



УДК 602.68;577.112.083.3

МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО ПРОТИВ ОЛИГОМЕРНОЙ ФОРМЫ БОЛЬШОГО С-КОНЦЕВОГО ФРАГМЕНТА (Met225–Ile412) ГЕМОЛИЗИНА II *Bacillus cereus* СПОСОБНО ШТАММ-СПЕЦИФИЧЕСКИ ПОДАВЛЯТЬ ГЕМОЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ

© 2025 г. О. С. Ветрова*, Н. В. Руденко*[#], А. В. Замятина*, А. С. Нагель**,
Ж.И. Андреева-Ковалевская**, А. В. Сиунов**, Ф. А. Бровко*,
А. С. Солонин**, А. П. Каратовская*

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

** 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 01.10.2024 г.

После доработки 15.10.2024 г.

Принята к публикации 16.10.2024 г.

Порообразующий токсин гемолизин II (HlyII), секретируемый грамположительной бактерией *Bacillus cereus*, – один из основных патогенных факторов данного микроорганизма. Действие HlyII приводит к лизису клеток вследствие порообразования на мембранах. Гибридной технологией получены моноклональные антитела против большого С-концевого фрагмента (Met225–Ile412, HlyII_{ILCTD}) HlyII *B. cereus* с использованием в качестве антигена рекомбинантной растворимой формы HlyII_{ILCTD}, которую получали с использованием белка-шаперона SlyD. Моноклональное антитело LCTD-83 ингибировало гемолитическую активность HlyII, степень защиты зависела от присутствия/отсутствия пролина в положении 324 в первичной последовательности токсина. Наиболее эффективно антитело ингибировало гемолиз эритроцитов, вызванный HlyII В-771, в последовательности которого в положении 324 присутствует Pro вместо Leu. Показано, что антитело LCTD-83 взаимодействует с образовавшимися порами на мембранах эритроцитов, блокируя при этом возможный выход внутриклеточного содержимого. HlyII и его мутантные формы получали с использованием рекомбинантных штаммов-продуцентов *Escherichia coli* BL21(DE3). Способность антител узнавать антигены характеризовали иммуноферментным анализом (ИФА) и иммуноблоттингом, иммунопреципитацию использовали для демонстрации взаимодействия с мембранными порами, сформированными токсином. LCTD-83 менее эффективно взаимодействовало с полноразмерным токсином, чем с HlyII_{ILCTD}, что подтвердило тот факт, что порообразование сопровождается изменением конформации токсина. В связи с этим для подавления цитолитического действия гемолизина II перспективны антитела, взаимодействующие с его олигомерной формой. LCTD-83 обладает потенциалом при выявлении путей нейтрализации токсина.

Ключевые слова: порообразующий токсин, гибридома, нейтрализующие моноклональные антитела, гемолиз, конформация белков, мутагенез, иммунопреципитация

DOI: 10.31857/S0132342325020121, **EDN:** LBMNOC

Сокращения: HlyII – гемолизин II; HlyII_{ILCTD} – большой С-концевой фрагмент (Met225–Ile412) HlyII *Bacillus cereus*; mAb – моноклональное антитело; PBS – фосфатно-солевой буфер; ГЕ – гемолитическая единица; ИФА – иммуноферментный анализ.

[#] Автор для связи: (эл. почта: nrudkova@mail.ru).

ВВЕДЕНИЕ

Bacillus cereus – условно-патогенные грамположительные спорообразующие бактерии, широко распространенные в окружающей среде [1–4]. Один из основных факторов патогенности *B. cereus* – гемолизин II (HlyII), что подтверждается его высокой частотой встречаемости среди клинических штаммов *B. cereus*, вызывающих инфекционные заболевания у человека [5–9]. Этот белок секретируется бактерией как водорастворимый мономер. В присутствии мембраны клеток мономеры токсина олигомеризуются с образованием гексамеров и гептамеров, которые встраиваются в клеточную мембрану и разрушают ее, образуя поры [10]. Разница осмотического давления снаружи и внутри клетки обеспечивает поток молекул воды внутрь, что приводит к клеточной гибели [11, 12]. HlyII лизирует клетки высших организмов, что приводит к повреждению атакуемых органов и, в конечном счете, к разрушению организма [10, 12].

