



С-ТЕРМИНАЛЬНЫЙ ДОМЕН ГЕМОЛИТИЧЕСКОГО ТОКСИНА II *Bacillus cereus* СПОСОБЕН ВЗАИМОДЕЙСТВОВАТЬ С ЭРИТРОЦИТАМИ

© 2020 г. Н. В. Руденко*, ***, #, А. П. Каратовская*, А. В. Замятина*, ***, А. В. Сиунов**,
Ж. И. Андреева-Ковалевская**, А. С. Нагель**, Ф. А. Бровко*, ***, А. С. Солонин**

*Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, РАН,
Россия, 142290, Пушкино, проспект Науки, 6

**Федеральный исследовательский центр “Пушинский научный центр биологических исследований Российской
академии наук”, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина, РАН,
Россия, 142290, Пушкино, проспект Науки, 5

***Пушинский государственный естественно-научный институт, Россия, 142290, Пушкино, проспект Науки, 3

Поступила в редакцию 21.11.2019 г.

После доработки 09.12.2019 г.

Принята к публикации 16.12.2019 г.

Гемолизин II (HlyII) – один из патогенных факторов *Bacillus cereus*. Гемолизин II отличается от пороформирующих токсинов со структурой типа β -баррель наличием С-терминальной аминокислотной избыточности из 94 остатков (СТД). Роль СТД в формировании мембранной поры и лизисе клеток не ясна, хотя известно, что удаление этой части белка значительно уменьшает гемолитическую активность. Получена представительная панель моноклональных антител против рекомбинантного СТД, узнающих полноразмерный HlyII. Использование полученных моноклональных антител позволило показать, что СТД способен связываться с эритроцитами.

Ключевые слова: бактериальные цитоллизины, доменная структура, моноклональные антитела, порообразующие токсины

DOI: 10.31857/S013234232003029X

ВВЕДЕНИЕ

Bacillus cereus способен вызывать пищевые отравления и раневые инфекции чаще у людей с ослабленным иммунитетом и является одной из распространенных причин внутрибольничных инфекций. Секретируемые бактерией токсины, образуют наноразмерные поры в клеточных мембранах, что приводит к утечке клеточных компонентов. Одним из факторов вирулентности условно-патогенного микроорганизма *B. cereus* является порообразующий токсин гемолизин II (HlyII) [1]. Цитолитическая активность гемолизина II была изучена в клеточных культурах, эритроцитах [2], плоских бислойных мембранах [3], гепатоцитах мыши [4], а также дафниях [5] и харовых водорослях [6]. В зрелом состоянии этот токсин является гомологом α -токсина *Staphylococcus aureus* с 38%-ной идентичностью на уровне аминокислот [1]. HlyII по сравнению с α -токсином *S. aureus* имеет

С-концевое удлинение из 94 аминокислотных остатков, обозначаемых как СТД (С-терминальный домен) [1, 7]. Делеционный вариант HlyII, лишенный СТД, обладает в 8 раз меньшей гемолитической активностью на эритроцитах кролика по сравнению с интактным HlyII [7]. Механизм, согласно которому этот домен влияет на активность HlyII, неизвестен. При поиске белков (BLAST), имеющих аминокислотную гомологию с С-концевым доменом, обнаружен лишь один участок плазмидной локализации у *Bacillus anthracis*, который является фрагментом гена с неизвестной функцией. Фрагмент, соответствующий остаткам 337–410 в HlyII, обнаружен в плазмиде ХО1 (ID последовательности: AJN43116.1, 29.73% идентичности последовательности гипотетического белка AW20_5667 *B. anthracis* str. Sterne) [8]. Этот факт может указывать на возможность горизонтального переноса генетической информации и его селективного закрепления в составе гемолизина [9]. Наличие С-концевой избыточности ранее описано для некоторых порообразующих белков *Vibrio species*. Характерные домены с лектин-подобной пространственной структурой, связывают гликановые рецепторы на поверхности

Сокращения: СТД – С-терминальный домен гемолизина II *Bacillus cereus*; МА – моноклональные антитела; тИФА – твердофазный иммуноферментный анализ; PBS – фосфатно-солевой буфер; PBST – PBS, содержащий 0.1% Tween 20.

