

**ПРОПОЗИЦІЯ ПРОЕКТУ
7113**

**Універсальна біосенсорна платформа для посилення сигналів,
генерованих NAD^+ / NADH -залежними ензимами**

Ukraine

1. ПРОПОЗИЦІЇ ПО ПРОЕКТУ

1.1 Назва проекту:

Універсальна біосенсорна платформа для посилення сигналів, генерованих NAD⁺/NADH-залежними ензимами

1.2 Керівник проекту:

Особа: Гончар Михайло (Professor)
Телефон: (+380.032) 2612144
Факс: (+380.032) 2612108
Ел-на пошта: mykhailo1952@gmail.com

1.3 Організації-учасниці:

Головна: Інститут біології клітини, Національної академії наук України

1.4 Існуючі закордонні партнери:

Організація: Biological and Chemical Research Centre. University of Warsaw
Особа: Marcin Karbarz
Телефон: (+48.822) 552666
Факс: (+488.822) 552666
Адреса: Warsaw, Warsaw 02-089 , Poland
Ел-на пошта: karbarz@chem.uw.edu.pl

Організація: Clarkson University
Особа: Evgeny Katz
Телефон: (+131.524) 449801
Факс: (+131.524) 449801
Адреса: Potsdam, New York 5810, United States of America
Ел-на пошта: ekatz@clarkson.edu

Організація: Queensland University of Technology
Особа: Kirill Alexandrov
Телефон: (+61.731) 386800
Факс: (+61.731) 386800
Адреса: Queensland, Canada 2434, Australia
Ел-на пошта: k.alexandrov@qut.edu.au

1.5 Тривалість проекту: 24 місяців

1.6 Виконавці проекту:

	Кількість	Зусилля в людино-днях
Вчені-оборонці	0	0
Разом виконавці	4	1797

1.7 Коротка інформація по проекту

Ця пропозиція-доповнення до оригінального проекту СВЕТ-2235349 передбачає створення новітньої дворівневої сигнал-керованої системи для біосенсорингу. Оригінальна система дозволить перемикання активності штучних химерних ензимів у нанорозмірному масштабі (на рівні біомолекул). Запропоновано новий макромасштабний перемикач, який функціонуватиме завдяки інтеграції химерних ензимів з "розумними" матеріалами, що реагують на зовнішні сигнали (гідрогелі та/або магнітні наночастинки, МНЧ). Ензим, щільно утримуваний в малих порах гідрогелю в його стиснутому стані, втратить здатність змінювати свою конформацію, і тоді його активація за допомогою біомолекулярного сигналу буде неможливою, обмежуючи таким чином його нанорозмірну адаптивність. При набуханні гідрогелю, розмір пор збільшується, що дозволяє конформаційні зміни ензиму та його активацію. Макромасштабні зміни пористості гідрогелю відбуватимуться за рахунок локальних (міжфазних) змін рН, спричинених електричними сигналами. Дві інші макромасштабні системи перемикання будуть ґрунтуватися на асоціації ензиму з МНЧ,

впливаючи на функціонування ензиму за допомогою магнітного сигналу. В одній системі, пористість гідрогелю буде змінюватись прикладанням зовнішнього магнітного поля до полімерної плівки, що містить модифіковані ензимом магнітні НЧ. В іншій системі, агрегація/дисоціація функціоналізованих ензимом МНЧ замінить субстратний обмін менш ефективною масовою дифузії більш ефективним процесом - субстратним каналуванням, впливаючи на кінетику біокаталітичної реакції. Загалом, поєднання систем перемикування нано-/макромасштабів забезпечить нову функціональність, що дозволить використовувати нові підходи в біосенсоріці.

Інтелектуальні переваги: нове дослідження, сформульоване в цій пропозиції-доповненні, підвищує функціональність процесу біосенсингу на основі химерних ензимів завдяки їхньому включенню в "розумні" матеріали, що реагують на сигнали від гідрогелів та/або МНЧ. "Розумні" матеріали забезпечать новий спосіб контролю активності химерного ензиму. Тоді як сам химерний ензим контролюється сигналами на молекулярному нанорівні, "розумні" матеріали додають функцію перемикування, керовану зовнішніми сигналами (електричними або магнітними) у макромасштабі, стимулюючи або блокуючи рівень сигналу химерного ензиму. Загалом, пропонуване доповнення спрямоване на дворівневий контроль процесу біосенсингу: у наномасштабі (на молекулярному рівні) та у макромасштабі (на рівні макроматриці). Нова багатосигнальна регульована біосенсорна система може знайти численні застосування завдяки своїй підвищеній функціональності. Загалом, результати досліджень, що поєднують химерні ензими з перемикувальними матеріалами, додають нові функціональні можливості ензимним біосенсорам. Мультидисциплінарне дослідження вимагає скоординованих зусиль різних наукових груп, а тому відповідну міжнародну команду (США-Україна-Польща) ретельно відібрано на основі вимог проекту та наявного в групах досвіду.

