



УДК 602.68;577.112.083

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА С-КОНЦЕВОГО ДОМЕНА ГЕМОЛИЗИНА II *Bacillus cereus* СТАБИЛИЗИРУЕТСЯ В СОСТАВЕ ПОЛНОРАЗМЕРНОГО ТОКСИНА

© 2025 г. Н. В. Руденко^{*,#}, Б. С. Мельник^{*,**}, А. П. Каратовская^{*}, А. С. Нагель^{***}, Ж. И. Андреева-Ковалевская^{***}, А. В. Замятина^{*}, О. С. Ветрова^{*}, А. В. Сиунов^{***}, Ф. А. Бровко^{*}, А. С. Солонин^{***}

^{*} Филиал ФГБУН ГНЦ “Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН, Россия, 142290 Пушкино, просп. Науки, 6

^{**} ФГБУН “Институт белка” РАН (ИБ РАН), Россия, 142290 Пушкино, просп. Науки, 4

^{***} Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН (ИБФМ РАН)
“ФИЦ “Пушкинский научный центр биологических исследований” РАН,
Россия, 142290 Пушкино, просп. Науки, 5

Поступила в редакцию 07.03.2025 г.

После доработки 27.03.2025 г.

Принята к публикации 29.03.2025 г.

Гемолизин II (HlyII) – один из ключевых патогенных факторов *Bacillus cereus*, порообразующий токсин с пространственной структурой типа β-баррель, обладающий С-концевым удлинением из 94 а.о., обозначаемый как С-концевой домен HlyII (HlyIICTD). В данной работе проведен сайт-направленный мутагенез аминокислотных остатков, лежащих на поверхности белковой глобулы HlyIICTD. Методом иммуноферментного анализа показано, что моноклональные антитела HlyIC-16 и HlyIC-23, полученные против HlyIICTD, взаимодействовали с интактным HlyIICTD гораздо эффективнее, чем с полноразмерным токсином и химерным белком – HlyIICTD, слитым с SlyD. Антитела HlyIC-16 и HlyIC-23 эффективно ингибировали взаимодействие друг друга с иммобилизованным HlyIICTD в иммуноферментном анализе, что свидетельствовало о близости их эпитопов на поверхности молекулы HlyIICTD. Для определения эпитопов HlyIC-16 и HlyIC-23 использовали фаговый дисплей, сайт-направленный мутагенез и клонирование генов отдельных частей молекулы HlyIICTD. Пространственное моделирование HlyIICTD, слитого с SlyD, с использованием программы AlphaFold позволило предположить расположение эпитопов HlyIC-16 и HlyIC-23 на участке Gly341–Gly364 белка HlyII. Продемонстрировано, что С-концевой домен может одновременно находиться в нескольких структурных состояниях (изоформах). В составе водорастворимой формы мономера полноразмерного токсина наблюдается переход пространственной структуры HlyIICTD в стабильную форму.

Ключевые слова: гемолизин II *Bacillus cereus*, пространственная структура белка, эпитоп, моноклональное антитело, фаговый дисплей, сайт-направленный мутагенез

DOI: 10.7868/S1998286025060057

Сокращения: EC₅₀ – полумаксимальная эффективная концентрация препарата; HlyII – гемолизин II *Bacillus cereus*; HlyIICTD – С-концевой домен гемолизина II *B. cereus*; IC₅₀ – концентрация ингибитора, при которой ответ (или связывание) уменьшается в 2 раза; mAb – моноклональное антитело; SlyD – цитозольный шаперон D *Escherichia coli*, чувствительный к лизису.

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

ВВЕДЕНИЕ

Bacillus cereus – оппортунистская грамположительная спорообразующая бактерия [1], одним из ключевых вирулентных факторов которой выступает гемолизин II (HlyII), принадлежащий к группе β -пороформирующих токсинов [2]. HlyII секретируется бактерией в виде водорастворимых мономеров и олигомеризуется в присутствии мембран клеток-мишеней, образуя трансмембранную пору, что приводит к гибели клетки, обеспечивая бактериям доступ к питательным веществам. HlyII содержит C-концевой домен (HlyIICTD), который состоит из 94 а.о. [3]. Части этого домена, по-видимому, подвижны [4] и способны существовать в разных трехмерных структурах в зависимости от условий или окружения. Биоинформатические методы [5, 6] позволяют предположить, что домен HlyIICTD содержит внутренние неупорядоченные области, хотя в его структуре, определенной методом ЯМР, все элементы структурированы и упорядочены [7, 8]. Такое отличие теоретических и экспериментальных данных указывает на потенциальную возможность HlyIICTD менять свою структуру в разных условиях или находиться в различных изоформах [9].

В данной статье предпринята попытка исследовать структурные особенности HlyIICTD с помощью специфических моноклональных антител (mAbs), в частности изучить взаимодействие этих антител с HlyIICTD в его различных конформационных состояниях. Сочетание внутреннего беспорядка и трехмерной организации белка, по всей видимости, позволяет структурно адаптироваться к разным состояниям, обеспечивающим основные процессы поробразования, в том числе действовать как часть полноразмерного токсина при сближении в пространстве HlyIICTD с коровой частью HlyII. Любые переходные структуры стабилизируются в комплексе с белковыми партнерами [10].

Существенную роль в лабильности белков играют присутствующие в его составе пролиновые остатки, т.к. они могут давать *цис*- и *транс*-изоформы, а следовательно, белок при их наличии может существовать в нескольких изоформах. Изменение пространственной структуры происходит за счет жесткой конформации пролина, изгибающего пептидную цепь [11, 12]. При изо-

меризации пролиновые остатки влияют на изменение пространственной структуры белка [13], что, в свою очередь, влияет на способность антител взаимодействовать с антигеном [14]. Существование изоформ может усиливать вирулентность патогенов [15, 16]. Кроме того, большая гибкость полипептидных цепей в гидрофобных доменах обеспечивается довольно протяженными петлями, соединяющими элементы вторичной структуры [17].

Ранее авторами описано получение панели mAbs против HlyIICTD *B. cereus* [18], а также проведен сайт-направленный мутагенез аминокислотных остатков, расположенных на поверхности пространственной структуры HlyIICTD (6d5z) [4], который приводил к изменениям эпитопной структуры, что подтверждало высокую конформационную подвижность HlyIICTD, необходимую для функционирования HlyII.

