of experimental glomerulonephritis with IdeS and EndoS, IgG-degrading streptococcal enzymes, *Nephrol. Dial. Transplant.*, **25**, 2479-2486, doi: 10.1093/ndt/gfq115.
14. Hansa Biopharma AB. (2021) NCT number: NCT02790437. In: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02790437>.
15. Holden, M. T. G., Heather, Z., Paillot, R., Steward, K. F., Webb, K., Ainslie, F., Jourdan, T., Bason, N. C., Holroyd, N. E., Mungall, K., Quail, M. A., Sanders, M., Simmonds, M., Willey, D., Brooks, K., Aanensen, D. M., Spratt, B. G., Jolley, K. A., Maiden, M. C., Kehoe, M., Chanter, N., Bentley, S. D., Robinson, C., Maskell, D. J., Parkhill, J., and Waller, A. S. (2009) Genomic evidence for the evolution of *Streptococcus equi*: host restriction, increased virulence, and genetic exchange with human pathogens, *PLoS Pathog.*, **5**, e1000346, doi: 10.1371/journal.ppat.1000346.
16. Hulting, G., Flock, M., Frykberg, L., Lannergård, J., Flock, J.-I., and Guss, B. (2009) Two novel IgG endopeptidases of *Streptococcus equi*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **298**, 44-50, doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01698.x.
17. Lannergård, J., and Guss, B. (2006) IdeE, an IgG-endopeptidase of *Streptococcus equi* ssp. *equi*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **262**, 230-235, doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00404.x.
18. Boksha, I. S., Lavrova, N. V., Grishin, A. V., Demidenko, A. V., Lyashchuk, A. M., Galushkina, Z. M., Ovchinnikov, R. S., Umyarov, A. M., Avetisian, L. R., Chernukha, M. Iu., Shaginian, I. A., Lunin, V. G., and Karyagina, A. S. (2016) *Staphylococcus simulans* recombinant lysostaphin: production, purification, and determination of antistaphylococcal activity, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 502-510, doi: 10.1134/S0006297916050072.
19. An, Y., Zhang, Y., Mueller, H.-M., Shameem, M., and Chen, X. (2014) A new tool for monoclonal antibody analysis, *MAbs*, **6**, 879-893, doi: 10.4161/mabs.28762.
20. Machacek, M., Fields, P. E., and Slawson, C. (2020) A proteolytic method for evaluating O-GlcNAcylation on proteins of similar molecular weight to antibody heavy chain after immunoprecipitation, *Anal. Biochem.*, **611**, 114001, doi: 10.1016/j.ab.2020.114001.
21. Kizlik-Masson, C., Deveuue, Q., Zhou, Y., Vayne, C., Thibault, G., McKenzie, S. E., Pouplard, C., Loyau, S., Gruel, Y., and Rollin, J. (2019) Cleavage of anti-PF4/