Автор для связи: (тел.: +7 (926) 592-11-89; эл. почта: nrudkova@mail.ru).

клеток-мишеней [10, 11]. Подобное расположение STD в молекуле HlyII *B. cereus* позволяет предположить его важность при связывании с мембранами клеток инфицированного организма для обеспечения локального повышения концентрации токсина, обеспечивающего образование препоры. Однако, отсутствие гомологии аминокислотной последовательности в С-концевых доменах токсинов *B. cereus* и *V. species* [12] не позволяет предположить, что С-концевой домен HlyII функционирует по аналогичному механизму.

Данная работа посвящена, получению МА к STD, и выяснению с их помощью возможной роли STD во взаимодействии с эритроцитами кролика.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение моноклональных антител к STD. Для получения МА в качестве антигена был использован рекомбинантный препарат STD. При создании генетической конструкции вспомогательный His-tag был размещен на С-конце молекулы, предполагая, что данная последовательность не будет влиять на функции белкового домена. В работе [9] показано, что пространственная структура STD уникальна для пороформирующих токсинов и состоит из нескольких β -тяжей, организованных в бочкоподобную структуру с α -спиралями внутри. С-концевые аминокислоты молекулы STD не участвует в формировании общей структуры домена. Эта модель была получена с помощью ЯМР мутантной формы STD, в которой пролин в 405 положении заменен на метионин. Такая замена обеспечила существование только *транс*-изомера STD, что позволило создать его пространственную модель.

При иммунизации STD возникли проблемы. Длительная иммунизация животных STD не приводила к развитию значимого иммунного ответа, только одна особь из 4 экспериментальных групп после девятой иммунизации (группа № 2) демонстрировала высокое содержание специфических антител в сыворотке крови – около 1/1000000. Титр остальных при этом составлял не более 1/32000. Титры сывороток иммунных мышей определяли методом непрямого тИФА на планшетах с иммобилизованным STD. Высокий титр свидетельствовал о формировании достаточного пула плазматических клеток для получения гибридных клеточных линий, стабильно продуцирующих МА, как *in vitro*, так и *in vivo*. Спленоциты особи, демонстрирующей высокий уровень специфических антител в сыворотке крови, были использованы в качестве источника лимфоцитов для получения гибридом, секретирующих МА против STD, по методу Келлера и Мильтштейна [13]. Отбор гибридом, секретирующих специфичные антитела, проводили непрямым тИФА по взаи-

модействию надклеточных супернатантов с иммобилизованным на иммунопланшеты STD. Отобраны 27 гибридом, которые были дважды клонированы методом лимитирующих разведений. По результатам оценки пролиферативной активности и стабильности продукции антител было отобрано 24 стабильных гибридных клон, секретирующих МА против STD. Все полученные антитела содержали в своем составе легкую цепь κ (каппа), 22 принадлежали к классу G, подклассу 1, тяжелая цепь HlyIIC-18 и HlyIIC-40–IgG2b. В иммуноблоттинге все МА взаимодействовали как с STD, так и с интактным HlyII (рис. 1).