Цель данной работы – исследование лабильности пространственной структуры C-концевого домена в составе полноразмерного токсина (HlyII), секретируемого *B. cereus*, с помощью моноклональных антител против HlyIICTD [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основные характеристики mAbs HlyIIС-16 и HlyIIС-23. С использованием mAbs HlyIIС-16 и HlyIIС-23 против C-концевого домена гемолизина II *B. cereus* было показано, что HlyIICTD способен ориентированно связываться с мембранами эритроцитов. Участки HlyIICTD, включающие эпитопы этих антител, не участвуют во взаимодействии с эритроцитами [18]. HlyIIС-16 и HlyIIС-23 взаимодействуют с C-концевым доменом, а не с линкерным пептидом, тромбиновым сайтом или 6-His. Иммуноблоттинг и иммуноферментный анализ (ИФА) показали, что эти антитела эффективно взаимодействуют с HlyIICTD и не способны взаимодействовать с рекомбинантным HlyII Δ CTD, который не содержит C-концевого домена, но имеет линкерный пептид, сайт распознавания и расщепления тромбином, аналогичный рекомбинантному HlyIICTD, и блок из 6 гистидиновых остатков, расположенных на C-конце анализируемого домена. Эксперименты проводили, как описано в работе [19].

Методом конкурентного ИФА показано, что присутствие в реакционной смеси немеченых

HlyIC-20 не препятствовало биотинилированным HlyIC-16 (HlyIC-16био) (рис. 1а) и HlyIC-23 (HlyIC-23био) (рис. 1б) взаимодействовать с иммобилизованным на планшеты для ИФА HlyICTD, т.е. антитела не конкурировали при связывании с антигеном. Следовательно, эпитопы этих антител не перекрываются на поверхности HlyICTD. Антитела HlyIC-16 и HlyIC-23 эффективно ингибировали взаимодействие друг друга с иммобилизованным HlyICTD в ИФА (рис. 1), что свидетельствовало о близости расположения их эпитопов на молекуле HlyICTD.

Фаговый дисплей. Особенности взаимодействия антител HlyIC-16 и HlyIC-23 с HlyICTD и полноразмерным токсином, а также их взаимодействие с HlyICTD, связанным с поверхностью

эритроцитов, поставили задачу идентификации эпитопа, распознаваемого этими антителами. Антигенную детерминанту HlyICTD, распознаваемую антителами HlyIC-16 и HlyIC-23, определяли методом пептидного фагового дисплея. С помощью программы GeneRunner были проанализированы полученные нуклеотидные последовательности и определены аминокислотные последовательности пептидов, распознаваемых антителами HlyIC-16 и HlyIC-23, экспонируемые в белке рIII бактериофагов (рис. 2а, 2в). На рис. 2 показано выравнивание аминокислотных последовательностей пептидов с помощью алгоритма T-Coffee [20]. Наиболее часто во всех пептидах встречаются аминокислотные остатки аспарагина, глутамина, пролина (N, Q, P) и ароматические –

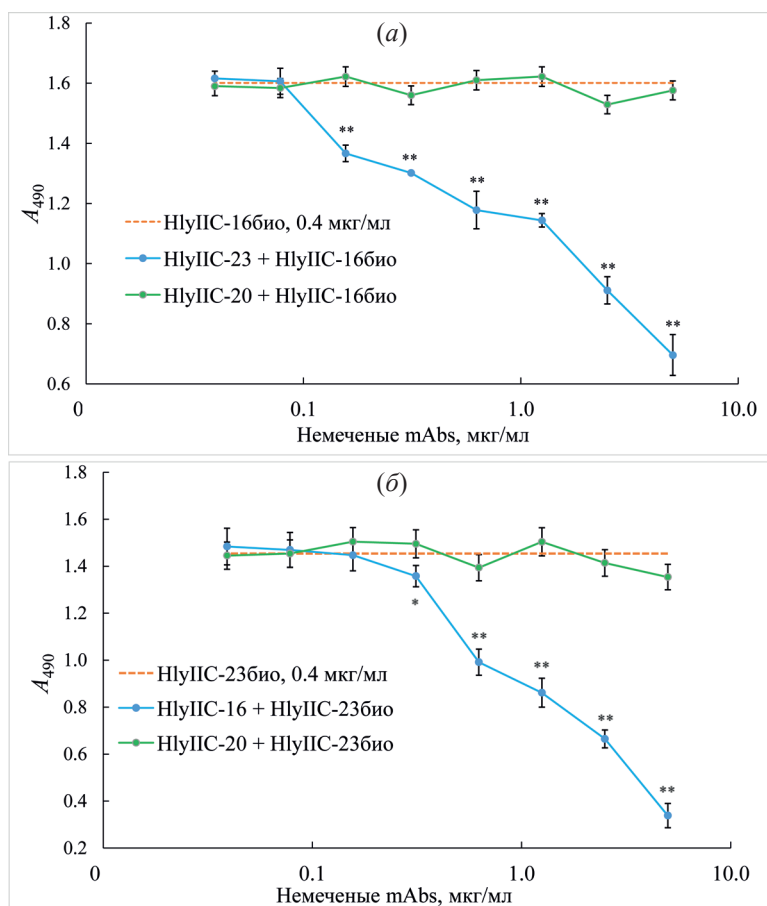


Рис. 1. Ингибирование (в ИФА) взаимодействия иммобилизованного HlyICTD с mAbs HlyIC-16 и HlyIC-23 друг другом и HlyIC-20. (а) – Ингибирование взаимодействия HlyIC-16био немечеными HlyIC-23 и HlyIC-20; (б) – ингибирование взаимодействия HlyIC-23био немечеными HlyIC-16 и HlyIC-20. Реакцию визуализировали с помощью стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой. Данные представлены как Mean \pm SD, $n = 3$. При ингибировании взаимодействия HlyIC-16био с HlyICTD mAbs HlyIC-23 значение IC_{50} составило 1.712 мкг/мл; при ингибировании взаимодействия HlyIC-23био с HlyICTD mAbs HlyIC-16 значение IC_{50} составило 1.617 мкг/мл. * $p < 0.03$; ** $p < 0.001$, ANOVA.