HlyII – термостойкий, чувствительный к протеолитическим ферментам белок с молекулярной массой 42.6 кДа, относящийся к классу β -пороформирующих токсинов [6]. Его ближайший гомолог с идентичностью аминокислотной последовательности ~31% – α -гемолизин из *Staphylococcus aureus* [5]. Гемолитическая активность HlyII в отношении клеток крови кроликов более чем в 15 раз выше, чем у α -токсина *S. aureus* [10], 50%-ный лизис эритроцитов кролика происходит при соотношении ~1000 мономеров HlyII на клетку [12].

Для подавления цитолитической активности перспективно использование моноклональных антител (mAbs) [13]. mAbs, обезвреживающие HlyII на различных стадиях секреции или взаимодействия с клетками-мишенями, могут стать прототипами лекарственных препаратов. Ранее было показано, что отдельные фрагменты HlyII способны выполнять независимые функции. Так, C-концевой домен токсина способен ориентированно связываться с мембранами клеток-мишеней [14], большой C-концевой фрагмент (Met225–Phe412, HlyIIILCTD) гемолизина II, выявляемый как отдельный полипептид, способен агглютинировать эритроциты [15]. Ранее авторами было описано штамм-специфическое mAb HlyIIC-20, узнающее пространственный эпитоп C-концевого

домена HlyII (HlyIICTD), способное подавлять цитолитическую активность токсина на стадии образования олигомерных форм [16].

Авторами получена панель mAbs к HlyIIILCTD, направленных против фрагмента молекулы токсина, расположенного в первичной последовательности между коровой частью и C-терминальным доменом. Целью данной работы был поиск защитных антител против действия HlyII среди полученной панели mAbs, исследование специфичности взаимодействия выявленных антител с антигеном, а также определение возможного механизма подавления антителами цитолитической активности HlyII.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение mAbs против HlyIIILCTD. HlyIIILCTD состоит из последовательности Met225–Ile412 (согласно нумерации аминокислотных остатков в полноразмерном HlyII). В отличие от mAbs против HlyIIILCTD, описанных в работе [15], в данном исследовании для иммунизации экспериментальных мышей использовали рекомбинантный препарат HlyIIILCTD, полученный с использованием белка-шаперона SlyD для образования нативной пространственной структуры [15]. Тестирование иммунных сывороток и отбор положительных клонов проводили, анализируя их взаимодействие с иммобилизованным растворимым рекомбинантным HlyIIILCTD, как описано ранее [15]. Отобраны три стабильных гибридных клон, секретирующих mAbs против HlyIIILCTD. Все полученные антитела (LCTD-82, LCTD-83 и LCTD-84) содержали легкую цепь λ (лямбда) и тяжелую цепь μ , эффективно взаимодействовали с HlyIIILCTD в ИФА, а также узнавали денатурированный HlyIIILCTD после кипячения в присутствии додецилсульфата натрия при анализе методом иммуноблоттинга. mAb LCTD-82 окрашивало мономерную форму HlyIIILCTD, антитела LCTD-83 и LCTD-84 – в основном олигомерные формы белка (рис. 1). mAb LCTD-83, взаимодействующее с HlyIIILCTD, слабо узнавало полноразмерный токсин в мономерной форме в ИФА (рис. 2). Меньшая степень связывания в ИФА, по-видимому, обусловлена присутствием некоторого количества олигомерных форм в рекомбинантных препаратах токсинов разных штаммов. Сравнение им-

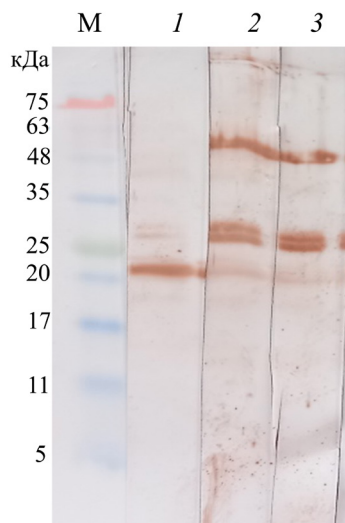


Рис. 1. Иммуноблоттинг HlyIII LCTD с mAbs. Перед электрофоретическим разделением образцы кипятили в 1%-ном SDS в течение 10 мин. М – маркер молекулярного веса (Abscam, Великобритания); 1 – окрашено LCTD-82; 2 – окрашено LCTD-83; 3 – окрашено LCTD-84.