- heparin IgG by a bacterial protease and potential benefit in heparin-induced thrombocytopenia, *Blood*, **133**, 2427-2435, doi: 10.1182/blood.2019000437.
22. Gruel, Y., Vayne, C., Rollin, J., and Pouplard, C. (2021) Reply to the letter entitled "Suggested treatment of serious complications to Covid-19 vaccination with IdeS, a bacterial antibody-cleaving enzyme", *J. Thromb. Haemost.*, **19**, 2632, doi: 10.1111/jth.15465.
 23. Kahn, F., Shannon, O., and Björck, L. (2021) Suggested treatment of serious complications to COVID-19 vaccination with IdeS, a bacterial antibody-cleaving enzyme, *J. Thromb. Haemost.*, **19**, 2363-2364, doi: 10.1111/jth.15433.
 24. Lonze, B. E., Tatapudi, V. S., Weldon, E. P., Min, E. S., Ali, N. M., Deterville, C. L., Gelb, B. E., Benstein, J. A., Dagher, N. N., Wu, M., and Montgomery, R. A. (2018) IdeS (Imlifidase): A novel agent that cleaves human igg and permits successful kidney transplantation across high-strength donor-specific antibody, *Ann. Surg.*, **268**, 488-496, doi: 10.1097/SLA.0000000000002924.
 25. Runström, A., Järnum, S., Jordan, S., Winstedt, L., and Kjellman, C. (2018) Antibodies in IVIg and its effect on IdeS activity, *American Transplant. Congr.*, A156, URL: <https://atcmeetingabstracts.com/abstract/anti-ides-antibodies-in-ivig-and-its-effect-on-ides-activity/>.
 26. Åkesson, P., Rasmussen, M., Mascini, E., von Pawel-Rammingen, U., Janulczyk, R., Collin, M., Olsen, A., Mattsson, E., Olsson, M. L., Björck, L., and Christensson, B. (2004) Low antibody levels against cell wall-attached proteins of *Streptococcus pyogenes* predispose for severe invasive disease, *J. Infect. Dis.*, **189**, 797-804, doi: 10.1086/381982.
 27. Elmore, Z. C., Oh, D. K., Simon, K. E., Fanous, M. M., and Asokan, A. (2020) Rescuing AAV gene transfer from neutralizing antibodies with an IgG-degrading enzyme, *JCI Insight*, **5**, e139881, doi: 10.1172/jci.insight.139881.
 28. Robinson, C., Frykberg, L., Flock, M., Guss, B., Waller, A. S., and Flock, J.-I. (2018) Strangvac: a recombinant fusion protein vaccine that protects against strangles, caused by *Streptococcus equi*, *Vaccine*, **36**, 1484-1490, doi: 10.1016/j.vaccine.2018.01.030.
 29. Hashikawa, S., Iinuma, Y., Furushita, M., Ohkura, T., Nada, T., Torii, K., Hasegawa, T., and Ohta, M. (2004) Characterization of group C and G streptococcal strains that cause streptococcal toxic shock syndrome, *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 186-192, doi: 10.1128/JCM.42.1.186-192.2004.
 30. Bradley, S. F., Gordon, J. J., Baumgartner, D. D., Marasco, W. A., and Kauffman, C. A. (1991) Group C streptococcal bacteremia: analysis of 88 cases, *Clin. Infect. Diseases*, **13**, 270-280, doi: 10.1093/clinids/13.2.270.
 31. Downar, J., Willey, B. M., Sutherland, J. W., Mathew, K., and Low, D. E. (2001) Streptococcal meningitis resulting from contact with an infected horse, *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 2358-2359, doi: 10.1128/JCM.39.6.2358-2359.2001.
 32. Abbott, Y., Acke, E., Khan, S., Muldoon, E. G., Markey, B. K., Pinilla, M., Leonard, F. C., Steward, K., and Waller, A. (2010) Zoonotic transmission of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* from a dog to a handler, *J. Med. Microbiol.*, **59**, 120-123, doi: 10.1099/jmm.0.012930-0.
 33. Waller, A. S., and Robinson, C. (2013) *Streptococcus zooepidemicus* and *Streptococcus equi* evolution: the role of CRISPRs, *Biochem. Soc. Trans.*, **41**, 1437-1443, doi: 10.1042/BST20130165.
 34. Björnsdóttir, S., Holden, M. T. G., Svansson, V., Harris, S. R., Webb, K., Robinson, C., Steward, K. F., Wright, N., Paillot, R., Newton, J. R., Gunnarsson, E., and Waller, A. S. (2012) *Streptococcus zooepidemicus*: more than just an opportunist? *J. Equine Vet. Sci.*, **32**, S8, doi: 10.1016/j.jevs.2012.08.024.
 35. De Negri, R. (2013) *Equine Serum Antibody Responses to Streptococcus Equi and Streptococcus Zooepidemicus*, Theses and Dissertations – Veterinary Science, 13, University of Kentucky, URL: https://uknowledge.uky.edu/gluck_etds/13.
 36. Priestnall, S., and Erles, K. (2011) *Streptococcus zooepidemicus*: An emerging canine pathogen, *Vet. J.*, **188**, 142-148, doi: 10.1016/j.tvjl.2010.04.028.
 37. Pisoni, G., Zadoks, R. N., Vimercati, C., Locatelli, C., Zanoni, M. G., and Moroni, P. (2009) Epidemiological investigation of *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* involved in clinical mastitis in dairy goats, *J. Dairy Sci.*, **92**, 943-951, doi: 10.3168/jds.2008-1548.
 38. Pelkonen, S., Lindahl, S. B., Suomala, P., Karhukorpi, J., Vuorinen, S., Koivula, I., Väisänen, T., Pentikäinen, J., Autio, T., and Tuuminen, T. (2013) Transmission of *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* infection from horses to humans, *Emerg. Infect. Dis.*, **19**, 1041-1048, doi: 10.3201/eid1907.121365.
 39. Baiter, S., Benin, A., Pinto, S. W. L., Teixeira, L. M., Alvim, G. G., Luna, E., Jackson, D., LaClaire, L., Elliott, J., Facklam, R., and Schuchat, A. (2000) Epidemic nephritis in Nova Serrana, Brazil, *Lancet*, **355**, 1776-1780, doi: 10.1016/S0140-6736(00)02265-0.
 40. Javed, R., Taku, A. K., Gangil, R., and Sharma, R. K. (2016) Molecular characterization of virulence genes of *Streptococcus equi* subsp. *equi* and *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* in equines, *Vet. World*, **9**, 875-881, doi: 10.14202/vetworld.2016.875-881.
 41. Velineni, S., and Timoney, J. F. (2013) Identification of novel immunoreactive proteins of *Streptococcus zooepidemicus* with potential as vaccine components, *Vaccine*, **31**, 4129-4135, doi: 10.1016/j.vaccine.2013.06.100.