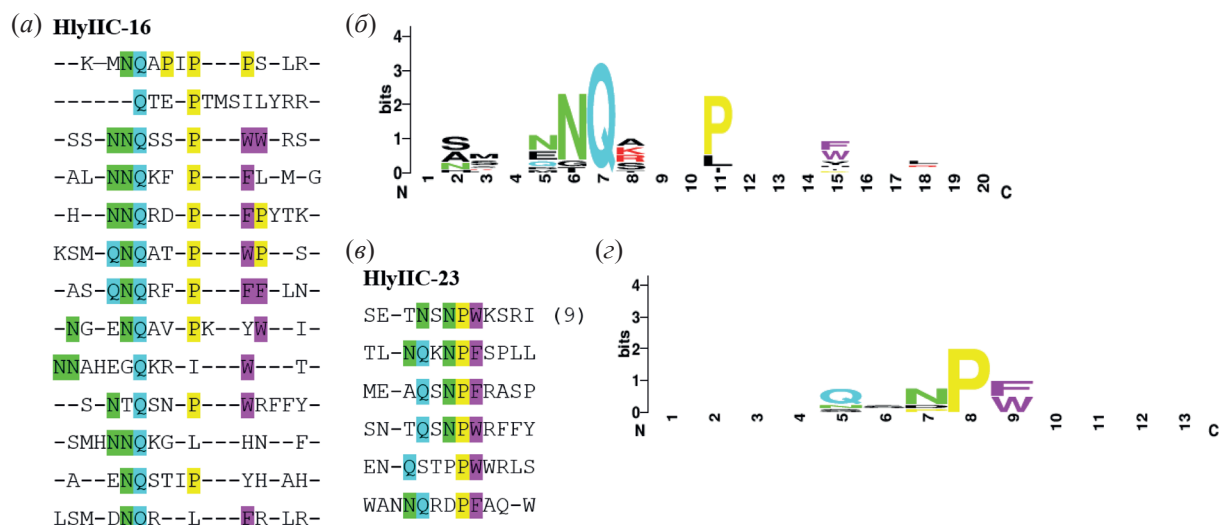


Рис. 2. Выравнивание аминокислотных последовательностей пептидов, определенных с помощью фагового дисплея для mAbs HlyIC-16 (а) и HlyIC-23 (в), и консенсусной последовательности для mAbs HlyIC-16 (б) и HlyIC-23 (г), рассчитанной с помощью программы WebLogo [21]. Фиолетовым цветом выделены остатки ароматических аминокислот, красным – положительно заряженных, зеленым – аспарагина, голубым – глутамина, желтым – пролина.

фенилаланин или триптофан (F или W). Обнаружено, что пептид SETNSNPWKSRI при анализе HlyIC-23 повторяется 9 раз (рис. 2в), однако в составе HlyICTD не выявлено идентичной аминокислотной последовательности. Поэтому при построении консенсуса учитывали все пептиды, взаимодействующие с моноклональными антителами. На рис. 2б и 2г показан консенсус аминокислот пептидов, рассчитанный программой WebLogo [21] на основе ранее выровненных пептидных последовательностей, который указывает, что N, Q, P, W или F – аминокислоты, которые с наибольшей вероятностью образуют эпитоп, а также положительно заряженная аминокислота лизин (K), т.к. аминокислотная последовательность С-концевого домена не содержит аргининов (R). Мы полагаем, что эпитопы пространственные, т.е. на поверхности белка, в трехмерной структуре С-концевого домена, аминокислоты, находящиеся на разных участках полипептидной цепи, могут быть объединены таким образом, что образуют эпитопы, распознаваемые mAbs HlyIC-16 и HlyIC-23. Фаговый дисплей не позволил выявить эпитопы mAbs HlyIC-16 и HlyIC-23, но определил аминокислотные остатки, ответственные за взаимодействие этих антител с HlyICTD, что послужило основой для проведения сайт-направленного мутагенеза.

Сайт-направленный мутагенез. На основе трехмерной структуры (PDB: 6d5z), определенной с помощью ЯМР [7], с учетом данных фагового дисплея были созданы мутантные формы HlyICTD и изучено их связывание с mAbs HlyIC-16 и HlyIC-23 с помощью ИФА. Мутации описаны в работе [4]. Ранее Kaplan et al. [22] продемонстрировали влияние P405 на пространственную структуру HlyICTD. Введение замены P405M позволило снизить количество изоформ HlyICTD, узнаваемых антителами. Было исследовано взаимодействие мутантных форм HlyICTD, содержащих как одиночные, так и множественные аминокислотные замены с mAbs. Множественные замены включали аминокислотные остатки, расположенные на поверхности HlyICTD близко друг к другу (рис. 3).

Множественные замены (одновременно заменены два, три или четыре аминокислотных остатка) вводили, предполагая, что введение одиночной замены аминокислотного остатка может незначительно сказаться на взаимодействии с антителом. Результаты анализа взаимодействия mAbs HlyIC-16 и HlyIC-23 с мутантными формами представлены на рис. 3. HlyICTD P405M N339A K340A – единственная мутантная форма, эффективность взаимодействия которой с mAbs HlyIC-16 и HlyIC-23 была ниже в сравнении с интактным HlyICTD. При этом по отдельности за-

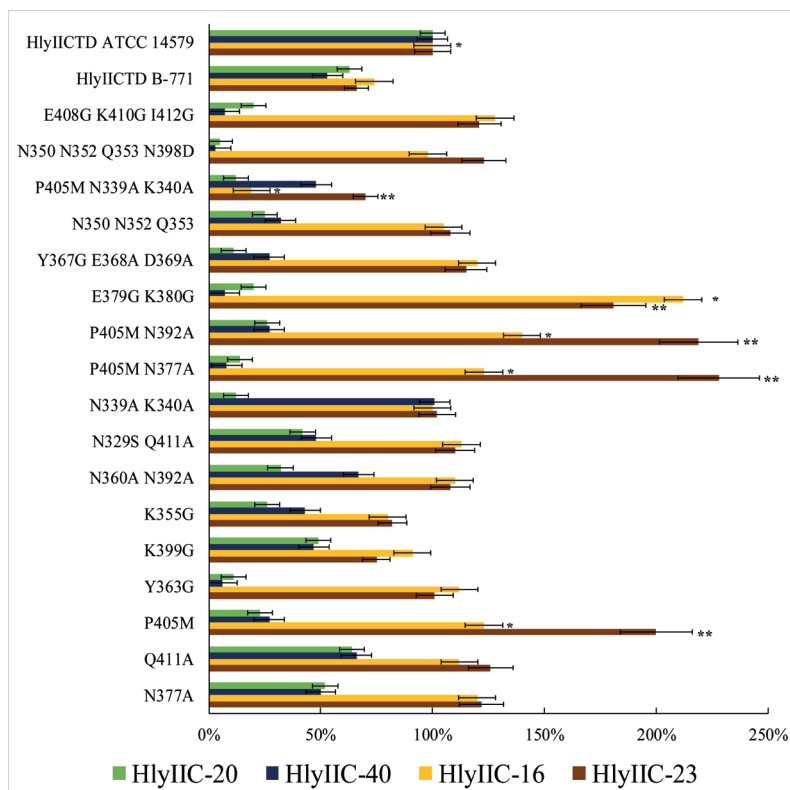


Рис. 3. Сравнение взаимодействия HlyIIC-16, HlyIIC-23, HlyIIC-20 и HlyIIC-40 с иммобилизованным HlyICTD и его мутантными формами в ИФА. Данные представлены как Mean \pm SD, $n = 3$. * Статистически значимые различия в сравнении с контролем (HlyICTD ATCC 14579) для HlyIIC-16 ($p < 0.05$, тест Манна–Уитни); ** статистически значимые различия в сравнении с контролем (HlyICTD ATCC 14579) для HlyIIC-23 ($p < 0.05$, тест Манна–Уитни).