Взаимодействие STD с эритроцитами. Несмотря на то, что в настоящее время нет информации о возможной функции STD, логично предположить наличие способности взаимодействовать с прокариотическими клетками. МА были использованы для подтверждения этого предположения. Эксперимент проводили с использованием в качестве модели эритроцитов кролика. Взаимодействие STD с эритроцитами определяли в составе иммунных комплексов STD-МА-био, схема эксперимента представлена на рис. 2. В качестве отрицательного контроля использовали не иммунные иммуноглобулины мыши биотинилированные так же, как и МА. Для эксперимента использовали биотинилированные МА: HlyIIC-15, HlyIIC-16, HlyIIC-23, HlyIIC-30, HlyIIC-34, HlyIIC-37. Иммунные комплексы (STD-МА-био) добавляли к суспензии эритроцитов. После часовой инкубации либо при 20°C, либо при 37°C эритроциты трижды отмывали избытком PBS, содержащим 5% бычьей сыворотки для удаления возможного неспецифического взаимодействия STD с эритроцитами. Комплексы эритроцитов со связавшимися иммунными комплексами разрушали обработкой 0.1 М Gly HCl, pH 2.5. После удаления дегриса центрифугированием супернатанты нейтрализовали 1 М Tris-HCl, pH 8.0. Наличие антител в супернатантах свидетельствовало о взаимодействии STD в составе иммунных комплексов с эритроцитами. Антитела в супернатантах выявляли методом тИФА по взаимодействию с иммобилизованными на иммунопланшеты антителами кролика против иммуноглобулинов мыши. Биотинилированные антитела детектировали стрептавидин-пероксидазой. Полученные результаты представлены в виде диаграммы на рис. 3. В лизатах эритроцитов выявлялись МА HlyIIC-16 и HlyIIC-23, следовательно, иммунные комплексы STD с этими антителами связывались с эритроцитами, а сами антитела не препятствовали связыванию STD с эритроцитами. Относительное содержание HlyIIC-23 было на 48% ниже, чем HlyIIC-16, что может указывать на взаимодействие с неидентичными эпитопами. Взаимодействие STD с мембранами эритроцитов носило температурно-зависимый характер. При комнат-

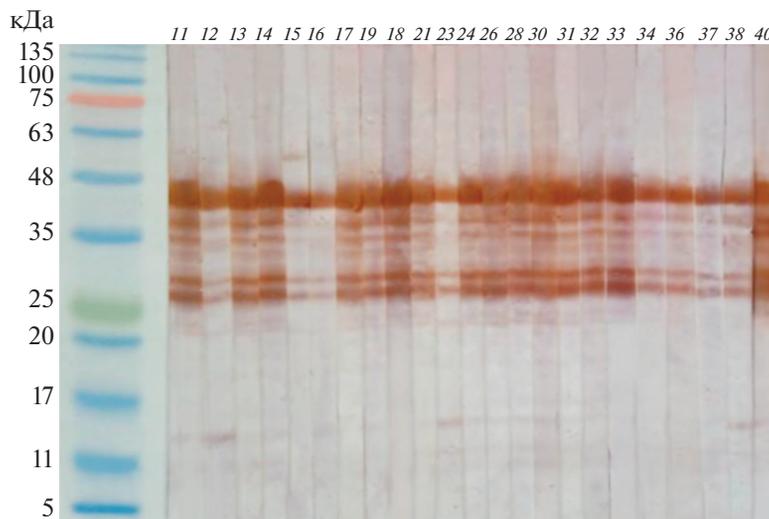


Рис. 1. Взаимодействие МА против STD с HlyII–His₆ в иммуноблоттинге. Над треками указаны названия МА. Левый трек – стандарты молекулярных масс.

ной температуре содержание антител в супернатантах падало на 29%, по сравнению с данными, полученными после инкубации при 37°C, что свидетельствовало о более низкой эффективности взаимодействия STD с эритроцитами при понижении температуры. МА HlyIIС-15, HlyIIС-30, HlyIIС-34 и HlyIIС-37 не детектировались в супернатантах. Этот результат позволяет предположить, что их эпитопы на поверхности белка расположены таким образом, что эти МА в составе иммунных комплексов не позволяют STD взаимодействовать с эритроцитами. Взаимодействие STD с эритроцитами наблюдали только при использовании определенных антител (HlyIIС-16 и HlyIIС-23), эпитопы которых на молекуле домена не влияли на его связывание с клетками. Этот факт указывает на то, что взаимодействие STD ориентировано относительно поверхности эритроцита.

Таким образом, экспериментально доказано, что STD способен взаимодействовать с эритроцитами, и это явление не связано со случайным налипанием STD на поверхность эритроцитов. Использование биотинилированных антител к STD позволило заключить, что гемолизин II обладает дополнительной функциональной активностью — адгезией к поверхности эукариотических клеток,

а сам STD играет существенную роль в этом процессе.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штаммы, плазмиды и ферменты. *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen, Германия) была использована для трансформации pET29b(+) (Novagen, Германия). Эндонуклеазы рестрикции KpnI и NdeI (Thermo Scientific, Waltham, MA США), T4-DNA лигаза (NEB, США), белковые маркеры (Abcam, Англия) и ДНК электрофорезные маркеры (Fermentas, Литва), TaqSE-ДНК полимеразы, (SibEnzyme, Россия), dNTP смесь (Thermo Scientific, Waltham, MA США). Encyclo-ДНК полимеразы (Evrogen, Россия). Эндотоксин экстрактор (Силекс, Россия). Конъюгат антител козла с пероксидазой хрена (Thermo Scientific, США). Конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена (Thermo Scientific, США). Тотальную ДНК *Bacillus cereus* ATCC 14579 использовали в качестве матрицы.