Більш широкий вплив: основний науковий інтерес запропонованого дослідження посилюється перспективою численних застосувань біосенсорів, інтегрованих із матеріалами, що реагують на зовнішні сигнали. Новий підхід, реалізований в запропонованій конструкції, дасть можливість створення нової узагальнюючої концепції біосенсингу з простою його адаптацією до різних аналітів, аналізованих з дуже високою чутливістю (субнаномольні концентрації), які контролюються різними зовнішніми фізичними сигналами (електричними або магнітними). Це відкриває нові можливості для різних розділів новітньої біосенсоріки, включаючи засоби для біомедичних, екологічних, судово-медичних цілей, національної безпеки тощо. Слід зазначити, що ензимні системи з перемикуванням сигналів знайдуть численні застосування у наукових і технологічних галузях, пов'язаних із біосенсорікою і переважатимуть досягнення традиційного сенсорного аналізу. Ці застосування включатимуть нетрадиційні обчислювальні системи на основі ензимів, де обробка сигналів виконуватиметься в двійковому режимі (0/1; Так/Ні), що імітує Булеві логічні операції та інші обчислювальні завдання. Інше можливе застосування включатиме біоелектронні системи з перемикуванням продуктивності, наприклад, керовані зовнішнім сигналом біопаливні елементи. Слід зазначити, що біокомп'ютерні та біоелектронні засоби, пов'язані з біосенсорікою, але спрямовані на інші, ніж аналітичне використання, цілі, будуть дуже корисними завдяки своїй продуктивності, обумовленої універсальною платформою на основі ензиму, здатного до перемикування функціонального стану (неактивний/активний).

1.8 Технічна оснащеність проекту:

Відділ має необхідне обладнання для культивування клітин мікроорганізмів (стерильні бокси, автоклави, термостати, термостатичні шейкери, центрифуги "Sorvall", "Eppendorf", ліофілізатор "Hhrystalpha 1-2 LDplus"); для виділення, очищення ферментів і дослідження їх фізико-хімічних і кінетичних характеристик (клітинні дезінтегратори, хроматографічні колонки, сорбенти, апарати для вертикального електрофорезу білків ВЕ-2М "Гелікон", перистальтичні насоси, фракційні збирачі); для синтезу та характеристики мікро- та наночастинок (атомно-силовий мікроскоп "Solver P47-PRO (NT-MDT)", скануючий електронний мікроскоп "РЕМ-мікроаналізатор РЕММА-102-02", просвічуючий електронний мікроскоп "ПЕМ-100", люмінесцентний мікроскоп "AxioLab. A1", оптичні мікроскопи); для оптичної характеристики як ферментів, так і наночастинок (спектрофотометри SHIMADZU UV-1650, флуориметр "Quantechfilter"); для електрохімічних досліджень (комерційні планарні та стрижневі електроди з різним типом робочої поверхні та різною площею поверхні, електрохімічні осередки, потенціостати "CHI 1200A" та "PGstat16").

1.9 Науково-технічна сфера :

Головна:	Sensors
Другорядні:	Chemistry

1.10 Загальна кошторисна вартість проекту:

Кошторис витрат (в доларах США)	Рік 1	Рік 2	Рік 3	Всього
Індивідуальні гранти	35920	35380	0	71300
Обладнання	5050	8700	0	13750
Матеріали	4200	3342	0	7542
Інші прямі витрати	0	0	0	0
Відрядження	0	0	0	0
Накладні витрати	3704	3704	0	7408
Запитувані в НТЦУ кошти	48874	51126	0	100000

1.11 Вступ

1.11 Вступ

В чому суть проблеми?

Впровадження модуля зміни конформації виявилось найнадійнішою стратегією для перетворення конститутивно активних ензимів у ліганд-контрольовані алостеричні перемикачі [1]. Основною перешкодою для загального застосування цієї стратегії була нестача регуляторних доменів, які можна було б використовувати для побудови таких химерних систем [2]. Рішення цієї проблеми було знайдено групою проф. Александрова, яка використовувала циклічну перестановку репортерних ензимів для створення умовного вимкненого стану, який можна повернути після індукованої лігандом міжмолекулярної циклізації [3]. Використовуючи цей підхід, ми змогли отримати перемикачі з динамічними діапазонами, що перевищують 100 разів, і використали їх для побудови двокомпонентних білкових біосенсорів, де специфічність і регульований каталіз були розділені на окремі білкові домени (ліганд-зв'язувальні та біокаталітичні домени). У цій конфігурації асоціація ліганду з ліганд-зв'язуючими домонами призводить до конформаційних змін ліганд-зв'язуючого домену, а потім викликає конформаційні зміни в біокаталітичному домені, що призводить до його активації. Модульний характер системи дозволяє адаптувати її до потенційно будь-якого аналіту, що робить її придатною для створення систем посилення сигналу. Масштабна співпраця команди Каца з командою Александрова протягом кількох років призвела до появи численних публікацій, що описують нові біосенсорні системи на основі перемикаючих химерних ензимів [4-13]. Ця робота стала надійною основою для цього проекту. Слід зазначити, що химерні перемикаються ензими вже були підготовлені та використані для посиленого біосенсору багатьох різних (біо)молекулярних речовин, починаючи від низькомолекулярних біологічних субстратів і ліків до макромолекул білків/ензимів. Примітно, що химерні ензими, активовані (біо)молекулами, були спеціально підготовлені для кожної активуючої речовини. Іншими словами, частина розпізнавання химерного ензиму завжди була різною, будучи спеціально націленою на зв'язувальний аналіт. Оскільки отримання специфічного химерного ензиму є дуже складною генно-інженерною процедурою, що займає багато часу та праці, розробка та реалізація кожного конкретного біосенсора була дуже важкою та дорогою процедурою.

1.12 Стан проблеми

Що роблять інші люди?