мена P405M и двойная замена N339A, K340A не уменьшали уровень взаимодействия, что свидетельствовало о неаддитивном влиянии аминокислотных замен на эффективность связывания с антигеном. Двойная замена E379G, K380G усиливала связывание как HlyIIC-16, так и HlyIIC-23. Формы, содержащие мутации по пролину 405: P405M, P405M, N377A, P405M, N392A – преимущественно усиливали взаимодействие антитела HlyIIC-23 с HlyICTD. Полученные результаты влияния мутаций на взаимодействие антител с антигеном можно объяснить их влиянием на пространственную структуру всего домена. Замена пролина P405M приводила к увеличению доступности эпитопа антител HlyIIC-16 и HlyIIC-23. На рис. 4 показано, что замененные аминокислоты расположены на разных сторонах HlyICTD. По-видимому, эти аминокислоты критичны для всей пространственной структуры С-концевого фрагмента.

Данные, полученные с применением мутантных форм HlyICTD, показали лабильность про-

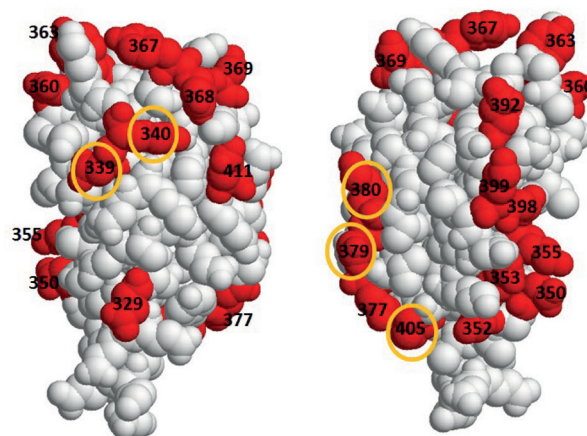


Рис. 4. Локализация аминокислотных замен на поверхности HlyICTD (PDB ID: 6D5Z). Желтыми кругами выделены замены, критичные для конформационных эпитопов mAbs HlyIIC-16 и HlyIIC-23.

странственной структуры домена, что согласуется с предполагаемыми конформационными изменениями, возникающими при функционировании токсина, которое включает различные стадии, такие как олигомеризация и формирование поры на

мембране клетки-мишени. Пр продемонстрирована неаддитивность влияния аминокислотных замен на взаимодействие с антителами, т.е. различное влияние одиночных и суммарных замен на пространственную структуру HlyICTD. Возможные изменения структуры белка при введении мутаций в том случае, когда они влияют на конформационные изменения в белке, схематично представлены на рис. 5. Если представить, что одна из мутаций приводит к повороту части белковой структуры, не влияя на доступность эпитопа, а другая к сдвигу этой части структуры, увеличивая доступность эпитопа, то вполне вероятно, что в сумме эти аминокислотные замены приведут к уменьшению доступности эпитопа.

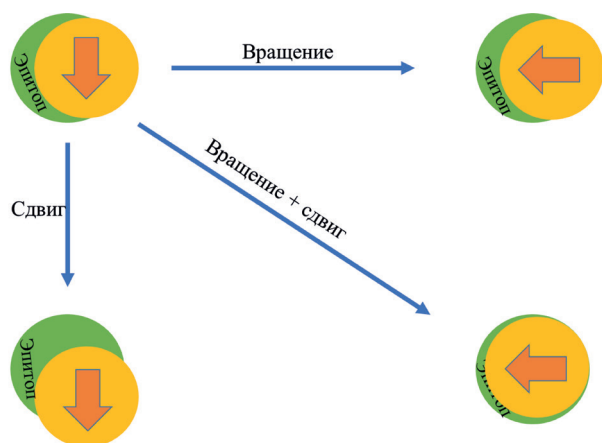


Рис. 5. Схематичное изображение возможных изменений трехмерной структуры при мутагенезе. Желтым и зеленым кругами показаны условные части белка.

Биоинформатический анализ также подтверждает лабильность пространственной структуры HlyICTD. На рис. 6 для разных участков аминокислотной последовательности HlyICTD показана вероятность быть внутренне неупорядоченными (лабильными) [5, 6]. N-концевую часть HlyICTD (320–360 а.о.) программы предсказывают как внутренне неупорядоченную. При этом по данным ЯМР [22] весь HlyICTD структурирован. Структура HlyICTD, определенная с помощью ЯМР, представляет собой псевдобаррель, состоящий из двух α -спиралей, окруженных пятью β -листами. Такое расхождение данных свидетельствует о возможной подвижности N-концевой части HlyICTD. Интерпретация результатов расчета программы PONDR вполне оправдана,

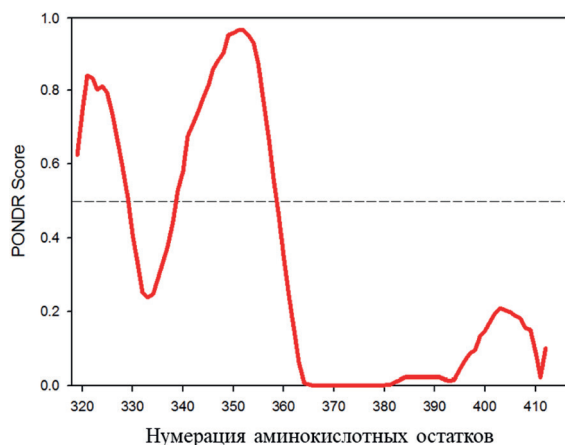


Рис. 6. Вероятность аминокислотных остатков HlyICTD быть внутренне неупорядоченными (подвижными или дестабилизированными) [5, 6, 23]. Нумерация аминокислотных остатков соответствует полноразмерному токсину. Аминокислотные остатки, для которых предсказывается значение PONDR score > 0.5, считаются либо неупорядоченными, либо дестабилизированными.

поскольку основывается на экспериментальных исследованиях разных глобулярных белков [9].

Взаимодействие mAbs HlyIC-16 и HlyIC-23 с полноразмерным HlyII. Антитела HlyIC-16 и HlyIC-23 окрашивали полноразмерный HlyII в иммуноблоттинге [18], но в ИФА они взаимодействовали с иммобилизованным полноразмерным HlyII значительно меньше, чем с HlyICTD. На рис. 7 показаны кривые титрования антител, характеризующие данные взаимодействия. Полученные результаты свидетельствуют о недоступности эпитопов, узнаваемых этими антителами, на поверхности полноразмерного токсина, что предполагает их расположение в точке сближения C-концевого домена и коровой части токсина, при котором эпитопы экранированы.