RECOMBINANT ENDOPEPTIDASES IdeS AND IdeZ AND THEIR POTENTIAL APPLICATIONS

I. S. Boksha^{1,2*}, V. G. Lunin¹, T. A. Danilova¹, M. S. Poponova¹, N. B. Polyakov¹,
A. M. Lyashchuk¹, S. V. Konstantinova¹, Z. M. Galushkina¹, and E. V. Ustenko¹

¹ The National Research Center for Epidemiology and Microbiology
named after Honorary Academician N. F. Gamaleya of the Ministry of Health of the Russian Federation,
123098 Moscow, Russia; e-mail: boksha_irina@mail.ru

² Mental Health Research Centre, 115522 Moscow, Russia

IdeS and IdeZ endopeptidases are streptococcal virulence factors that specifically cleave IgG heavy chains and represent an interest from biotechnological, medical, and veterinary points of view. The genes encoding IdeS and IdeZ endopeptidases (the *ideS* gene was cloned from a *Streptococcus pyogenes* collection strain, and *S. zooepidemicus ideZ* gene was synthesized) were cloned and expressed in *Escherichia coli* heterologous expression system, and 6His-tag affinity domain was introduced into the amino acid sequence of each endopeptidase. IdeS and IdeZ enzymes were isolated and purified by metal affinity chromatography. The resulting IdeS and IdeZ are apparently homogeneous on polyacrylamide gel electrophoresis and are active against human and animal IgG. The specificity of human IgG cleavage by endopeptidases IdeS and IdeZ was confirmed by polyacrylamide gel electrophoresis. Application of recombinant IdeZ was demonstrated for immunological analysis of equine “strangles” (diagnostics and specific antibodies’ titer determination in the blood). Thus, IdeZ can be used in veterinary medicine and sanitary microbiology for the diagnosis of infections caused by *S. equi* and *S. zooepidemicus* in addition to their applications in medicine and biotechnology.

Keywords: recombinant endopeptidases, IdeS, IdeZ, IgG cleavage, strangles, enzyme linked immunosorbent assay