Экспрессия и очистка STD His₆. ПЦР-продукт, кодирующий STD был клонирован с использованием вектора pET29b (+) по сайтам NdeI и KpnI. Все конструкции были подтверждены секвенированием ДНК. Последовательность ДНК, кодирующая STD, была амплифицирована с помощью праймеров:

STD_KpnI_Rev: 5'-TTAGGTACCGATCTGTTTAATCTCGATA
 STD_NdeI_For: 5'-TTACATATGGATAACCAAAAAGCCSTT.

Используемые гены и праймеры были произведены коммерчески (Evrogen, Россия). Аминокислотная последовательность STD-His₆ состоя-

ла из С-концевой избыточности HlyII, тромбинового сайта, шести остатков гистидина и линкера. Экспрессию STD-His₆ *E. coli* BL21 (DE3) индуци-

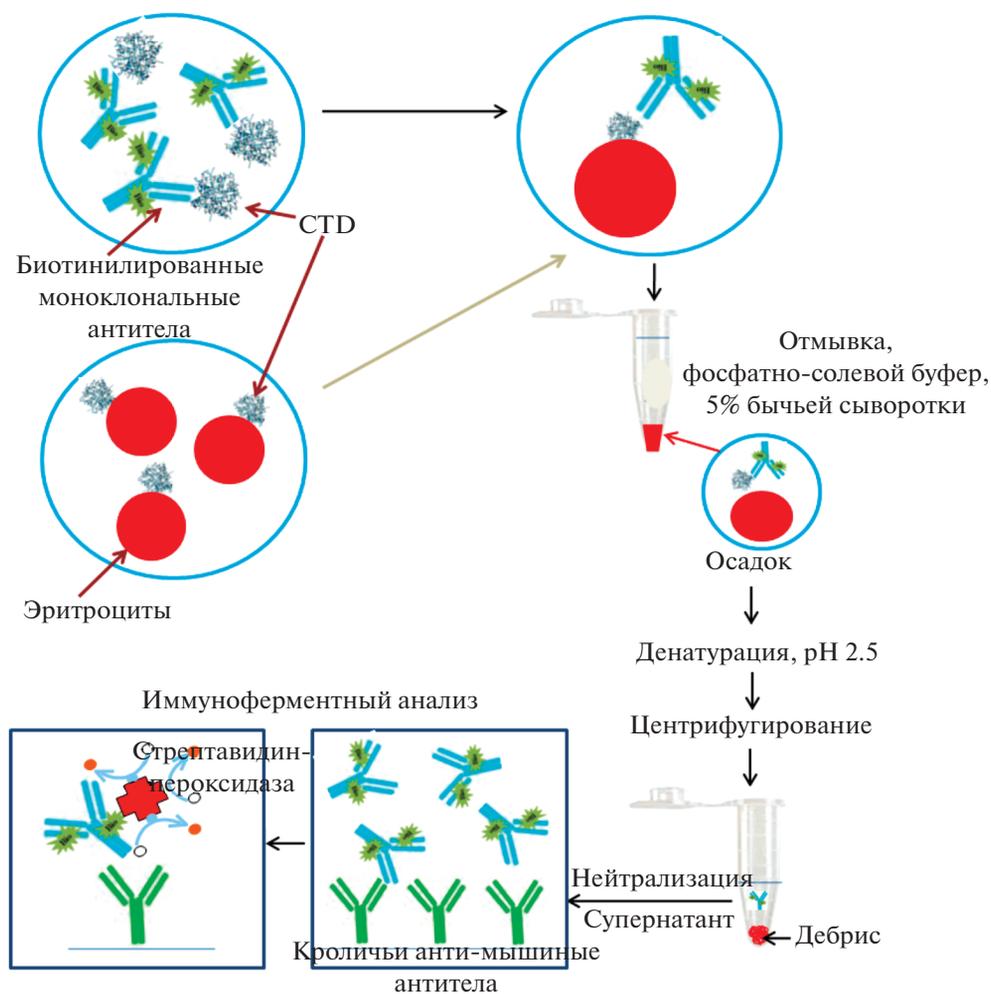


Рис. 2. Взаимодействие СТД с кроличьими эритроцитами, тИФА. Схема эксперимента.