Антитела HlyIC-16 и HlyIC-23 распознают HlyICTD, связанный с поверхностью эритроцитов [18]. По-видимому, область поверхности HlyICTD, узнаваемая этими антителами, не участвует во взаимодействии с мембраной клетки-мишени, в структуре полноразмерного токсина этот участок сближен с коровой частью. В работе Kaplan et al. [7] предполагалось сближение коровой части и HlyICTD в полноразмерной молекуле HlyII, что в данной работе экспериментально подтверждено анализом взаимодействия mAbs HlyIC-16 и HlyIC-23 с полноразмерным токсином (рис. 7); мономерная форма HlyII действительно существ-

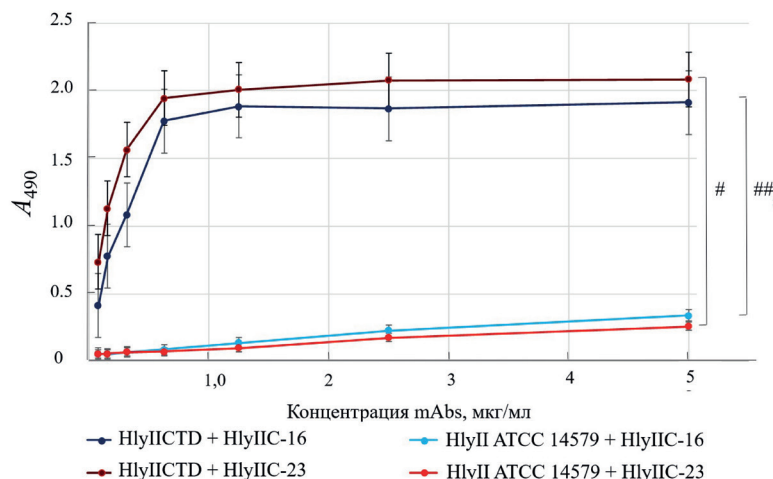


Рис. 7. Взаимодействие mAbs HlyIC-16 и HlyIC-23 с иммобилизованными HlyICTD и HlyII ATCC 14579. Данные представлены как Mean \pm SD, $n = 5$. При взаимодействии HlyIC-16 с HlyICTD значение EC_{50} составило 0.3043 мкг/мл; при взаимодействии HlyIC-23 с HlyICTD значение EC_{50} составило 0.2053 мкг/мл. # Статистически значимые различия для HlyIC-23 ($p < 0.05$, тест Манна–Уитни); ## статистически значимые различия для HlyIC-16 ($p < 0.05$, тест Манна–Уитни).

вует в форме, в которой HlyICTD и коровая часть взаимодействуют друг с другом. Kaplan et al. [7] использовали математическое моделирование для прогнозирования взаимодействий специфических аминокислотных остатков при сближении отдельных доменов, составляющих полноразмерную молекулу. По мнению этих авторов, пространственная структура поддерживается гидрофобными взаимодействиями между ароматическими аминокислотными остатками.

Взаимодействие mAbs с участками HlyICTD в составе гибридов со SlyD. Зависимость стабилизации структуры HlyICTD от присутствия этого домена в составе белковых комплексов, как в случае полноразмерного токсина, была подтверждена созданием генно-инженерных конструкций, кодирующих фрагменты, соответствующие половинам аминокислотной последовательности HlyICTD, слитыми со SlyD. Белок-шаперон использовали для повышения вероятности правильного сворачивания рекомбинантных продуктов [24]. Проверено связывание HlyIC-16 и HlyIC-23 с полученными рекомбинантными белками. HlyIC-16 и HlyIC-23 гораздо хуже взаимодействовали с рекомбинантным SlyD-HlyICTD, чем с интактным HlyICTD (рис. 8). При этом антитела гораздо лучше связывались с белком SlyD-HlyICTD, содержащим N-концевую половину последовательности HlyICTD (HlyII D319–G364),

чем с С-концевой половиной (HlyII G364–I412). При взаимодействии HlyICTD со SlyD эпитопы недоступны для HlyIC-16 и HlyIC-23. Отрезание С-концевой половины HlyICTD ослабило взаимодействие между SlyD и HlyICTD и привело к увеличению доступности эпитопов, что подтверждает предположение о том, что эпитопы антител HlyIC-16 и HlyIC-23 конформационно-зависимые. Эпитоп для антитела HlyIC-16 в составе рекомбинантных белков SlyD-HlyICTD и SlyD-HlyICTD (HlyII D319–G364) менее доступен для взаимодействия в ИФА, чем для антитела HlyIC-23 (рис. 8).

Снижение эффективности взаимодействия HlyIC-16 относительно HlyIC-23 при использовании в качестве антигена участка HlyII D319–G364 в слитом со SlyD состоянии может указывать на то, что эпитопы этих антител перекрываются не полностью (рис. 8), т.е. mAbs HlyIC-16 и HlyIC-23 имеют перекрывающийся участок связывания согласно результату, полученному конкурентным ИФА (рис. 1), но перекрываются не по всей площади антигенной детерминанты.

На рис. 9а и 9б представлены результаты моделирования структуры белков с использованием программы AlphaFold [25]. Согласно этим данным, наиболее вероятным представляется расположение эпитопов антител HlyIC-16 и HlyIC-23 на 2-й четверти полипептидной цепи HlyICTD

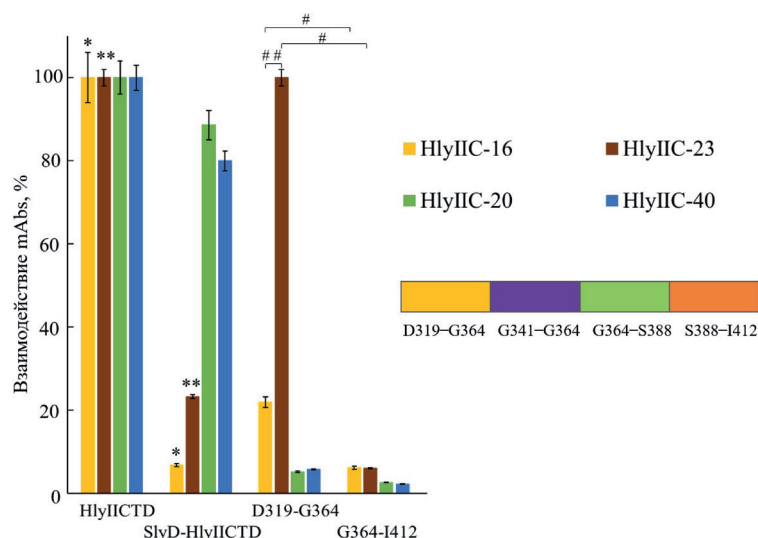


Рис. 8. Сравнение взаимодействия HlyIIC-16, HlyIIC-23, HlyIIC-20 и HlyIIC-40 с иммобилизованными HlyIICTD, SlyD-HlyIICTD, SlyD-HlyIICTD (HlyII D319–G364) и SlyD-HlyIICTD (HlyII G364–I412). Данные представлены как Mean \pm SD, $n = 5$. * Статистически значимые различия в сравнении с контролем (HlyIICTD) для HlyIIC-16 ($p < 0.05$, тест Манна–Уитни); ** статистически значимые различия в сравнении с контролем (HlyIICTD) для HlyIIC-23 ($p < 0.05$, тест Манна–Уитни); # статистически значимые различия при межгрупповом сравнении ($p < 0.05$, тест Манна–Уитни); ## статистически значимые различия при сравнении взаимодействия HlyIIC-16 и HlyIIC-23 с иммобилизованным SlyD-HlyIICTD (HlyII D319 – G364) ($p < 0.05$, тест Манна–Уитни).