Химерні ензими з перемиканням сигналу, які мають як біокаталітичні, так і біорозпізнавальні одиниці, будуть отримані з мікробної піролохінолінхінон (PQQ)-залежної глюкозодегідрогенази (GDH; E.C. 1.1.5.2). Група проф. Александрова (Квінслендський технологічний університет, Австралія) має великий досвід у синтетичній біології для отримання різноманітних алостерично регульованих химерних ензимів, тоді як команда проф. Катца П.І. системи [4-13]. Біосенсори на основі циклічної перматованої PQQ-глюкозодегідрогенази забезпечують можливість виявлення різноманітних важливих біомолекул, інтегрованих із ензиматичним підсиленням вихідного сигналу з оптичним та електрохімічним звітуванням. Ці біосенсори засновані на модифікованому фрагменті GDH з *Acinetobacter calcoaceticus*, що містить штучний алостеричний ланцюг, здатний розпізнавати цільову молекулу аналіту. За відсутності аналіту сконструйований ензим має дуже низьку глюкозодегідрогеназну активність через ентропічно кероване місцеве розлад з'єднаних фрагментів GDH. Зв'язування цільового аналіту викликає реструктуризацію сконструйованого ензиму, що призводить до різкого (>10 разів) збільшення активності GDH-дегідрогенази, таким чином забезпечуючи ензиматичне посилення сигналу аналіту. Коензим PQQ у повторно згорнутому ензимі, іммобілізованому на вугільному або золотому електроді, здатний до прямого перенесення електрона на електрод, що забезпечує електрохімічне виявлення аналіту [4-9]. Використання методів хімічної еволюції для розробки алостеричного ланцюга цих ензимів, що виявляє аналіт, було можливим виявити субнанолярні концентрації відносно великих органічних молекул, таких як циклоспорин або такролімус [3]. Однак як афінність зв'язування, так і селективність розпізнавання аналітів алостеричним ланцюгом швидко зменшуються для менших молекул аналіту (молекулярна маса <

500 Да), особливо для молекул, які не володіють кількома функціональними можливостями, здатними до сильної та специфічної взаємодії з алостеричним ланцюгом. Типовими прикладами цих молекул є стероїдні гормони, включаючи статеві гормони та ензими-субстрати, які розглядаються в цьому проекті. Це дуже суттєве і фундаментальне обмеження методу, оскільки більшість ліків і біомаркерів мають молекулярну масу нижче 500 Да.

Як використовуються їхні результати?

Основний науковий інтерес запропонованого дослідження посилюється перспективою численних застосувань універсального біосенсора, інтегрованого з матеріалами, що реагують на сигнали. Новий підхід, можливо реалізований в іншій конструкції, призведе до нової загальної концепції біосенсору з простою адаптацією до різних аналітів, виміряних з дуже високою чутливістю (субнанолярні концентрації), які контролюються різними фізичними сигналами (електричними або магнітними). Це відкриє нові можливості в різних субсферах біосенсору, включаючи біомедичні, екологічні, судово-медичні, національна безпека тощо. Слід зазначити, що ензиматичні системи з підсиленням і перемиканням сигналу знайдуть багато застосувань у наукових і технологічних сферах, пов'язаних із біосенсором, але не будуть використані для традиційних застосувань зондування. Ці програми включатимуть, але не обмежуватимуться нетрадиційними обчислювальними системами на основі ензимів, де обробка сигналів виконуватиметься в двійковому режимі (0,1/правда/неправда), імітуючи логічні операції логічного типу та інші обчислювальні завдання (наприклад, напів- /повний суматор, пристрої захисту клавіатури тощо). Інше можливе застосування може включати біоелектронні системи з перемиканням продуктивності, наприклад, керовані сигналом біопаливні елементи, що працюють як біоелектронні пристрої, що імплантуються або носяться, з функцією адаптації. Примітно, що застосування біокомп'ютерів і біоелектроніки, пов'язані з біосенсором, але спрямовані на інші цілі, ніж аналітичне використання, отримують величезну користь від своєї продуктивності, заснованої на універсальній платформі, що складається з $NADH/NAD^+$ -перемикається химерного ензиму.

1.13 Мета і завдання

Проект, що фінансується NSF, в рамках програми Biosensing NSF, в основному спрямований на біосенсинг із посиленням сигналу на основі використання штучних химерних ензимів з алостеричними властивостями. Ці ензими одержані методами молекулярної/синтетичної біології, містять два зв'язані домен. Розпізнаючий домен має спорідненість до кофактора NAD^+ або $NADH$, тоді як другий домен є каталітичним, перебуваючи у вимкненій конформаційній конфігурації. Зв'язування кофакторів NAD^+ або $NADH$ з афінним доменом змінює його конфігурацію, яка поширюється на каталітичний домен, що призводить до його активації.

Що ми плануємо робити?