муноферментным анализом эффективности взаимодействия полученных mAbs с HlyIII LCTD и HlyII трех штаммов *B. cereus*, а также его мутантными формами продемонстрировало, что все полученные mAbs слабее взаимодействовали с полноразмерным HlyII, чем с HlyIII LCTD (рис. 2).

При формировании поры на мембране клетки-мишени происходит критическое изменение 3D-структуры токсина [17–20]. mAb LCTD-83 узнает только олигомерные формы белка. Этот факт может оказаться значимым, т.к. антитела направлены уже на сформированный трансмембранный канал. Как и в случае примера mAbs против олигомерной формы пептида β -амилоида (A β), играющего ключевую роль в патогенезе болезни Альцгеймера, показано, что их применение в значительной степени снижает проявление болезни [21].

Подавление цитолитической активности mAbs против HlyIII LCTD. Для поиска факторов, нейтрализующих токсин (HlyII), использовали подход получения антител к отдельным фрагментам молекулы. Ранее на примере других антигенов было показано, что функциональная активность подавляется антителами к отдельным участкам молекул. Например, mAbs к участку легкой цепи с металлопротеазной активностью

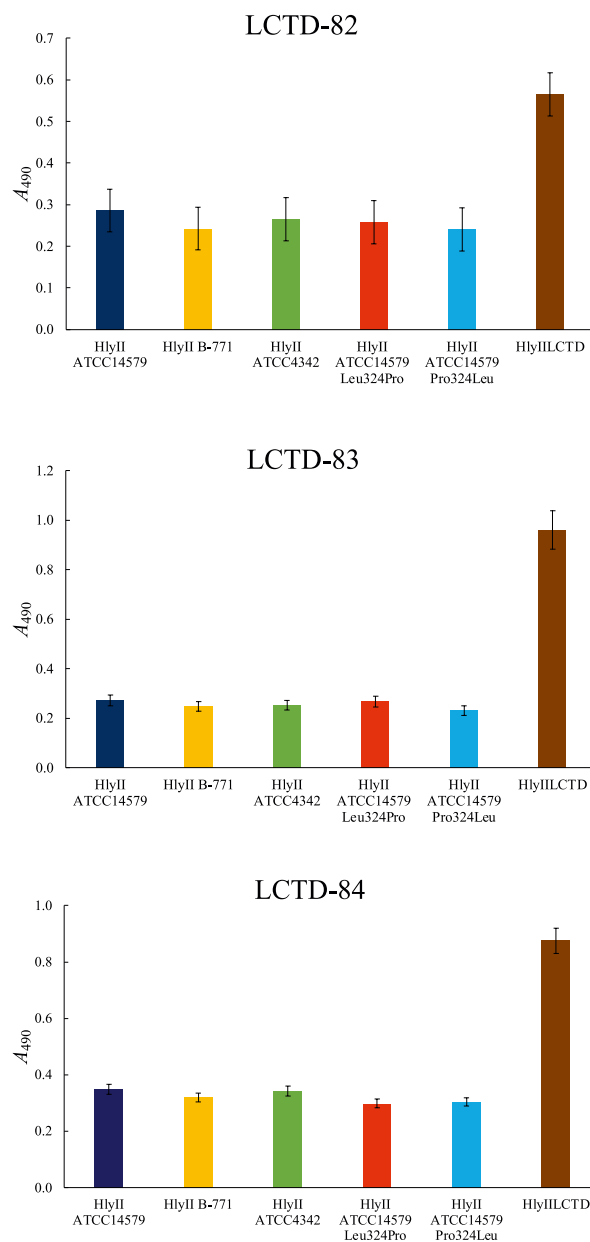


Рис. 2. Сравнение эффективности взаимодействия mAbs против HlyIII LCTD (5 мкг/мл) с иммобилизованными HlyII различных штаммов и HlyIII LCTD.

подавляли ботулинический токсин А [22], mAbs к N-концевому домену протективного антигена *B. anthracis* нейтрализовали летальный фактор *B. anthracis* [23], антитела к N-концевому домену Spike-белка нейтрализовали действие вируса SARS-CoV-2 [24]. В случае HlyII *B. cereus*, получение mAbs к HlyII LCTD позволило выявить штамм-специфическое нейтрализующее антитело HlyII C-20 [16].

