



УДК 579.222.3

С-КОНЦЕВОЙ ДОМЕН ГЕМОЛИЗИНА II *Bacillus cereus* СПОСОБЕН ОБРАЗОВЫВАТЬ ГОМО- И ГЕТЕРООЛИГОМЕРНЫЕ ФОРМЫ ТОКСИНА НА ПОВЕРХНОСТИ МЕМБРАНЫ

© 2025 г. О. С. Ветрова*, Н. В. Руденко*, #, Б. С. Мельник*, **, А. П. Караповская*,
А. В. Замятин*, А. С. Нагель***, Ж. И. Андреева-Ковалевская***, А. В. Сиунов***,
Ф. А. Бровко*, А. С. Солонин***

* Филиал ФГБУН ГНЦ “Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН
(Филиал ГНЦ ИБХ РАН),
Россия, 142290 Пущино, просп. Науки, 6

** ФГБУН “Институт белка” РАН (ИБ РАН), Россия, 142290 Пущино, просп. Науки, 4

*** Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН (ИБФМ РАН)
ФИЦ “Пущинский научный центр биологических исследований” РАН,
Россия, 142290 Пущино, просп. Науки, 5

Поступила в редакцию 28.01.2025 г.

После доработки 11.02.2025 г.

Принята к публикации 12.02.2025 г.

Гемолизин II (HlyII) – один из ключевых патогенных факторов условно-патогенной грамположительной бактерии *Bacillus cereus*. HlyII, образуя поры на мембранах, лизирует клетки-мишени. HlyII относят к группе β -пороформирующих токсинов. Отличительная особенность HlyII – наличие С-концевого домена из 94 а.о. (HlyIICTD). Показано, что в слабокислых условиях (рН 5.0), соответствующих примембранный области, С-концевые домены (как сами по себе, так и в составе токсина) образуют устойчивые комплексы, состоящие из полноразмерных и укороченных молекул токсина. HlyII, HlyIILCTD (большой С-концевой фрагмент Met225–Ile412) и HlyIICTD получали с использованием рекомбинантных штаммов-продуцентов *Escherichia coli* BL21(DE3). Биотинилирование HlyIICTD проводили с использованием *N*-гидроксисукциниimidного эфира биотина. Взаимодействие HlyIICTD с HlyIICTD, HlyIILCTD и HlyII, а также взаимодействие HlyIICTD с мембранами эритроцитов исследовали иммуноферментным анализом и иммуноблоттингом, как с использованием стрептавидина, коньюгированного с пероксидазой хрина, так и с использованием моноклональных антител против HlyII. HlyIICTD в слабокислых условиях взаимодействовал как с доменом HlyIICTD в составе полноразмерного токсина, так и с белком HlyIICTD. Взаимодействие HlyIICTD с мембраной эритроцитов кратно увеличивалось в присутствии токсина.

Ключевые слова: порообразующий токсин, С-концевой домен гемолизина II *Bacillus cereus*, конформация белков, плазматическая мембрана, иммуноферментный анализ

DOI: 10.31857/S0132342325040071, **EDN:** LNEUTV

ВВЕДЕНИЕ

Bacillus cereus – условно-патогенные грамположительные спорообразующие бактерии [1, 2]. Один из ключевых факторов патогенности этих бактерий – гемолитический токсин II, который

относят к группе β -пороформирующих токсинов [3]. HlyII секретируется бактериями в виде водорастворимых мономеров и олигомеризуется в присутствии мембраны клетки-мишени с образованием трансмембранных пор, что приводит к разрушению

Сокращения: HlyII – гемолизин II *Bacillus cereus*; HlyIICTD – С-концевой домен гемолизина II *B. cereus*; HlyIILCTD – большой С-концевой фрагмент Met225–Ile412 гемолизина II *B. cereus*; HlyIICTD-био – биотинилированный С-концевой домен гемолизина II *B. cereus*.

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

атакованной клетки, обеспечивая бактериям доступ к питательным веществам [4, 5]. Ген гемолизина II обнаружен более чем у 35% представителей *B. cereus* *sensu lato* [6]. Большинство штаммов клинических изолятов *B. cereus* способны синтезировать и секретировать HlyII [3, 7], что свидетельствует о том, что гемолизин II – один из ключевых факторов вирулентности этой бактерии. Гемолизин II лизирует красные кровяные клетки кролика в 15 раз эффективнее, чем его ближайший известный гомолог α -токсин *Staphylococcus aureus* [3]. Аминокислотная последовательность HlyII на 34% идентична α -токсину. Белок HlyII имеет С-концевое удлинение из 94 а.о., обозначаемое как С-концевой домен HlyII [4]. Делеция HlyIICTD в молекуле HlyII снижает гемолитическую активность в 8 раз при действии на эритроциты кролика [4]. HlyIICTD способен ориентированно связываться с мембранами клеток-мишней [8], олигомеризоваться в их присутствии, образовывать ион-проводящие каналы на искусственной двухслойной мембране, лизировать клетки макрофагального и Т-клеточного происхождения [9]. Структура HlyIICTD, определенная с помощью ЯМР, представляет собой псевдочечку, состоящую из двух α -спиралей, окруженных пятью β -слоями [10]. Изучение структуры HlyIICTD продемонстрировало уникальность этого домена, т.к. доменов подобной структуры среди других порообразующих токсинов не обнаружено [10, 11].