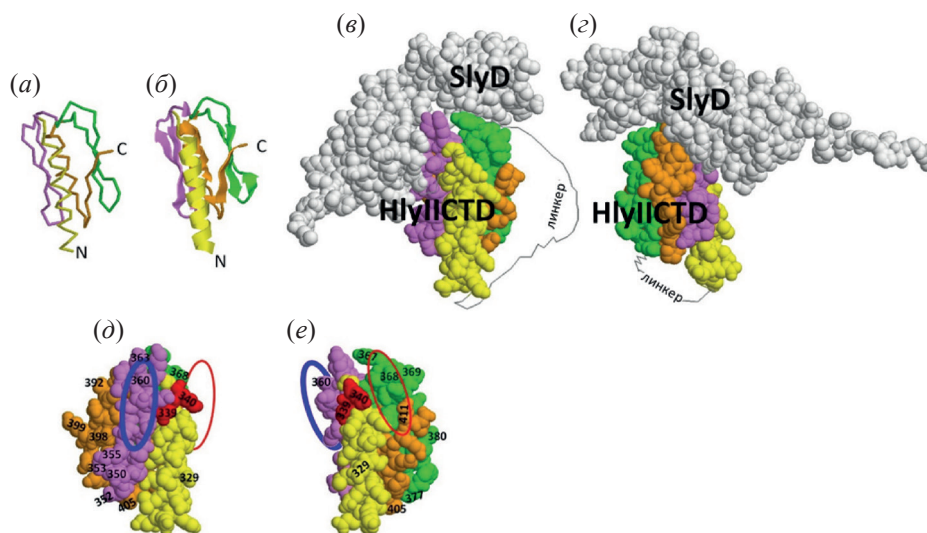


Рис. 9. Пространственные модели HlyIICTD (PDB ID: 6D5Z) (a, б, д, е). Компьютерное моделирование SlyD-HlyIICTD с помощью программы AlphaFold 3 [26, 27] (в, з).

(HlyII G341–G364, фиолетовый участок на рис. 9). На рис. 9д, 9е предполагаемые эпитопы антител обозначены фиолетовым овалом (K355–N360).

Ограничение взаимодействия mAbs HlyIIC-16 и HlyIIC-23 с полноразмерным HlyII и SlyD-HlyIICTD может быть также связано с экранизацией эпитопов коровой частью белка.

В работе [4] показано, что в конформационную детерминанту, узнаваемую mAb HlyIIC-20, входят

аминокислотные остатки N339 и K340. Несмотря на то что положение эпитопа для антител HlyIIC-16 и HlyIIC-23 определено довольно приблизительно, тем не менее полученные данные позволили уточнить расположение эпитопа для mAb HlyIIC-20. Поскольку антитела HlyIIC-16 и HlyIIC-23 не конкурируют с HlyIIC-20, то их эпитопы не должны перекрываться на поверхности белковой глобулы. Авторы полагают, что

эпитоп HlyIIС-20 расположен на стыке желтой α -спирали HlyIICTD (HlyII D319–G341) и зеленой β -шпильки HlyIICTD (HlyII G364–S388) (рис. 9) и, соответственно, затрагивает две области HlyII N339–G341 и Y367–K370. Красный овал на рис. 9d и 9e показывает, с какой стороны HlyIICTD, вероятнее всего, связывается антитело HlyIIС-20. Такое положение эпитопа (затрагивающее два разнесенных по цепи участка на HlyIICTD) подтверждается в случае замены аминокислотных остатков Y367G, E368A, D369A (на зеленой β -шпильке), которые снижают связывание антитела HlyIIС-20. При этом замены в С-концевом β -слое HlyIICTD (оранжевый цвет на рис. 9) потенциально способны влиять на взаимное расположение участков белка (обозначены желтым и зеленым цветом на рис. 9) и, соответственно, на формирование эпитопа, узнаваемого HlyIIС-20. На рис. 9 видно, что согласно структуре PDB: 6d5z, оранжевый С-концевой β -слой вклинивается между желтой α -спиралью и зеленой β -шпилькой. Изменения конформации или положения С-концевого β -слоя должны в значительной степени сказываться на взаимодействии HlyIIС-20 с антигеном и, следовательно, на структуре конформационного эпитопа. Результаты, представленные на рис. 3, подтверждают это заключение, все замены пролина 405 влияли на связывание антитела HlyIIС-20 с иммобилизованными мутантными формами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штаммы, плазмиды и ферменты. В работе использовали эндонуклеазы рестрикции KpnI, NdeI, BamHI и XhoI (Thermo Scientific, США), Т4-ДНК-лигазу (NEB, США), TaqSE-ДНК-полимеразу (SibEnzyme, Россия).

Сайт-направленный мутагенез HlyIICTD. Для получения мутантов в качестве матрицы использовали созданную ранее плазмиду pET29, содержащую последовательность *hlyIIctd* [18]. Мутанты *hlyIIctd* были получены с помощью ПЦР с перекрывающимися праймерами [28]. Все мутанты, кроме мутантной формы HlyIICTD E408G, K410G, I412G, были получены и описаны ранее в работе [4]. Для получения HlyIICTD E408G, K410G, I412G использовали праймеры CTD_NdeI_For 5'-TTACATATGGGATAACCAAA-AAGCCCTT-3' и EKI408G Rev 5'-TATTAGGT-ACCTCCCTGACCAATTCCGATATAAGGTCCTT-TAATG-3'. Для всех мутантов перекрывающаяся область праймеров содержала интересующую мутацию. Все плазмиды предварительно проверяли секвенированием перед трансформацией в экспрессирующий штамм *E. coli* BL21(DE3).

Получение фрагментов HlyIICTD, слитых с белком SlyD. Участки гена *hlyII*, кодирующие фрагменты HlyIICTD, амплифицировали с помощью праймеров, указанных в табл. 1. Продукты ПЦР клонировали с помощью векторной плазмиды pTSL [29] по сайтам рестрикции BamHI и

Таблица 1. Праймеры для клонирования участков HlyIICTD

Название фрагмента	Последовательность олигонуклеотидов (5'→3')
<i>hlyIIctd</i>	TTACATATGGGATCCGATAACCAAAAAGCCCTTG TAATACTCGAGTCAGATCTGTTTAATCTCGATA
<i>hlyII</i> (D319–G364)	TTACATATGGGATCCGATAACCAAAAAGCCCTTG TTAGGTACCCTCGAGTCAACCATAACCAGCATTGC
<i>hlyII</i> (G364–I412)	TTACATATGGGATCCGGTATCAGTTACGAAG TAATACTCGAGTCAGATCTGTTTAATCTCGATA
<i>hlyII</i> (D319–G341)	TTACATATGGGATCCGATAACCAAAAAGCCCTTG TTAGGTACCCTCGAGTCATCCTTTGTTAAGTTTATCATTC
<i>hlyII</i> (G341–G364)	TTACATATGGGATCCGAAAAGGGAAATTATCTC TTAGGTACCCTCGAGTCAACCATAACCAGCATTGC
<i>hlyII</i> (G364–S388)	TTACATATGGGATCCGGTATCAGTTACGAAG TTAGGTACCCTCGAGTCATGATTTTTCATTAAGTATAGACC
<i>hlyII</i> (S388–I412)	TTACATATGGGATCCTCAACTGTAGGCAATATC TAATACTCGAGTCAGATCTGTTTAATCTCGATA

XhoI. Таким образом, белки, кодируемые полученными плазмидами, состояли из шаперона SlyD с 6 гистидиновыми остатками на *N*-конце и фрагмента HlyIICTD на *C*-конце.