Ми пропонуємо двоетапний підхід для виявлення малих молекул з використанням ензиму $NAD^+/NADH$ дегідрогенази для розпізнавання такої маленької молекули як аналіту та виробництва еквімолярних кількостей NAD^+ або $NADH$ в окисно-відновній реакції з аналітом. Утворені молекули $NADH$ або NAD^+ згодом будуть зв'язані алостеричним ланцюгом на іммобілізованій глюкозодегідрогеназі PQQ , що призведе до повторного згортання ензиму в каталітично активну конформацію та посилення початкового зв'язування безперервним окисненням глюкози, виробляючи сигнал. Ми плануємо дослідити як електрохімічне, так і флуоресцентне виявлення підсиленних сигналів. Цей підхід вимагатиме ретельного проектування алостеричного ланцюга ензиму GDH . Буде необхідний дуже високий ступінь розрізнення між молекулами NAD^+ і $NADH$, оскільки виявлена молекула може бути присутня в набагато меншій концентрації, ніж її окисно-відновний аналог. Однак має бути дуже велика різниця між молекулярними зв'язками між позитивно зарядженими ароматичними піридинієвими групами в молекулі NAD^+ і відповідною гідрофобною дигідропіридиновою функціональністю в молекулі $NADH$. Команда професора Александрова (див. його лист із пропозицією наукової підтримки проекту без фінансування, пов'язаного з цією пропозицією) приготує два ензими GDH : один зі специфічними зв'язуючими речовинами чутливого ланцюга NAD^+ , а другий – зі специфічними зв'язуючими речовинами $NADH$. Система хімічно індукованої димеризації буде підготовлена за допомогою послідовних раундів відображення мРНК VHH і бібліотек монотіл на іммобілізованих стрептавідином NAD^+ -біотин і кон'югатах 1 і 2 $NADH$ -біотин.

1.14 Очікуване значення

Що нового?

Нинішній проект включає в себе дуже різноманітну дослідницьку діяльність через його міждисциплінарний характер. Він включає в себе широкий спектр дослідницьких напрямків і методів: (i) синтетична органічна хімія (отримання біотинільованих похідних NAD^+ і $NADH$), (ii) синтетична біологія (препарат химерного ензиму), (iii) хімія ензимів (химерний ензим і NAD^+ /іммобілізація $NADH$ -дегідрогенази), (iv) матеріалознавство (підготовка та модифікація електродів), (v) нанохімія (підготовка наночастинок, функціоналізованих ензимами), (vi) біоелектрохімія (реакції біосенсору, аналізовані електрохімічно), (vii) біомедицина, навколишнє середовище, криміналістика тощо, які вивчаються в модельних системах (не

плануються в цьому проекті, але є його можливими розширеннями). Завдяки мультидисциплінарному та інноваційному характеру цей проект є проектом з високим ризиком і високою окупністю. Хоча основною метою пропозиції є наукове дослідження нової концепції біосенсору, перші прототипи біосенсорних пристроїв, що демонструють посилення первинних сигналів біомолекул і обмінних дегідрогеназ для аналізу різних субстратів, будуть підготовлені наприкінці проекту. Основний ризик у проекті полягає в можливості химерних ензимів розпізнавати різні стани кофактора NAD^+ і $NADH$. Хоча наявні попередні результати продемонстрували високу вибірковість у розпізнаванні біомолекул химерними ензимами, вибіркове розпізнавання NAD^+ і $NADH$ не є повністю гарантованим, що робить проект ризикованим. Наша особлива увага буде приділена мінімізації ризиків шляхом розгляду альтернативних шляхів у дослідницькій програмі.

1.15 Організація, кваліфікація і склад персоналу

Хто ми?

До складу міжнародної команди увійдуть:

Команда США: проф. Євген Катц (Університет Кларксона), проф. Олег Смуток (Університет Кларксона; Інститут біології клітини)
біології НАН України)

Українська команда: проф. Михайло Гончар, пані Юлія Наум (Інститут біології клітини Національної академії ім. наук України)

Команда з Польщі: проф. Марцін Карбарж, д-р Клаудія Канєвська (Варшавський університет)

Австралійська команда: професор Кирило Александров (Квінслендський технологічний університет) – співавтор, фінансований не NSF.

Робота в міжнародній команді – запорука успіху проекту. Професор Смуток (український вчений, наразі науковий співробітник Університету Кларксона) вже включений до команди США, і його робота над аспектами біосенсору проекту є дуже важливою (вже результатом є 35 спільних робіт, у тому числі 2 статті *Nature*). Українська команда має тривалу історію співпраці з американською групою (вже створено 5 спільних робіт). Ця команда привносить у проект унікальний досвід у галузі біонанотехнологій, створюючи магнітні наночастинки зі спеціальними властивостями та модифіковані штучними ензимами. Польська група також має довгу історію співпраці (результатом – 2 спільні роботи). Доктор Канєвська була довгостроковим дослідником у американській групі, що забезпечило ідеальне спілкування та досвід, необхідні для співпраці. Ця команда принесе в проект унікальний досвід у «розумних» матеріалах, що реагують на сигнали (завантажені ензимами біосумісні гідрогелі). Проф. Кирило Александров (Австралія – співавтор, що не фінансується NSF) має велике значення для надання штучних контрольованих сигналом ензимів, виготовлених його групою відповідно до методів молекулярної/синтетичної біології. Співпраця з професором Александровим була активною протягом багатьох років, що призвело до 12 спільних робіт, включаючи 2 статті *Nature*. Його участь у проекті критично важлива для всього проекту, який базується на штучних ензимах, виготовлених у його лабораторії. Примітно, що розроблена в Австралії технологія молекулярної/синтетичної біології буде передана міжнародним співробітникам, які працюють над проектом. Ця передача технології/методології призведе до розширення трансформаційних знань, що неможливо без міжнародного обміну інформацією.

Як цей проект пов'язаний з іншою нашою роботою?