Целью данной работы было изучение свойств С-концевого домена HlyII в условиях, формирующихся вблизи клеточной мембраны (рН 5.0).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Образование комплексов HlyIICTD с полноразмерным токсином и с его укороченными формами при рН 5.0. Возможность HlyIICTD образовывать комплексы с полноразмерным токсином, HlyIICTD и HlyIILCTD проверяли методом ИФА по взаимодействию рекомбинантного HlyIICTD-био с сорбированными на пластик для ИФА рекомбинантными препаратами. Возможное взаимодействие во всех экспериментах с использованием биотиновой метки выявляли стрептавидином, конъюгированным с пероксидазой хрина. При условиях рН и ионной силы, соответствующим физиологическим (рН 7.2), HlyIICTD практически не взаимодействовал с токсином. Связывание HlyIICTD-био с иммобилизованными

на пластик препаратами выявляли при рН 5.0 (рис. 1а).

Для подтверждения полученных результатов комплексы “HlyIICTD + HlyII”, образующиеся при рН 5.0, идентифицировали с помощью моноклональных антител против HlyII. В данном эксперименте HlyIICTD сорбировали на пластик для ИФА. Далее добавляли раствор токсина при рН 5.0. На следующей стадии к образовавшемуся комплексу добавляли моноклональные антитела против HlyII, не взаимодействующие с HlyIICTD [12, 13]. Связавшиеся антитела выявляли антителами кролика против иммуноглобулинов мыши, конъюгированными с пероксидазой. Все использованные антитела выявляли комплексы “HlyIICTD + HlyII”. Результаты представлены на рис. 1б.

Сравнение взаимодействия HlyIICTD-био с иммобилизованным HlyII при различных рН по-

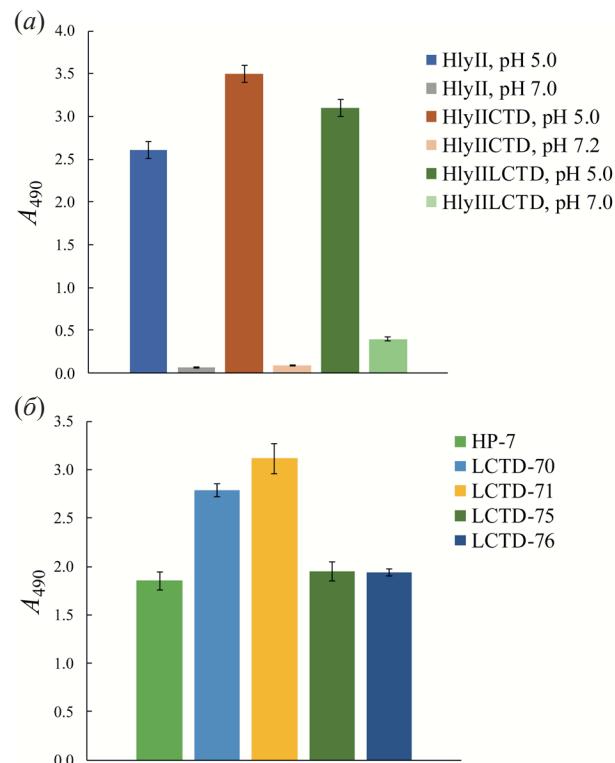


Рис. 1. (а) – Взаимодействие иммобилизованных HlyII, HlyIILCTD и HlyIICTD с биотинилированным HlyIICTD (10 мкг/мл); условия реакции (рН) указаны на рисунке; (б) – взаимодействие иммобилизованного HlyIICTD с HlyII (5 мкг/мл) при рН 5.0, идентифицированное моноклональными антителами против HlyII (HP-7 [12]; LCTD-70, 71, 75, 76 [13]) в концентрации 10 мкг/мл.

казало, что снижение pH раствора приводит к увеличению степени связывания (рис. 2).

Присутствие избытка немеченого HlyIICTD при pH 5.0 приводило к значительному концентрационно-зависимому увеличению связавшегося биотинилированного HlyIICTD, что свидетельствовало об образовании комплексов за счет связывания HlyIICTD с C-концевым доменом в составе токсина и молекул HlyIICTD между собой (рис. 3).

Таким образом, показано, что C-концевой домен при pH 5.0 способен образовывать комплексы “HlyIICTD + HlyII”, взаимодействуя при этом с HlyIICTD в составе HlyII. В каждом из экспериментов дальнейшие процедуры по выявлению комплекса “HlyIICTD + HlyII” после его образования проводили при pH 7.2. Следовательно, образовавшиеся комплексы далее оставались стабильными.