Экспрессия и очистка HlyIICTD и его мутантных форм. Экспрессию и очистку HlyIICTD His6 и его мутантных форм проводили, как описано в работе [18].

Экспрессия и очистка фрагментов HlyIICTD, слитых с белком SlyD. Для экспрессии фрагментов использовали штамм *E. coli* BL21(DE3), трансформированный плазмидой pTSL с геном соответствующего фрагмента. Клетки выращивали в среде LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, при 37°C до OD_{600} 0.5–0.6 при интенсивной аэрации. Экспрессию фрагментов индуцировали добавлением изопропил- β -D-1-тио-галактопиранозидом до конечной концентрации 0.1 мМ. Дальнейшее культивирование осуществляли при 20°C в течение 12 ч с интенсивной аэрацией. Для выделения фрагментов HlyIICTD, слитых с белком SlyD, клетки ресуспендировали в буфере Т (50 мМ Tris-HCl, 300 мМ NaCl, 5% глицерина, pH 7.5, 1 мМ фенилметилсульфонилфторид) с 20 мМ имидазолом и разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе QSonica Q700 (QSonica, США) (8 циклов по 30 с каждый, амплитуда 35%, перерывы по 2 мин). Полученный клеточный лизат использовали для очистки с помощью металл-аффинной хроматографии на колонке с Ni-NTA-агарозой (Qiagen, США) согласно протоколу производителя.

Иммуноферментный анализ. Конкурентный ИФА и исследование взаимодействия mAbs с рекомбинантными белками и мутантными формами проводили, как описано в работе [4].

Статистическая обработка результатов. Все результаты представлены в виде средних значений (Mean) и стандартных отклонений (SD). Сравнение результатов ингибирования взаимодействия mAb с антигеном для каждой экспериментальной лунки с соответствующей концентрацией проводили тестом ANOVA. Значения IC_{50} и EC_{50} определяли в программе GraphPad Prism 8. Статистически значимые различия взаимодействий mAb с HlyIICTD и его мутантными формами выявляли тестом Манна–Уитни ($p < 0.05$). Описательная статистика была выполнена в программном обеспечении Microsoft Excel 2016.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

HlyII – важнейший патогенный фактор *B. cereus*, *C*-концевой домен которого крайне важен для цитолитического действия токсина. В настоящей работе показано, что HlyIICTD представляет собой конформационно-подвижный белок, который стабилизируется в составе полноразмерного HlyII и при взаимодействии с шапероном SlyD. Сравнение взаимодействия одновременно нескольких антител с интактным HlyIICTD и полученными мутантами позволило определить положение конформационных эпитопов HlyIIC-16 и HlyIIC-23 на участке HlyII G341–G364. В результате работы с использованием сайт-направленного мутагенеза и трехмерного моделирования было уточнено расположение пространственного эпитопа для моноклонального антитела HlyIIC-20.

При терапии пациентов с ослабленным иммунитетом следует иметь в виду, что условно-патогенная бактерия *B. cereus* распространена в среде обитания человека, поэтому расширение научных знаний о структурно-функциональных механизмах действия вирулентных факторов этой бактерии имеет практическое значение. Выявление участков, значимых для функционирования вирулентного фактора, и исследование его эпитопной структуры – первые шаги при создании прототипов лекарственных и вакцинных препаратов, направленных на защиту от инфекции, что в перспективе будет способствовать их эффективной разработке.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-74-10026).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концептуализация – НВР, БСМ; разработка методологии исследования и подготовка рукописи – НВР, БСМ, АПК; проведение исследования и анализ данных – ОСВ, НВР, АПК, АВЗ, АСН, ЖИАК, АВС; администрирование проекта – ФАБ, АСС.