Нинішній проект (у його оригінальній формулюванні та нових розділах, описаних у цій пропозиції доповнення) включає дуже різні дослідницькі дії через його міждисциплінарний характер. Він включає в себе широкий спектр дослідницьких напрямків і методів: (i) синтетична органічна хімія (отримання біотинільованих похідних NAD^+ і $NADH$), (ii) синтетична біологія (препарат химерного ензиму), (iii) хімія ензимів (химерний ензим і NAD^+ /Імобілізація $NADH$ -дегідрогенази), (iv) матеріалознавство (підготовка та модифікація електродів, приготування гідрогелю), (v) нанохімія (підготовка наночастинок, функціоналізованих ензимами), (vi) біоелектрохімія (реакції біосенсору, аналізовані електрохімічно), (vii) біомедичні, екологічні, судово-медичні тощо застосування, що вивчаються в модельних системах (не плануються в цьому проекті, але є його можливими розширеннями). Через мультидисциплінарний та інноваційний характер цей проект має виконуватися в рамках міжнародних зусиль на основі взаємодоповнюючого досвіду груп, залучених до проекту. Хоча основною метою пропозиції є наукове дослідження нової концепції біосенсору, перші прототипи біосенсорних пристроїв, що демонструють посилення первинних сигналів біомолекул і обмінних дегідрогеназ для аналізу різних субстратів, будуть підготовлені наприкінці проекту. Основний ризик у проекті полягає в можливості розпізнавання химерними ензимами різних станів кофактора NAD^+ і $NADH$. Хоча наявні попередні результати продемонстрували високу вибірковість у розпізнаванні біомолекул химерними ензимами, вибіркове розпізнавання NAD^+ і $NADH$ не є повністю гарантованим, що робить проект ризикованим. Наша

особлива увага буде приділена мінімізації ризиків шляхом розгляду альтернативних шляхів у дослідницькій програмі.

1.16 Очікувані результати

Що буде зроблено у цьому проекті?

(i) У той час як більшість традиційних біосенсорів розроблено для вимірювання одного конкретного аналіту, запропонований підхід пропонує універсальну платформу біосенсору, яку можна легко адаптувати до широкого спектру аналітів з дуже дрібним налаштуванням.

(ii) Хоча більшість біосенсорів на основі ферментів забезпечують стехіометричну відповідь на концентрацію аналіту, запропонований підхід пропонує посилену відповідь, таким чином різко підвищуючи чутливість.

(iii) Інтеграція ферментної системи з «розумними» матеріалами, що реагують на сигнали (гідрогелі та/або магнітні наночастинки), призведе до дворівневої (нано-/макромасштабної) регуляції біосенсору. Поєднання універсальної платформи біосенсора з посиленими вихідними сигналами та інтеграція з «розумними» матеріалами дозволить отримати нові досягнення в біосенсорах, дозволяючи їх застосовувати в областях, де традиційно вони не могли використовуватися.

Які наступні кроки?

Нинішній проект (у його оригінальній формулюванні та нових розділах, описаних у цій пропозиції доповнення) включає дуже різні дослідницькі дії через його міждисциплінарний характер. Він включає в себе широкий спектр дослідницьких напрямків і методів: (i) синтетична органічна хімія (отримання біотинільованих похідних NAD^+ і $NADH$), (ii) синтетична біологія (препарат химерного ферменту), (iii) хімія ферментів (химерний фермент і NAD^+ /Імобілізація $NADH$ -дегідрогенази), (iv) матеріалознавство (підготовка та модифікація електродів, приготування гідрогелю), (v) нанохімія (підготовка наночастинок, функціоналізованих ферментами), (vi) біоелектрохімія (реакції біосенсору, аналізовані електрохімічно), (vii) біомедичні, екологічні, судово-медичні тощо застосування, що вивчаються в модельних системах (не плануються в цьому проекті, але є його можливими розширеннями). Через мультидисциплінарний та інноваційний характер цієї роботи проект має виконуватися в рамках міжнародних зусиль на основі взаємодоповнюючого досвіду груп, залучених до проекту. Хоча основною метою пропозиції є наукове дослідження нової концепції біосенсору, перші прототипи біосенсорних пристроїв, що демонструють посилення первинних сигналів біомолекул і обмінних дегідрогеназ для аналізу різних субстратів, будуть підготовлені наприкінці проекту. Основний ризик у проекті полягає в можливості розпізнавання химерними ферментами різних станів кофактора NAD^+ і $NADH$. Хоча наявні попередні результати продемонстрували високу вибірковість у розпізнаванні біомолекул химерними ферментами, вибіркоче розпізнавання NAD^+ і $NADH$ не є повністю гарантованим, що робить проект ризикованим. Наша особлива увага буде приділена мінімізації ризиків шляхом розгляду альтернативних шляхів у дослідницькій програмі.

1.17 Обсяг робіт

Які завдання будуть виконані?

В рамках запропонованого проекту команда Інституту біології клітини виконуватиме наступні етапи роботи: 1. Синтез та характеристика нанозимів із NAD^+ / $NADH$ -залежною активністю.

В межах етапу буде проведено синтез нових наноматеріалів на основі шляхетних та перехідних металів; буде проведено структурну характеристику отриманих НЗ за допомогою сканувальної електронної мікроскопії, флуоресцентної мікроскопії та рентгеноспектрального аналізу; буде здійснено дослідження оксидоредуктної активності синтезованих НЗ; буде досліджена каталітична характеристика наноматеріалів.

2. Синтез та характеристика феромагнітних наночастинок.

Буде проведено синтез нових феромагнітних наноматеріалів; буде здійснено структурну характеристику отриманих НЗ за допомогою сканувальної електронної мікроскопії, флуоресцентної мікроскопії та рентгеноспектрального аналізу; буде виконано дослідження їхньої можливої псевдоензиматичної активності; буде досліджено каталітичні і магнітні властивості наноматеріалів.