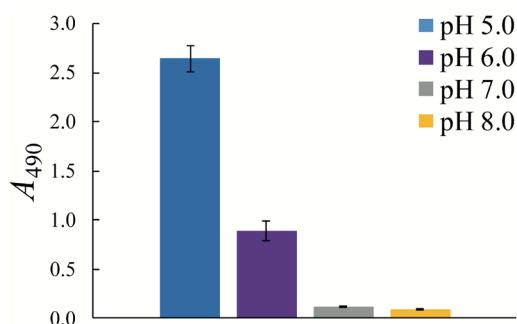


Рис. 2. Взаимодействие иммобилизованного HlyII с биотинилированным HlyIICTD (10 мкг/мл) при различных pH.

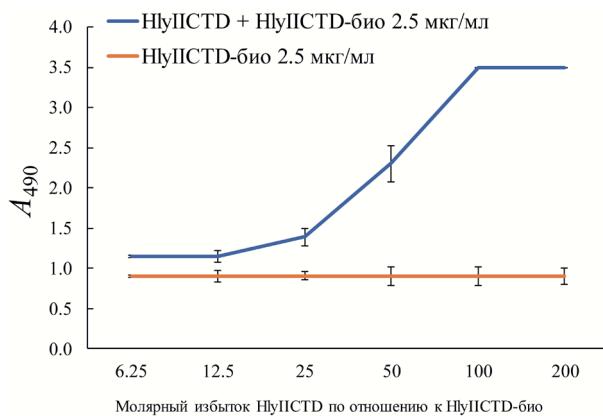


Рис. 3. Взаимодействие иммобилизованного HlyII с биотинилированным HlyIICTD в присутствии избытка немеченого HlyIICTD при pH 5.0.

Высокомолекулярные белковые полосы (>245 кДа), образовавшиеся при инкубировании HlyIICTD-био с HlyII при pH 5.0, были также выявлены иммуноблоттингом как при окрашивании стрептавидин-пероксидазой, так и моноклональным антителом LCTD-71 (рис. 4). Стрептавидин-пероксидаза окрашивала белковые полосы, содержащие HlyIICTD-био с молекулярной массой ~14 кДа, LCTD-71 выявляло белковую полосу с молекулярной массой ~46 кДа, соответствующей массе полноразмерного токсина.

Условие pH 5.0 *in vitro* соответствуют условиям вблизи клеточной мембраны, при которых пространственная структура белков принимает состояние частично расплавленной глобулы [14, 15].

Взаимодействие биотинилированного HlyIICTD с эритроцитами в присутствии HlyII. Для подтверждения взаимодействия HlyIICTD и HlyII в присутствии мембраны эритроцитов был проведен эксперимент, схема которого представлена на рис. 5. Поскольку ранее было показано, что HlyIICTD связывается с мембранами эритроцитов [8, 9], было проведено сравнение взаимодействия биотинилированного HlyIICTD с эритроцитами в присутствии и в отсутствие HlyII.

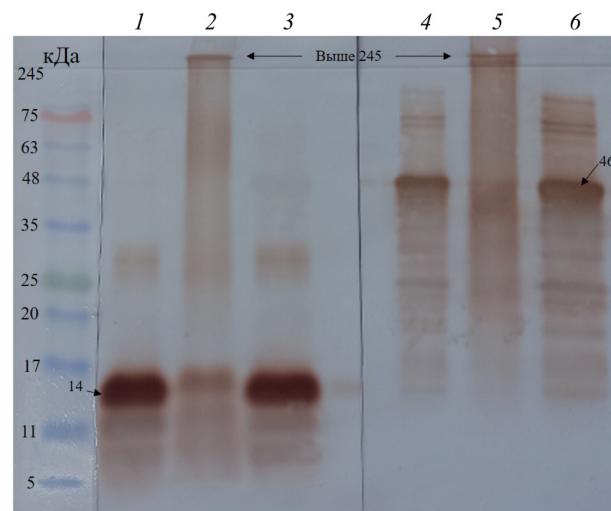


Рис. 4. Анализ взаимодействия HlyII с HlyIICTD методом иммуноблоттинга: 1 – HlyIICTD-био; 2 – HlyII + HlyIICTD-био, pH 5.0; 3 – HlyII + HlyIICTD-био, pH 7.2; 4 – HlyII; 5 – HlyII + HlyIICTD-био, pH 5.0; 6 – HlyII + HlyIICTD-био, pH 7.2; 1–3 – окрашивание стрептавидин-пероксидазой, 4–6 – моноклональным антителом LCTD-71.