Способность подавлять цитолитическую активность HlyII проверена как для антител, полученных после иммунизации денатурированным HlyII LCTD [15], так и для mAbs, полученных в данной работе после иммунизации неденатурированным препаратом HlyII LCTD. mAbs LCTD-71 и LCTD-75 подавляли активность HlyII *B. cereus* B-771 в 1.6 раза, LCTD-70 и LCTD-76 в 1.3 раза, LCTD-82 и LCTD-84 в 2 раза. Инкубация HlyII B-771 с антителом LCTD-83 приводила к снижению гемолитической активности в 40 раз. Результаты анализа подавления гемолитической активности mAb LCTD-83 представлены в табл. 1. Таким образом, показано, что штамм-специфическую защиту против гемолиза, вызванного HlyII, обеспечивает mAb LCTD-83, узнающее только олигомерные формы HlyII LCTD.

Эксперименты по подавлению гемолитической активности с помощью mAb HlyII C-20 показали, что на эффективность подавления влияет аминокислотный состав HlyII различных штаммов *B. cereus*, а именно наличие пролинового остатка в положении 324 у HlyII B-771 [16]. Для анализа защитной эффективности антитела LCTD-83 также использовали мутантные формы HlyII, описанные в работе [16]. В результате значение концентрации антитела, при которой происходит подавление 50% активности 1 ГЕ (гемолитическая единица) токсина, составило 6 нМ для HlyII B-771, 26 нМ для HlyII B-771 Pro324Leu, 42 нМ для HlyII ATCC14579 и 15.6 нМ для HlyII ATCC14579 Leu324Pro. Замена Pro324Leu в HlyII B-771 снижала эффективность подавления токсина антителами LCTD-83 в 4.3 раза, и напротив, замена Leu324Pro в HlyII ATCC14579 увеличивала эффективность подавления токсина в 2.7 раза. Ранее было показано, что на действие антитела HlyII C-20 влияют конформационные различия между ток-

синами, которые частично изменяют структуру самого эпитопа внутри C-концевого домена и модулируют уровень связывания mAb с токсином [16, 25]. На эффективность действия антитела LCTD-83 влияет положение C-концевого домена токсина относительно его основной части, которое, по-видимому, меняется в зависимости от наличия или отсутствия остатка пролина в положении 324 в аминокислотной последовательности токсина. В работе [25] показано, что замены аминокислотных остатков, расположенных на поверхности белковой глобулы и локализованных вне эпитопа, изменяют доступность эпитопов для антител, что значительно осложняет задачу поиска антивирулентных антител.

Полученное в данной работе mAb LCTD-83 подавляло гемолиз, вызванный HlyII, в зависимости от наличия или отсутствия Pro324 в первичной последовательности токсина. Известно, что, обладая собственной жесткой конформацией, пролин изгибает пептидную цепь, это приводит к изменению пространственной структуры всего белка, а, следовательно, и изменению эпитопной структуры, что влияет на способность антител взаимодействовать с антигеном [26–28]. Сворачивание белка в зависимости от состояния пролина контролируется ферментами пептидил-пролил-*цис-/транс*-изомеразы, которые катализируют *цис-/транс*-изомеризацию пептидных связей, предшествующих остаткам пролина. Изомеризация пролина определяет вирулентность патогенов [29, 30]. На примере исследования панели mAbs против гомологичной аминокислотной последовательности, входящей в состав гемолизинов HlyII и CytK2 *B. cereus* и Hla *S. aureus*, показано, что количество пролинов влияло на способность mAbs подавлять гемолиз [31].

Таблица 1. Уровень подавления гемолитической активности с помощью mAb LCTD-83

№	Токсин	Концентрация LCTD-83, нМ								
		1.9	3.8	7.5	15	30	60	120	240	480
1	HlyII B-771	11	25	60	92	100	100	100	100	100
2	HlyII B-771 Pro324Leu	0	0	0	11	63.8	83.5	100	100	100
3	HlyII ATCC14579	0	0	0	0	19.5	72.6	92.9	96.5	97.3
4	HlyII ATCC14579 Leu324Pro	0	8	22	49	75	99	100	100	100

Примечание: показан процент подавления активности 1 ГЕ (гемолитической единицы) гемолизина II различного происхождения.