3. Імобілізація природних ензимів на поверхні наноносіїв.

Наноккомпозити на основі феромагнітних наночастинок буде іммобілізовано з природними ензимами. Отримані біонаноккомпозити буде охарактеризовано магнітометричними методами. Будуть опрацьовані способи та умови іммобілізації ензимів (фізична сорбція та ковалентні методи).

4. Дослідження поведінки феромагнітних наночастинок/нанозимів, включених у гідрогелі.

Буде досліджено різні умови включення синтезованих наноккомпозитів в гідрогелі різного хімічного складу. Буде вивчено псевдоензиматичні та магнітні властивості отриманих матеріалів. Буде вивчено вплив факторів навколишнього середовища (рН та температури) на властивості утворених гідрогелів.

1.18 Технічний підхід та методологія

Яким чином це буде зроблено?

Ціль 1: Отримання біотинільованих похідних кофакторів NAD^+ та $NADH$. Щоб підготувати алостеричний перемикач, що специфічно зв'язує кофактори NAD^+ або $NADH$, кофактори повинні бути іммобілізовані на полімерній поверхні розділу. Ми будемо синтезувати сполуку 1, що містить біотиновий придаток, приєднаний до аденінової частини NAD^+ через гнучкий гексаетиленгліколевий лінкер (див. кроки процедури синтезу, описані на малюнку 5). Кон'югат 1 буде іммобілізований на агарозних кульках за допомогою взаємодії стрептавідин-біотин із застосуванням раніше опублікованої методології.³ Синтез кон'югату 1 буде проведено в Університеті Кларксона, а потім продукт буде відправлено групі Prof. Александрову для розробки специфічного зв'язуючого речовини та підготовки біосенсорів GDH , специфічних для NAD^+ або $NADH$. Кон'югат $NADH$ -біотин 2 буде отримано шляхом обробки іммобілізованого на стрептавідин-агарозі NAD^+ -біотин кон'югату 1 великим надлишком водного розчину дитіоніту натрію або $NaBH_3CN$.¹⁴ Через відсутність дисульфідних зв'язків у стрептавідині відновлення не порушить зв'язування стрептавідинбіотину.

Ціль 2: Отримання химерного алостеричного ферменту GDH , активованого $NADH$ або NAD^+ . Лабораторія професора Александрова створила платформу на основі відображення мРНК для розробки систем димеризації білків, контрольованих білками або малими молекулами лігандів.¹⁵ Платформа буде використовуватися для вибору хімічно індукованої системи димеризації білків, керованої NAD^+ або $NADH$. Це буде досягнуто шляхом початкового навчання зв'язуючого білка на основі каркаса VHH вибірково розпізнавати NAD^+ , але не $NADH$ (або навпаки). У наступному раунді відбору бібліотека монотіл¹⁶ буде використана для вибору зв'язуючого, який вибірково розпізнає комплекс $NAD^+ : VHH$, але не один із компонентів окремо. Оскільки система на основі GDH має високу каталітичну активність ($k_{cat} > 1000 \text{ s}^{-1}$) і великий динамічний діапазон, очікується, що він функціонуватиме як підсилювач сигналу. Це відрізняє дизайн від попередніх спроб отримати вигоду від природних $NAD^+ / NADH$ -залежних ферментів, де репортер працював стехіометрично.¹⁷ Робота з синтетичної біології в лабораторії професора Александрова (Австралія) буде виконуватися з Ph.D. запрошений студент з групи Katz. Потім методи та технології будуть передані групі США для виконання всіх технічних етапів у групі Каца (Університет Кларксона).

Ціль 3: Ефективність біосенсора химерного алостеричного ферменту GDH у розчині з додаванням $NADH$ або NAD^+ . Як тільки $NADH$ -активований химерний алостеричний фермент GDH стане доступним, ми дослідимо його роботу в розчині в присутності $NADH$, доданого в різних концентраціях (див. розділ «Проблема 1»). Реакцію аналізуватимуть у присутності глюкози (використовуваної у постійній фізіологічній концентрації), що діє як «паливо» — донор електронів, і феназинметосульфату (PMS), що діє як акцептор електронів. Згідно з очікуваним результатом, реакція не буде відбуватися (або протікати з дуже малою швидкістю) за відсутності кофактора $NADH$. Коли $NADH$ додається до розчину, він зв'яжеться з доменом розпізнавання химерного GDH і активує біокаталітичну частину ферменту. Коли фермент активний, очікується, що швидкість ПМС різко зростає. Зниження ПМС супроводжується вимірюванням флуоресценції зменшеного ПМС; зауважте, що сигнал фонові флуоресценції, який спостерігається за відсутності ферменту GDH , буде віднято. Найважливіший контрольний експеримент буде проведено в присутності NAD^+ замість $NADH$. Згідно з очікуваним результатом, він не активує GDH , якщо розпізнавальна частина химерного ферменту достатньо специфічна для $NADH$. Якщо біокаталітична реакція активується в присутності NAD^+ , проект повернеться до попереднього кроку (ціль 2), щоб покращити специфічність алостеричного ферменту. Подібні експерименти будуть проведені з іншим химерним алостеричним GDH , специфічним для NAD^+ . У цій серії експериментів ми очікуємо активації GDH за допомогою NAD^+ , але не за допомогою $NADH$.