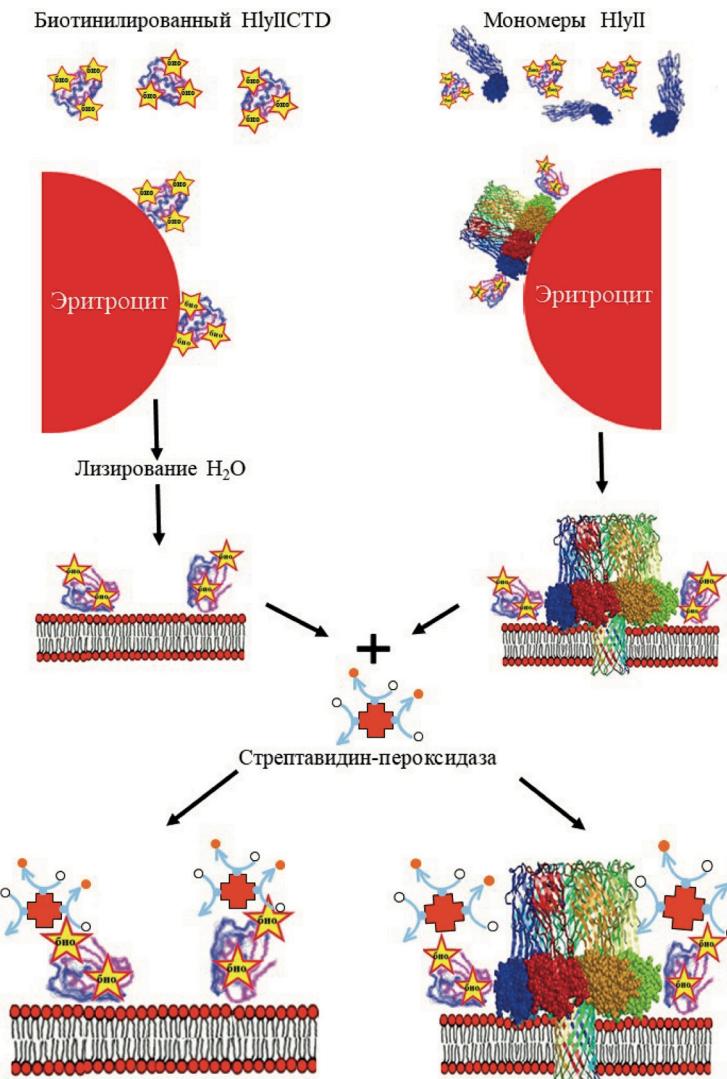


Рис. 5. Взаимодействие биотинилированного HlyPCTD с эритроцитами в присутствии и в отсутствие HlyII (схема эксперимента).

В случае, когда в реакционной смеси с эритроцитами присутствовал только HlyPCTD, эритроциты лизировали водой, далее в обоих случаях все процедуры проводили одинаково. Связавшийся с фрагментами мембран HlyPCTD выявляли стрептавидин-пероксидазой. В качестве отрицательного контроля стрептавидин-пероксидазу добавляли к фрагментам мембран эритроцитов, полученных после лизиса водой и после лизиса HlyII без добавления биотинилированного HlyPCTD. Результаты представлены на рис. 6. Показано, что в присутствии HlyII содержание меченого HlyPCTD в экспериментальной точке, содержащей фрагменты мембран, значительно возрастает. Полученные данные подтверждают

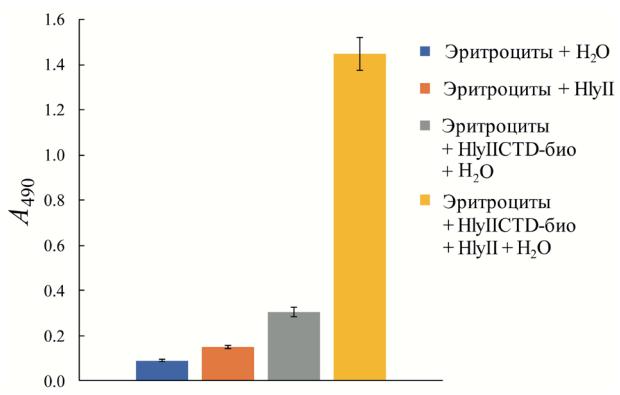


Рис. 6. Относительное содержание HlyPCTD-био на фрагментах мембран после инкубации с эритроцитами в присутствии и в отсутствие HlyII.

предположение о том, что вблизи мембранны С-концевые домены демонстрируют способность взаимодействовать друг с другом.