Все авторы дали одобрение на окончательный вариант рукописи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Logan N.A. // J. Appl. Microbiol. 2012. V.3. P. 417–429. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05204.x>
2. Ramarao N., Sanchis V. // Toxins (Basel). 2013. V. 5. P. 1119–1139. <https://doi.org/10.3390/toxins5061119>
3. Miles G., Bayley H., Cheley S. // Protein Sci. 2002. V. 11. P. 1813–1824. <https://doi.org/doi.org/10.1110/ps.0204002>
4. Rudenko N.V., Nagel A.S., Melnik B.S., Karatovskaya A.P., Vetrova O.S., Zamyatina A.V., Andreeva-Kovalevskaya Z.I., Siunov A.V., Shlyapnikov M.G., Brovko F.A., Solonin A.S. // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 22. P. 16437. <https://doi.org/10.3390/ijms242216437>
5. Romero P., Obradovic Z., Li X., Garner E.C., Brown C.J., Dunker A.K. // Proteins. 2001. V. 1. P. 38–48. [https://doi.org/10.1002/1097-0134\(20010101\)42:1<38::aid-prot50>3.0.co;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-0134(20010101)42:1<38::aid-prot50>3.0.co;2-3)
6. Xue B., Dunbrack R.L., Williams R.W., Dunker A.K., Uversky V.N. // Biochim. Biophys. Acta. 2010. V. 4. P. 996–1010. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.01.011>
7. Kaplan A.R., Kaus K., De S., Olson R., Alexandrescu A.T. // Sci. Rep. 2017. V. 1. P. 3277. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02917-4>
8. Kaplan A.R., Olson R., Alexandrescu A.T. // Protein Sci. 2021. V. 5. P. 990–1005. <https://doi.org/10.1002/pro.4066>
9. Nagibina G.S., Melnik T.N., Glukhova K.A., Uversky V.N., Melnik B.S. // Intrinsic Disorder-Based Design of Stable Globular Proteins // In: Progress in Molecular Biology and Translational Science. 2020. V. 174. P. 157–186. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2020.05.005>
10. Cardone C., Caseau C.M., Pereira N., Sizun C. // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 4. P. 1537. <https://doi.org/10.3390/ijms22041537>
11. Joseph A.P., Srinivasan N., de Brevern A.G. // Amino Acids. 2012. V. 43. P. 1369–1381. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-1211-9>
12. Schmidpeter P.A., Koch J.R., Schmid F.X. // Biochim. Biophys. Acta. 2015. V. 1850. P. 1973–1982. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.12.019>
13. Morgan A.A., Rubenstein E. // PLoS One. 2013. V. 8. P. e53785. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053785>
14. Vakilian M. // Clin. Immunol. 2022. V. 234. P. 108896. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2021.108896>
15. Ünal C.M., Steinert M. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2014. V. 78. P. 544–571. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00015-14>
16. Ladani S.T., Souffrant M.G., Barman A., Hamelberg D. // Biochim. Biophys. Acta. 2015. V. 1850. P. 1994–2004. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.12.023>
17. Bochicchio B., Pepe A. // Chirality. 2011. V. 9. P. 694–702. <https://doi.org/10.1002/chir.20979>
18. Rudenko N.V., Karatovskaya A.P., Zamyatina A.V., Siunov A.V., Andreeva-Kovalevskaya Z.I., Nagel A.S., Brovko F.A., Solonin A.S. // Bioorg. Khim. 2020. V. 46. P. 321–326. <https://doi.org/10.1134/S1068162020030188>
19. Zamyatina A.V., Rudenko N.V., Karatovskaya A.P., Shepelyakovskaya A.O., Siunov A.V., Andreeva-Kovalevskaya Z.I., Nagel A.S., Salyamov V.I., Kolesnikov A.S., Brovko F.A., Solonin A.S. // Bioorg. Khim. 2020. V. 6. P. 1214–1220. <https://doi.org/10.1134/S1068162020060382>
20. Notredame C., Higgins D., Heringa J. // J. Mol. Biol. 2000. V. 1. P. 205–217. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4042>
21. Crooks G.E., Hon G., Chandonia J.M., Brenner S.E. // Genome Res. 2004. V. 14. P. 1188–1190. <https://doi.org/10.1101/gr.849004>
22. Kaplan A.R., Maciejewski M.W., Olson R., Alexandrescu A.T. // Biomol. NMR Assign. 2014. V. 2. P. 419–423. <https://doi.org/10.1007/s12104-013-9530-2>
23. Cheng Y., Oldfield C.J., Meng J., Romero P., Uversky V.N., Dunker A.K. // Biochemistry. 2007. V. 47. P. 13468–13477. <https://doi.org/10.1021/bi7012273>
24. Kovermann M., Schmid F.X., Balbach J. // Biol. Chem. 2013. V. 8. P. 965–975. <https://doi.org/10.1515/hsz-2013-0137>
25. Abramson J., Adler J., Dunger J. // Nature. 2024. V. 630. P. 493–500. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07487-w>
26. Jumper J., Evans R., Pritzel A., Green T., Figurnov M., Ronneberger O., Tunyasuvunakool K., Bates R., Židek A., Potapenko A. // Nature. 2021. V. 596. P. 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
27. Varadi M., Anyango S., Deshpande M., Nair S., Natassia C., Yordanova G., Yuan D., Stroe O., Wood G., Laydon A. // Nucleic Acids Res. 2022. V. 50. P. D439–D444. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061>
28. Sambrook J., Russell D.W. // CSH Protoc. 2006. V. 1. P. pdb.prot3468. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot3468>
29. Taylor N.M., Prokhorov N.S., Guerrero-Ferreira R.C., Shneider M.M., Browning C., Goldie K.N., Stahlberg H., Leiman P.G. // Nature. 2016. V. 7603. P. 346–352. <https://doi.org/10.1038/nature17971>

Spatial Structure of the C-Terminal Domain of *Bacillus cereus* Hemolysin II is Stabilized in the Composition of the Full-Size Toxin

N. V. Rudenko^{*, #}, B. S. Melnik^{*, **}, A. P. Karatovskaya^{*}, A. S. Nagel^{***},
Zh. I. Andreeva-Kovalevskaya^{***}, A. V. Zamyatina^{*}, O. S. Vetrova^{*}, A. V. Siunov^{***},
F. A. Brovko^{*}, and A. S. Solonin^{***}

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

^{*} Branch of the Federal State Budgetary Institution of Science, State Scientific Center of the Russian Federation, Institute of Bioorganic Chemistry named after Academicians M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikova Russian Academy of Sciences (Branch of the State Research Center IBCh RAS), prosp. Nauki 6, Pushchino, 142290 Russia

^{**} Institute of Protein Research of the Russian Academy of Sciences (IPR RAS), prosp. Nauki 4, 142290, Pushchino Russia

^{***} G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms of the Russian Academy of Sciences (IBFM RAS) "Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences", prosp. Nauki 5, Pushchino, 142290 Russia

Hemolysin II (HlyII) is one of the key pathogenic factors of *Bacillus cereus*, a pore-forming toxin with a spatial structure of the β -barrel type, possessing a C-terminal extension of 94 amino acid residues, designated as the C-terminal domain of HlyII (HlyIICTD). In this work, site-directed mutagenesis of amino acid residues lying on the surface of the HlyIICTD protein globule was carried out. The work has been demonstrated that the C-terminal domain can simultaneously exist in several structural isoforms. The move of the three-dimensional structure of HlyIICTD into a stable form as a part of water-soluble full-length toxin monomer is observed. Recombinant proteins and their mutant forms using producing strain *Escherichia coli* BL21(DE3) were obtained. Their interaction with monoclonal antibodies HlyIIC-16 and HlyIIC-23 by enzyme immunoassay was studied. To define the epitopes of the phage display of HlyIIC-16 and HlyIIC-23, site-directed mutagenesis, gene cloning of individual parts of the HlyIICTD molecule, three-dimensional modeling of HlyIICTD fused to SlyD using the AlphaFold program were used. It was shown that monoclonal antibodies obtained against HlyIICTD interacted with intact HlyIICTD much more effectively than with the full-length toxin and the chimeric protein – HlyIICTD fused with SlyD. Antibodies HlyIIC-16 and HlyIIC-23 effectively inhibited each other's interaction with immobilized HlyIICTD in an enzyme-linked immunosorbent assay, indicating the proximity of their epitopes on the surface of the HlyIICTD molecule. Phage display, site-directed mutagenesis, and gene cloning of individual parts of the HlyIICTD molecule were used to determine the epitopes of HlyIIC-16 and HlyIIC-23. Spatial modeling of HlyIICTD fused to SlyD using the AlphaFold program suggested the location of the HlyIIC-16 and HlyIIC-23 epitopes on the Gly341–Gly364 region of the HlyII protein. It was demonstrated that the C-terminal domain can simultaneously exist in several structural states (isoforms). In the water-soluble form of the full-length toxin monomer, a transition of the spatial structure of HlyIICTD to a stable form is observed.

Keywords: *Bacillus cereus* hemolysin II, protein spatial structure, epitope, monoclonal antibody, phage display, site-directed mutagenesis