Ціль 4: Ефективність біосенсора химерного алостеричного ферменту GDH у розчині з $NADH$ або NAD^+ , отриманими *in situ*. Цей набір експериментів буде подібний до експериментів у Цілі 3 (див. розділ «Проблема 1»), але кофактори $NADH$ або NAD^+ будуть вироблятися *in situ* за допомогою специфічних реакцій, що каталізуються різними $NAD^+ / NADH$ -залежними дегідрогеназами. Ми тестуватимемо різні дегідрогенази з їх субстратами, застосованими у змінних концентраціях (наприклад, лактатдегідрогеназу в присутності різних концентрацій лактату). Примітно, що багато різних дегідрогеназ будуть застосовні, за винятком глюкозодегідрогенази з глюкозою (зауважте, що глюкоза зарезервована як «паливо» для посилення сигналу алостеричного GDH , тому її не можна використовувати як мішень-аналіт).

Ціль 5: Ефективність біосенсора химерного алостеричного ферменту GDH , іммобілізованого на поверхні електрода. Химерний алостеричний фермент GDH буде ковалентно зв'язаний з поверхнею електрода, утворюючи біокаталітичний моношар. Будуть використані два види провідних опор: (i) мікропористий золотий електрод,¹⁸⁻²⁰ (ii) бакінапір, що складається зі стиснених вуглецевих нанотрубок (CNTs).²¹ Ковалентна іммобілізація химерного ферменту буде виконана за допомогою лінкерів, що зв'язуються з аміногрупами лізину.²² Примітно, що процедури іммобілізації вже були випробувані на інших (різних) видах химерних ферментів.⁴⁻⁹ Ковалентне зв'язування відбуватиметься випадковим чином до різних залишків лізину, таким чином, призводячи до різних орієнтацій молекул ферменту на поверхні електрода. У першій серії експериментів кофактор $NADH$ (або NAD^+) для активації іммобілізованого химерного ферменту

відбуватиметься в масовому розчині з використанням розчинних NAD^+ / $NADH$ дегідрогеназ з відповідними субстратами. Активність химерного ферменту у вимкненому стані до виробництва $NADH$ (або NAD^+) і після їх зв'язування з доменом розпізнавання химерного ферменту буде проаналізовано за допомогою циклічної вольтамперометрії та хроноамперометрії. На наступному етапі NAD^+ / $NADH$ -дегідрогенази будуть спільно іммобілізовані на поверхні електрода. Дуже важливо мати химерний GDH , зв'язаний безпосередньо з провідною межею розділу, тоді як передбачається, що другий шар, утворений NAD^+ / $NADH$ -дегідрогеназами, генерує розчинний кофактор NAD^+ або $NADH$, таким чином, він може бути розташований як другий шар на електроді вище первинний шар химерного ферменту GDH . NAD^+ / $NADH$ -дегідрогеназа буде ковалентно зв'язана, використовуючи стандартну карбодіімідну процедуру, з аміно-дериватизованими силанізованими наночастинками SiO_2 (NP) (діаметр 200 нм). Потім функціоналізовані ферментом SiO_2 -NPs будуть нанесені (фізично адсорбовані) на первинний шар химерного GDH . Система вироблятиме NAD^+ або $NADH$, залежно від типу використовуваної дегідрогенази та домену розпізнавання GDH , активованого $NADH$ або NAD^+ . Вторинна дегідрогеназа вироблятиме сигнал у формі $NADH$ або NAD^+ у відповідь на доданий цільовий аналіт-субстрат. Химерний GDH буде активований і посилює сигнал, використовуючи додану глюкозу як «паливо» посилення. Посилений сигнал (струм) буде проаналізовано за допомогою циклічної вольтамперометрії та хроноамперометрії. Експерименти будуть спрямовані на аналіз коефіцієнта посилення, досягнутого в системі. Ми використаємо кілька різних прикладів NAD^+ / $NADH$ дегідрогеназ, депонованих на універсальній біосенсорній платформі, яку забезпечує первинний химерний фермент. Крім того, будуть протестовані два типи химерних ферментів GDH , активованих $NADH$ або NAD^+ .

Ціль 6: Ефективність біосенсора химерного алостеричного ферменту GDH , іммобілізованого на непровідній поверхні розділу. Як альтернативу електрохімічному біосенсу ми досліджуватимемо передачу оптичного сигналу. Перемикається химерний фермент буде ковалентно іммобілізований на наночастинках SiO_2 (SiO_2 -NPs, діаметр 200 нм), які будуть нанесені на листи скловолокна. 10 Потім NAD^+ -залежна дегідрогеназа буде іммобілізована подібним чином на SiO_2 -NPs, які будуть нанесені на сенсорний інтерфейс як другий шар. NAD^+ дегідрогеназа вироблятиме *in situ*, локально на поверхні розділу, $NADH$ у присутності субстрату аналіту (див. розділ «Проблема 1»). Утворений $NADH$ буде зв'язаний із сайтом розпізнавання химерного ферменту, що призведе до активації химерного ферменту. Це призведе до каталітичного виробництва відновленого PMS, який вироблятиме флуоресценцію (зверніть увагу, що відновлений PMS, PMSred, виробляє набагато вищу флуоресценцію, ніж початкова окислена форма PMS, PMSox). Загалом, флуоресценція буде посиленням сигналом для аналізу первинного субстрату (аналіту), який споживає NAD^+ -залежна дегідрогеназа, розташована у другому шарі SiO_2 -NP. Цей аналітичний підхід уже досліджувався з іншим типом химерного ферменту, активованого циклоспорином А. Примітно, що в цьому фоновому дослідженні 10 химерний фермент був іммобілізований окремо на межі без NAD^+ дегідрогенази (яка не була потрібна в цій системі).