Обсуждение полученных результатов. Биологические мембранны характеризуются сложным составом и имеют отрицательный заряд на внешней стороне [16, 17]. Обнаружено и экспериментально подтверждено, что мембранныя поверхность с высоким электростатическим потенциалом способна притягивать протоны [18, 19]. Этот факт предполагает существование индуцированного градиента поверхности pH от более кислого непосредственно у поверхности с уменьшением кислотности при удалении от мембранны. Проведены теоретические расчеты и получены экспериментальные данные при помощи флуоресцентных зондов, подтверждающие факт того, что вблизи заряженной гидрофобной поверхности значение pH существенно ниже, чем pH воды [20, 21]. Локальное понижение pH составляет по крайней мере 2 единицы на расстоянии 5–15 Å от поверхности мембранны. При этом именно низкие значения pH делают возможным получение состояния частично расплавленной глобулы для многих белков в условиях *in vitro* [22]. Условия на границе раздела фаз в значительной степени отличаются от таковых в цитоплазме и влияют на структурно-функциональные свойства белков, оказавшихся вблизи нее, которые принимают состояние расплавленной глобулы [14, 15]. Мембранныя поверхность выполняет роль умеренно денатурирующего фактора. Структура белка подвергается суммарному действию усиливающихся электростатических взаимодействий, локального понижения pH и изменения диэлектрической проницаемости среды вблизи поверхности мембранны [23].

Градиент поверхности pH вблизи мембранны может служить триггером многих структурных перестроек белков, взаимодействующих с мембранными. К таким белкам относятся бактериальные порообразующие токсины.

Гемолизин II *B. cereus* имеет pI 8.56 [3], для HlyPICTD расчетная pI составляет 8.8 [24], следовательно, в слабокислых условиях вблизи мембранны положительный заряд этих молекул возрастает, увеличивается вероятность их связывания с мембранный. Полноразмерный HlyII и его укороченные формы эффективно взаимодействуют с мембранными. Ранее продемонстри-

ровано, что K_{aff} HlyPICTD для клеток крови различных видов практически не различаются [9]. В то же время показано, что эффективность гемолиза эритроцитов разного происхождения различна [25]. Возможно, что эффективность взаимодействия как полноразмерного HlyII, так и его укороченной формы HlyPICTD зависит от состава мембранны эукариотических клеток, подвергающихся атаке. Поскольку не определено, существует ли место, обеспечивающее эффективное связывание на поверхности клеточных мембранны для обеих молекул, неизвестно, выступают ли эти участки идентичными, частично перекрывающимися или независимыми, то, возможно, что HlyII и HlyPICTD могут быть конкурентами за место посадки на мембранные, что, несмотря на концентрирование этих молекул в примембранным слое, может снизить эффективность порообразования. Одновременно с этим в примембранный области при пониженном pH возможно увеличение взаимодействия HlyII и HlyPICTD и образование гетероолигомерных форм, включающих как полноразмерный HlyII, так и его укороченную форму HlyPICTD. Такие олигомерные формы могут терять способность образовывать функционирующие поры и снижать эффективность гемолиза, формируя гетероолигомерные комплексы с полноразмерным токсином или конкурируя с ним за место связывания на поверхности эукариотической клетки [26].

Исследование С-концевого домена в условиях, соответствующих тем, которые образуются вблизи клеточной мембранны (pH 5.0), обнаружило свойство HlyPICTD образовывать комплексы между собой независимо от того, входит ли он в состав полноразмерного токсина, большого С-концевого фрагмента или сам по себе. HlyPICTD, находясь в состоянии расплавленной глобулы, собирает, связывая друг с другом партнеров, которые будут образовывать пору на мембранны клетки-мишени. По-видимому, это уникальное свойство HlyPICTD, проявляющееся только в примембранный области, объясняет уменьшение гемолитической активности мутантов гемолизина II, лишенных HlyPICTD, а также более высокую гемолитическую активность HlyII в сравнении с гемолизинами, не имеющими С-концевого домена [4]. Присутствие С-концевого домена в составе полноразмерного токсина не позволяет однозначно утверждать, что происходит увеличение реальной

концентрации HlyII в примембранный области и, следовательно, усиление цитолитической активности. Однако возможность перевода молекул в состояние частично расплавленной глобулы позволяет предположить существование природного триггерного механизма создания как гомо-, так и гетероолигомеров. Не исключена возможность увеличения эффективности порообразования за счет увеличения концентрации полноразмерных молекул HlyII в примембранный области.

Взаимодействие C-концевых доменов друг с другом может приводить к увеличению локальной концентрации HlyII, что способствует олигомеризации, необходимой для образования поры на мембране клетки-мишени. Олигомеризация либо предшествует, либо сопутствует обнажению гидрофобных поверхностей в пространственной структуре токсина [27–31].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение рекомбинантных белков. Создание генно-инженерных конструкций, а также экспрессия и очистка рекомбинантных белков описана в работе [12].

Биотинилирование HlyIICTD. HlyIICTD биотинилировали *N*-гидроксисукциниimidным эфиром биотина (Sigma, США), используя при этом раствор *N*-гидроксисукциниimidного эфира биотина в диметилсульфоксиде (1 мг/мл). Смешивали реагент и HlyIICTD в молярном соотношении 20 : 1, инкубировали 4 ч при комнатной температуре. Далее дialisовали против фосфатно-солевого буфера в течение ночи.