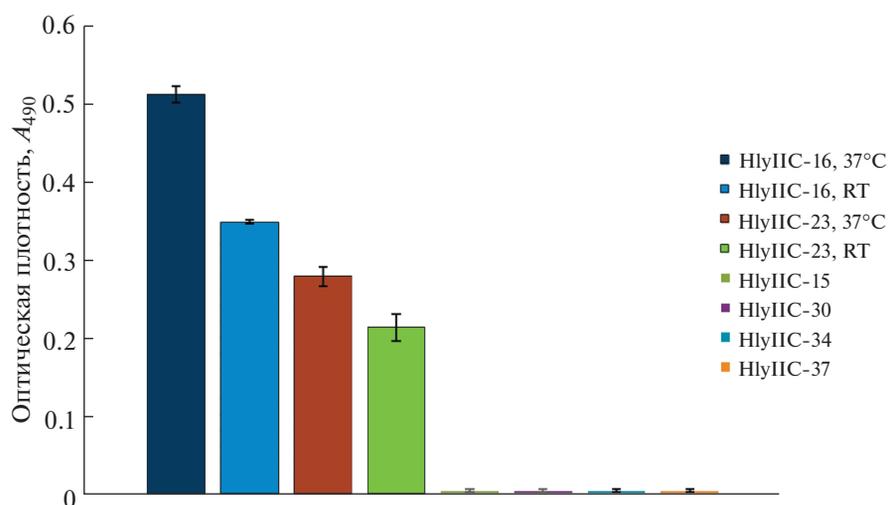


Рис. 3. Относительное содержание биотинилированных МА против СТД в лизатах эритроцитов после взаимодействия иммунных комплексов СТД-МА с мембранами эритроцитов. Результаты представлены за вычетом фоновых значений в присутствии биотинилированных нормальных иммуноглобулинов мыши.

ровали при достижении культурой оптической плотности при 600 нм 0.5–0.6, добавляя изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид до конечной концентрации 1 мМ при 37°C. Далее проводили культивирование с аэрацией в течение 3 часов. Очистку СТД проводили согласно [14]. Концентрации белков определяли согласно [15].

Непрямой твердофазный иммуноферментный анализ. Антиген СТД сорбировали в течение ночи при 4°C из концентрации 1 мкг/мл в 0.05 М карбонатном буфере (рН 9.6) на поверхность лунки планшетов для ИФА (Costar, США). Перед нанесением образцов свободные центры связывания пластика блокировали 30 мин 1% (w/v) раствором желатина в PBST, инкубацию антител с антигеном проводили 1 ч при 37°C. Добавляли конъюгат антител козла против иммуноглобулинов мыши с пероксидазой хрена в PBST, в разведении согласно инструкции производителя. После каждой стадии планшеты отмывали PBST не менее 6 раз. В качестве субстрата пероксидазы использовали 4 мМ раствор орто-фенилендиамина (Sigma, США) в цитрат-фосфатном буфере (26 мМ лимонная кислота, 50 мМ Na₂HPO₄, рН 5.0), содержащем 0.003% (v/v) H₂O₂. После развития окраски реакцию останавливали добавлением равного объема 10% (v/v) серной кислоты и определяли оптическое поглощение при 490 нм с помощью фотометра iMark для микропланшетов, BioRad. Значение оптического поглощения в лунках без добавления специфических антител, соответствующее неспецифическому связыванию конъюгата с иммобилизованным антигеном (отрицательный контроль) вычитали из оптического поглощения в экспериментальной лунке.