1.19 Планування самодостатності

Результатом цієї дослідницької програми стане універсальна біосенсорна платформа, яку легко адаптувати до широкого спектру аналітів, що працюють із широким спектром $NADH/NAD^+$ -залежних дегідрогеназ. Науковим результатом стануть нові знання про химерний алостеричний фермент, що забезпечує посилення первинних сигналів аналіту, що дозволяє проводити аналіз при дуже низьких (субнаномольних) концентраціях. Перший прототип біосенсорного пристрою буде сконструйований шляхом вибору практично важливих аналітів, які представляють інтерес для біомедичного або екологічного аналізу. Буде зібрано дві додаткові приклади систем, щоб проілюструвати ширші застосування перемикаючих химерних ферментів: (i) біообчислювальна система з підсиленням вихідного сигналу та (ii) біопаливна комірка з перемикальною роботою, керованою дуже низькими вхідними сигналами, посиленими химерним ферментом.

В чому саме полягає наше завдання дослідження ринку?

Наше завдання дослідження ринку полягає в оцінці потенціалу запропонованого підходу створення нових хемо/біосенсорів та визначенні можливостей для їх впровадження на ринку.

Завдання:

А. Сформулювати гіпотезу щодо потенційного використання хемо/ біосенсорів: "Ми вважаємо, що компанії будуть зацікавлені в запропонованих хемо/біосенсорах, які може легко адаптувати до вимірювання різних аналітів з мінімальними змінами налаштувань." Нашим завданням буде надати інформацію про можливості потенційного використання хемо/біосенсорів, провести аналіз інтересу ринку та визначити потенційні сегменти ринку, де цей підхід може мати найбільше значення.

В. Ми дослідимо організації, які можуть фінансувати дослідження в області біосенсорів, з метою з'ясування можливостей отримання підтримки для нашого проекту. Нашим завданням буде визначити

пріоритети цих організацій та їхню зацікавленість у наших універсальних хемо/біосенсорах, а також перевірити відповідність нашого наукового напрямку їхнім пріоритетам фінансування.

Ці завдання дозволять нам отримати глибоке розуміння ринкового потенціалу запропонованої універсальної платформи біосенсору та визначити стратегію для успішного впровадження її на ринку.

Що ми збираємось робити?

Кроки, які планує зробити наша команда для досягнення завдань дослідження ринку:

- *Проведемо аналіз літератури та існуючих ринкових трендів.*
- *Підготуємо огляд актуальних наукових публікацій та ринкових аналізів у сфері хемо/біосенсорів.*
- *Визначимо потенційні ринкові можливості.*
- *Визначимо ключові переваги нашого продукту.*

Яким буде результат проекту?

Підготуємо короткий текст, презентацію у форматі powerpoint, які описують потенціал нашої наукової команди та інноваційність наших хемо/біосенсорів для аналізу важливих аналітів.

УЗГОДЖЕННЯ З ОРГАНІЗАЦІЄЮ-УЧАСНИКОМ

Назва проекту:

Універсальна біосенсорна платформа для посилення сигналів, генерованих NAD⁺/NADH-залежними ензимами

Організація-учасник:

Назва: **Інститут біології клітини**
 Адреса: Ukraine, Lviv, Drahomanov Str. 14/16
 Телефон: (+380.032) 2612144
 Факс: (+380.032) 2612108
 Ел-на пошта: mykhailo1952@gmail.com

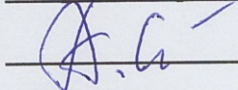
вивчила вищевказану пропозицію по проекту і повністю згодна з вказаними в ній цілями та діяльністю.
 Ми визнаємо, що:

- Підтримка проекту Українським науково-технологічним центром (УНТЦ) буде підпорядковуватися відповідним умовам, що їх вимагають Угода про заснування УНТЦ, Статут УНТЦ, рішення Адміністративної Ради та Проектна Угода, яка може бути укладена з УНТЦ.
- Основний персонал працював в 1980-1990 р. по створенню систем озброєнь.
- Вся інформація під час виконання проекту не буде порушувати будь-якої державної таємниці.
- Відповідно до Статті VIII Угоди про заснування УНТЦ, виконавці проекту будуть надавати Центру і кожній з сторін, які повністю чи частково фінансують даний проект, право доступу для здійснення на місці перевірки і ревізії всієї діяльності по проекту. Виконавці проектів мають право на захист тих ділянок, які не відносяться до проекту.
- Права на інтелектуальну власність регулюються законами України та процедурами, які встановлені в УНТЦ.
- Наведений нижче розподіл кошторису є задовільним.

Кошторис витрат (в доларах США)	Рік 1	Рік 2	Рік 3	Всього
Індивідуальні гранти	35920	35380	0	71300
Обладнання	5050	8700	0	13750
Матеріали	4200	3342	0	7542
Інші прями витрати	0	0	0	0
Відрядження	0	0	0	0
Накладні витрати	3704	3704	0	7408
Запитовані в НТЦУ кошти	48874	51126	0	100000

Прізвище та підпис особи, уповноваженої приймати зобов'язання від імені організації:

ПІП: Сибірний Андрій Андрійович

Підпис: 

Посада: Директор

Керівник проекту від організації:

ПІП: Гончар Михайло Васильович

Підпис: 

Посада: Завідувач відділу