Непрямой твердофазный иммуноферментный анализ. Иммобилизацию рекомбинантных белков HlyII, HlyIILCTD и HlyIICTD на поверхность экспериментальных лунок планшетов для ИФА (Costar, США) проводили в течение ночи при 4°C из 50 мкл раствора с концентрацией 1 мкг/мл в 50 мМ карбонат-бикарбонатном буфере, pH 9.6. Места возможной неспецифической сорбции блокировали избытком раствора PBST (150 мМ NaCl, 5.2 мМ Na₂HPO₄, 1.7 мМ KH₂PO₄, 0.1% Tween 20) в течение 30 мин при комнатной температуре.

Далее в экспериментальные лунки вносили по 50 мкл раствора, содержащего 10 мкг/мл биотинилированного HlyIICTD. Планшеты инкуби-

ровали в течение 1 ч при 37°C. Для идентификации взаимодействия добавляли стрептавидин-пероксидазу (Invitrogen, США) в разведении в PBST согласно рекомендации производителя. После каждой стадии экспериментальные лунки отмывали не менее 6 раз PBST. Уровень взаимодействия оценивали окрашиванием раствором орто-фенилендиамина (4 мМ) (Sigma, США) и перекиси водорода (0.04%) в цитрат-фосфатном буфере (0.02 М лимонная кислота, 0.05 М Na₂HPO₄). Ферментативную реакцию останавливали добавлением равного объема 10%-ной серной кислоты. Интенсивность окрашивания полученного окисленного субстрата определяли с помощью планшетного спектрофотометра iMark (США) при длине волны 490 нм.

В варианте с иммобилизованным HlyIICTD после блокировки в экспериментальные лунки вносили раствор HlyII (pH 5.0), инкубировали 1 ч при 37°C, далее добавляли растворы моноклональных антител, взаимодействующих с HlyII, но не с HlyIICTD. После инкубации в тех же условиях, что и в предыдущей стадии, лунки инкубировали с кроличьими антителами против иммуноглобулинов мыши, конъюгированными с пероксидазой хрена (Invitrogen, США), в разведении согласно инструкции производителя (1 ч при 37°C). Планшеты отмывали и окрашивали так же, как описано в предыдущем абзаце.

Иммуноблоттинг. Предварительно инкубировали 0.2 мкг HlyIICTD-био с 1 мкг HlyII при pH 5.0 либо pH 7.2 в течение 30 мин при комнатной температуре. Далее реакционные смеси подвергали электрофоретическому разделению в присутствии додецилсульфата натрия и β-меркаптоэтанола в 14%-ном ПААГ согласно работе [32]. Перенос на нитроцеллюлозную мембрану и окрашивание белковых полос проводили, как описано в работе [13], при этом антитело LCTD-71 добавляли в концентрации 10 мкг/мл, стрептавидин-пероксидазу (Invitrogen, США) и кроличьи антитела против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (Invitrogen, США), добавляли в разведении согласно инструкции производителя (1 ч при 37°C).

Взаимодействие HlyIICTD с эритроцитами. Реакцию проводили в 100 мкл 0.1%-ной суспензии эритроцитов в фосфатно-солевом буфере, содержащем 5% бычьего сывороточного альбумина (Sigma, США). К эритроцитам добавляли 3.57 мкМ

HlyPICTD-bio либо одновременно 3.57 мкМ HlyPICTD-bio и 0.625 мкМ HlyII. В случае добавления только HlyPICTD-bio эритроциты осаждали центрифугированием 1500 об/мин (центрифуга Thermo Scientific, MySPIN 12, КНР) и лизировали добавлением 100 мкл дистилированной воды. Далее процедуры для обоих вариантов проводили одинаково, реакционные смеси центрифугировали (17 000 об/мин, M141R RWD Life Science, КНР) не менее 3 раз. После каждого осаждения осадок ресуспенсировали в фосфатно-солевом буфере, содержащем 5% бычьего сывороточного альбумина. Далее к осадкам добавляли стрептавидин-пероксидазу в разведении согласно рекомендации производителя. После инкубации полученных фрагментов мембран со стрептавидин-пероксидазой в течение 1 ч при 37°C проводили трехкратную отмытку экспериментальных точек также, как и на предыдущей стадии. Далее к осадку добавляли 4 мМ раствор *орт-фенилендиамина* в цитрат-фосфатном буфере (0.02 М лимонная кислота, 0.05 М Na₂HPO₄), содержащего 0.003% H₂O₂ (v/v). Реакцию останавливали добавлением равного объема 10%-ной серной кислоты. В качестве отрицательного контроля стрептавидин-пероксидазой окрашивали фрагменты мембран, полученные после лизиса водой и HlyII без добавления HlyPICTD-био. Далее определяли оптическую плотность при 490 нм.