Получение моноклональных антител к СТД. 4 группы по 5 мышей линии BALB/c иммунизировали интраперитонеально. Первую иммунизацию проводили в полном адьюванте Фрейнда (Sigma, США), последующие – в неполном адьюванте, интервал между инъекциями составлял 2 недели. Дозы инъекции составляли: в первой группе 15 мкг/одно животное, во второй – 45, в третьей – 95, в четвертой – 45 с предварительной обработкой антигена 0.25% глутаровым альдегидом. Гибридизацию спленоцитов мыши и миеломы SP2/0 проводили с помощью полиэтиленгликоля по методу Келлера и Мильштейна [13].

Наработка и выделение моноклональных антител. МА выделяли аффинной хроматографией на белок А сефарозе [16] из культуральных жидкостей гибридом, секретирующих МА.

Изотипирование антител. Определение типов тяжелой и легкой цепи иммуноглобулинов проводили методом тИФА с помощью набора для изотипирования иммуноглобулинов мыши “Rapid ELISA mouse mAb Isotyping Kit” (Thermo scientific, США) согласно инструкции производителя.

Конъюгирование антител с биотином. Антитела биотинилировали, используя раствор N-гидроксисукцинимидного эфира биотина (Sigma, США) в диметилсульфоксиде с концентрацией 1 мг/мл. Эфир биотина добавляли с 20 кратным молярным избытком. Смесь инкубировали 4 часа при комнатной температуре. Для удаления непрореагировавшего реагента смесь диализовали против PBS в течение ночи. Определение активности биотинилированных МА проводили методом непрямого тИФА по взаимодействию с иммобилизованным на пластик антигеном. Реакцию проявляли стрептавидином, конъюгированным с пероксидазой хрена в разведении согласно инструкции производителя. Для визуализации реакции также использовали орто-фенилендиамина.

Иммуноблоттинг. Электрофоретическое разделение белков проводили в 12% полиакриламидном геле в присутствии β -меркаптоэтанола и SDS по методу Лэммли [17] в камере типа Bio-Rad MiniProtean Tetra System (Bio-Rad, США). В качестве маркеров молекулярной массы использовали “Prism Ultra Protein Ladder” (3.5–245 кДа). Электрофорез в концентрирующем геле проводили при силе тока 20 мА, в разделяющем – 100 мА. Для получения иммуноэлектрофореграммы содержимое геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану Hybond ECL RPN 203D (GE Healthcare, Швеция).

Взаимодействие СТД с эритроцитами, тИФА. СТД инкубировали в концентрации 0.4 мкМ с 0.13 мкМ каждого из биотинилированных МА и биотинилированных не иммунных IgG мыши в присутствии 5% бычьей сыворотки, в PBS. Инкубацию проводили либо в течение двух часов при комнатной температуре, либо 1 час при 37°C. К реакционным смесям добавляли эритроциты до концентрации 1% (v/v), инкубировали 1 час либо при 37°C, либо при комнатной температуре. Далее эритроциты трижды отмывали PBS, содержащим 5% бычьей сыворотки, центрифугуя 2500 об./мин в течение 4 минут. Осадки эритроцитов лизировали 100 мкл 0.1 М Gly HCl, рН 2.5 в течение 5 минут при перемешивании, затем центрифугировали 10000 об./мин в течение 5 мин. Супернатанты отбирали и нейтрализовали 7.5 мкл 1 М Трис-HCl, рН 8.0. рН контролировали универсальной индикаторной бумагой, в каждый из них вносили Tween 20 до концентрации 0.1%. Супернатанты вносили в лунки планшета для ИФА с предварительно иммобилизованными антителами кролика против иммуноглобулинов мыши из концентрации 8 мкг/мл. Далее реакцию проводили также как и тИФА. Связавшиеся антитела выявляли добавлением стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена, в разведении согласно инструкции производителя.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 19-04-00592.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе были соблюдены международные принципы ухода и использования животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baida G., Budarina Z. I., Kuzmin N.P., Solonin A.S. // FEMS Microbiol. Lett. 1999. V. 180. P. 7–14.
2. Andreeva Z.I., Nesterenko V.F., Yurkov I.S., Budarina Z.I., Sineva E.V., Solonin A.S. // Protein Expr. Purif. 2006. V. 47. P. 186–193.
3. Andreeva Z.I., Nesterenko V.F., Fomkina M.G., Ternovsky V.I., Suzina N.E., Bakulina A.Y., Solonin A.S., Sineva E.V. // Biochim. Biophys. Acta. 2007. V. 1768. P. 253–263.
4. Холодков О.А., Бударина Ж., Ковалевская Ж.И., Суинов А.В., Солонин А.С. // Прикл. биохим. и микробиол. 2015. Т. 51. С. 258–267.
5. Sineva E.V., Andreeva-Kovalevskaya Z.I., Shadrin A.M., Gerasimov Y.L., Ternovsky V.I., Teplova V.V., Yurkova T.V., Solonin A.S. // FEMS Microbiol. Lett. 2009. V. 299. P. 110–119.
6. Kataev A.A., Andreeva-Kovalevskaya Z.I., Solonin A.S., Ternovsky V.I. // Biochim. Biophys. Acta. 2012. V. 1818. P. 1235–1241.
7. Miles G., Bayley H., Cheley S. // Protein Sci. 2002. V. 11. P. 1813–1824.
8. Johnson S.L., Daligault H.E., Davenport K.W., Jaissle J., Frey K.G., Ladner J.T., Broomall S.M., Bishop-Lilly K.A., Bruce D.C., Gibbons H.S., Coyne S.R., Lo C.-C., Meincke L., Munk A.C., Koroleva G.I., Rosenzweig C.N., Palacios G.F., Redden C.L., Minogue T.D., Chain P.S. // Genome Announc. 2015. V. 3. P. e00151-15.
9. Kaplan A.R., Kaus K., De S., Olson R., Alexandrescu A.T. // Sci. Rep. 2017. V. 7. P. 3277.
10. Kaus K., Lary J.W., Cole J.L., Olson R. // J. Mol. Biol. 2014. V. 426. P. 2800–2812.
11. Levan S., De S., Olson R. // J. Mol. Biol. 2013. V. 425. P. 944–957.
12. Olson R., Gouaux E. // J. Mol. Biol. 2005. V. 350. P. 997–1016.
13. Köhler G., Milstein C. // Nature. 1975. V. 256. P. 495–497.
14. Kaplan A.R., Maciejewski M.W., Olson R., Alexandrescu A.T. // Biomol. NMR Assign. 2014. V. 8. P. 419–423.
15. Bradford M.M. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.
16. Mole S.E., Lane D.P. in DNA Cloning, V. III. A Practical Approach / Ed. Glover D.M. 1989. P. 197–198.
17. Laemmly U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.

C-Terminal Domain of *Bacillus cereus* HlyII Is Able to Interact with Erythrocytes

N. V. Rudenko*, ***, #, A. P. Karatovskaya*, A. V. Zamyatina*, ***, A. V. Siunov**,
Zh. I. Andreeva-Kovalevskaya**, A. S. Nagel**, F. A. Brovko*, ***, and A. S. Solonin**

Phone: +7 (926) 592-11-89; e-mail: nrudkova@mail.ru

*Pushchino Branch, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
prospekt Nauki 6, Pushchino, Moscow, 142290 Russia

**G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, FSBI FRC Pushchino Scientific
Centre of Biological Research, Russian Academy of Sciences, prospekt Nauki 5, Pushchino, Moscow, 142290 Russia

***Pushchino State Institute of Natural Sciences, prospekt Nauki 3, Pushchino, Moscow, 142290 Russia

Hemolysin II (HlyII) is one of the pathogenic factors of *Bacillus cereus*. With respect to the prototype of β -barrel toxins, the α -toxin of *S. aureus*, this pore-forming protein has a C-terminal domain (CTD) of 94 amino acids. The role of CTD in membrane pore formation and cell lysis is not clear, although removal of this portion of the protein is known to significantly reduce hemolytic activity. A representative panel of monoclonal antibodies against recombinant CTD recognizing full-length HlyII was obtained. Using the obtained monoclonal antibodies, CTD was shown to bind to rabbit red blood cells.

Keywords: bacterial cytolysins, domain structure, monoclonal antibodies, pore-forming toxins