Статистическая обработка результатов. Все результаты представлены в виде средних значений (Mean) и стандартных отклонений (SD), полученных в результате не менее пяти повторов в одном эксперименте. Данные обрабатывали в программном обеспечении Microsoft Excel 2016.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Свойства клеточной мембраны обусловливают формирование вблизи нее слабокислых условий, которые способствуют изменению свойств белков, взаимодействующих с мембраной. В данной работе были изучены изменения функциональных свойств C-концевого домена HlyII. Выявлена его способность образовывать устойчивые комплексы между собой независимо от того, входит ли он в состав полноразмерного токсина, большого C-концевого фрагмента или короткого HlyPICTD в условиях, соответствующих существующим вблизи клеточной мембраны (рН 5.0). Токсин в примембранный области находится в состоя-

нии частично расплавленной глобулы, в котором C-концевые домены мономеров могут связываться друг с другом, увеличивая локальную концентрацию полноразмерных токсинов. Полученные результаты проясняют механизм порообразования и разрушения клеток-мишеней ключевым патогенным фактором HlyII *B. cereus*.

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, АСС; экспериментальные работы – ОСВ, АПК, АВЗ, АСН, ЖИА-К, АВС; написание статьи – НВР, АСС; анализ данных – ОСВ; администрирование проекта – ФАБ, АПК.

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. 112. P. 417–429.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05204.x>
2. Thery M., Cousin V.L., Tissieres P., Enault M., Morin L. // Front. Pediatr. 2022. V. 10. P. 978250.
<https://doi.org/10.3389/fped.2022.978250>
3. Ramarao N., Sanchis V. // Toxins. 2013. V. 5. P. 1119–1139.
<https://doi.org/10.3390/toxins5061119>
4. Miles G., Bayley H., Cheley S. // Protein Sci. 2002. V. 11. P. 1813–1824.
<https://doi.org/10.1110/ps.0204002>
5. Hu H., Liu M., Sun S. // Drug Des. Dev. Ther. 2021. V. 15. P. 3773–3781.
<https://doi.org/10.2147/DDDT.S322393>

6. *Patino-Navarrete R., Sanchis V.* // *Res. Microbiol.* 2017. V. 168. P. 309–318.
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.07.002>
7. *Cadot C., Tran S.L., Vignaud M.L., de Buyser M.L., Kolstø A.B., Brisabois A., Nguyen-Thé C., Lereclus D., Guinebretière M.H., Ramarao N.* // *J. Clin. Microbiol.* 2010. V. 48. P. 1358–1365.
<https://doi.org/10.1128/JCM.02123-09>
8. *Rudenko N.V., Karatovskaya A.P., Zamyatina A.V., Siunov A.V., Andreeva-Kovalevskaya Z.A., Nagel A.S., Brovko F.A., Solonin A.S.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2020. V. 46. P. 321–326.
<https://doi.org/10.1134/S1068162020030188>
9. *Rudenko N., Siunov A., Zamyatina A., Melnik B., Nagel A., Karatovskaya A., Borisova M., Shepelevyakovskaya A., Andreeva-Kovalevskaya Zh., Kolesnikov A., Surin A., Brovko F., Solonin A.* // *Int. J. Biol. Macromol.* 2022. V. 200. P. 416–427.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.01.013>
10. *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>
11. *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>
12. *Nagel A.S., Rudenko N.V., Luchkina P.N., Karatovskaya A.P., Zamyatina A.V., Andreeva-Kovalevskaya Z.I., Siunov A.V., Brovko F.A., Solonin A.S.* // *Molecules.* 2023. V. 28. P. 3581.
<https://doi.org/10.3390/molecules28083581>
13. *Nagel A.S., Vetrova O.S., Rudenko N.V., Karatovskaya A.P., Zamyatina A.V., Andreeva-Kovalevskaya Z.I., Salyamov V.I., Egorova N.A., Siunov A.V., Ivanova T.D., Boziev K.M., Brovko F.A., Solonin A.S.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2024. V. 25. P. 5327.
<https://doi.org/10.3390/ijms25105327>
14. *Бычкова В.Е., Басова Л.В., Балобанов В.А.* // Успехи биол. химии. 2014. Т. 54. С. 133–202.
15. *Bychkova V.E., Dolgikh D.A., Balobanov V.A., Finkelstein A.V.* // *Molecules.* 2022. V. 27. P. 4361.
<https://doi.org/10.3390/molecules27144361>
16. *Engelman D.M.* // *Nature.* 2005. V. 438. P. 578–580.
<https://doi.org/10.1038/nature04394>
17. *Von Meer G., Voelker D.R., Feigenson G.W.* // *Mol. Cell Biol.* 2008. V. 9. P. 112–124.
<https://doi.org/10.1038/nrm2330>
18. *Eisenberg M., Gresalfi T., Riccio T., McLaughlin S.* // *Biochemistry.* 1979. V. 18. P. 5213–5223.
<https://doi.org/10.1021/bi00590a028>
19. *Prats M., Teissie J., Toccane J.F.* // *Nature.* 1986. V. 322. P. 756–758.
<https://doi.org/10.1038/322756a0>
20. *Winitzki A.P., McLaughlin A.C., McDaniel R.V., Eisenberg M., McLaughlin S.* // *Biochemistry.* 1986. V. 25. P. 8206–8214.
<https://doi.org/10.1021/bi00373a013>
21. *Galassi V.V., Wilke N.* // *Membranes (Basel).* 2021. V. 11. P. 478.
<https://doi.org/10.3390/membranes11070478>
22. *Ptitsyn O.B.* // *Adv. Protein Chem.* 1995. V. 47. P. 83–229.
[https://doi.org/10.1016/s0065-3233\(08\)60546-x](https://doi.org/10.1016/s0065-3233(08)60546-x)
23. *Bychkova V.E., Ptitsyn O.B.* // *Chemtracts Biochem. Mol. Biol.* 1993. V. 4. P. 133–163.
24. *Kaplan A.R.* // Adventures in structureland: exploring protein conformational plasticity by NMR. Doctoral Dissertations, Connecticut: University of Connecticut, Storrs, 2019. 129 pp.
25. *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.
<https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.10.030>
26. *Chang S.F., Chen C.N., Lin J.C., Wang H.E., Mori S., Li J.J., Yen C.K., Hsu C.Y., Fung C.P., Chong P.C., Leng C.H., Ding Y.J., Chang F.Y., Siu L.K.* // *Cells.* 2020. V. 9. P. 1183.
<https://doi.org/10.3390/cells9051183>
27. *Blandine G., Popoff M.R.* // *Biol. Cell.* 2006. V. 98. P. 667–678.
<https://doi.org/10.1042/BC20050082>
28. *Peraro M.D., van der Goot F.G.* // *Nat. Rev. Microbiol.* 2015. V. 14. P. 77–92.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.3>
29. *Margheritis E., Kappelhoff S., Cosentino K.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. P. 4528.
<https://doi.org/10.3390/ijms24054528>
30. *Iacovache I., Bischofberger M., van der Goot F.G.* // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2010. V. 20. P. 241–246.
<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2010.01.013>
31. *Li Y., Li Y., Mengist H.M., Shi C., Zhang C., Wang B., Li T., Huang Y., Xu Y., Jin T.* // *Toxins (Basel).* 2021. V. 13. P. 128.
<https://doi.org/10.3390/toxins13020128>
32. *Laemml U.K.* // *Nature.* 1970. V. 5259. P. 680–685.
<https://doi.org/10.1038/227680a0>

C-Terminal Domain of *Bacillus cereus* Hemolysin II is Capable of Forming Homo- and Hetero-Oligomeric Forms of Toxin on the Membrane Surface

O. S. Vetrova*, N. V. Rudenko*, #, B. S. Melnik*, **, A. P. Karatovskaya*, A. V. Zamyatina*, A. S. Nagel*, Zh. I. Andreeva-Kovalevskaya***, 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, Pushchino, 142290 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 the opportunistic gram-positive bacterium *Bacillus cereus*. HlyII lyses target cells by forming pores on membranes. HlyII belongs to the group of β -pore-forming toxins. A distinctive feature of HlyII is the presence of a C-terminal domain of 94 amino acid residues (HlyIICTD). It was shown that under slightly acidic conditions (pH 5.0), corresponding to the near-membrane region, the C-terminal domains, both by themselves and as part of the toxin, form stable complexes consisting of full-length and truncated toxin molecules. HlyII, HlyIILCTD (large C-terminal fragment Met225–Ile412) and HlyIICTD were obtained using recombinant producer strains *Escherichia coli* BL21(DE3). Biotinylation of HlyIICTD was carried out using *N*-hydroxysuccinimide ester of biotin. The interaction of HlyIICTD with HlyIICTD, HlyIILCTD, and HlyII, as well as the interaction of HlyIICTD with erythrocyte membranes, were studied by enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting using both horseradish peroxidase-conjugated streptavidin and monoclonal antibodies against HlyII. Under slightly acidic conditions, HlyIICTD interacted with both the HlyIICTD domain within the full-length toxin and with the HlyIICTD protein. The interaction of HlyIICTD with the erythrocyte membrane increased fold in the presence of the toxin. The property of the C-terminal domain to form complexes with each other was revealed, regardless of whether it is part of the full-length toxin, the large C-terminal fragment, or the short HlyIICTD under conditions corresponding to those existing near the cell membrane (pH 5.0). The toxin in the perimembrane region exists in a partially molten globule state, in which the C-terminal domains of the monomers can bind to each other, increasing the local concentration of full-length toxins.

Keywords: pore-forming toxin, C-terminal domain of hemolysin II of *Bacillus cereus*, protein conformation, plasma membrane, enzyme immunoassay