Взаимодействие LCTD-83 с порами, образованными на мембранах эритроцитов. Фрагменты мембран, содержащие поры, образованные токсином NlyII B-771, получали при лизисе эритроцитов кролика. Неспецифическое связывание за счет возможных взаимодействий липидных компонентов мембраны с антителами и магнитными частицами предотвращали делипидизацией мембранных фрагментов с помощью обработки эндотоксин-экстрактором. Полученный препарат, содержащий поры (рис. 3, дорожка 4), инкубировали с магнитными частицами. Схема эксперимента представлена на рис. 4. В качестве отрицательного контроля использовали магнитные частицы с иммобилизованными несущественными антителами (изотип-контроль). Далее экспериментальные образцы подвергали электрофоретическому разделению в 10%-ном ПААГ, содержимое геля с образцами переносили на нитроцеллюлозную мембрану и проводили иммуноблоттинг. Показано, что mAbs LCTD-83, иммобилизованные на магнитных частицах, связывали поры, образованные NlyII B-771, о чем свидетельствовала белковая полоса, соответствующая мо-

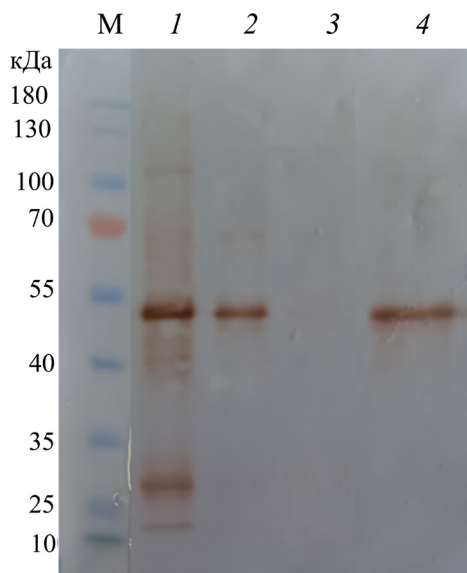


Рис. 3. Иммуноблоттинг NlyII: М – маркер молекулярного веса; 1 – мономерная форма; 2 – поры, взаимодействующие с иммобилизованными на магнитных частицах LCTD-83; 3 – изотип-контроль; 4 – поры после делипидизации. Дорожки окрашивали биотинилированными mAbs LCTD-71 [15] и стрептавидином, конъюгированным с пероксидазой хрена.

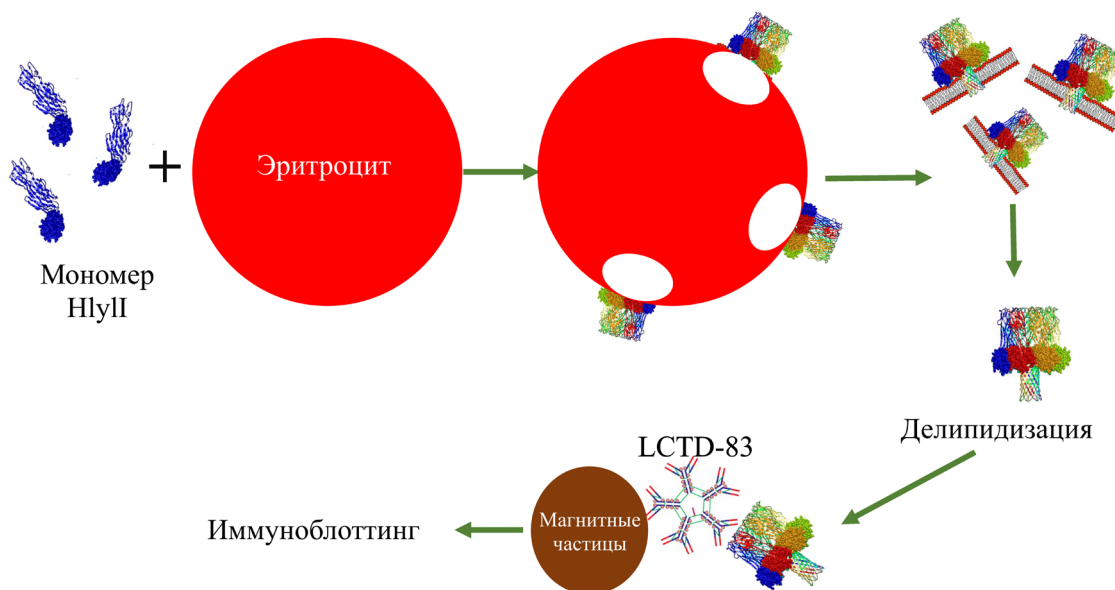


Рис. 4. Схема эксперимента. Преципитация LCTD-83 и пор, образованных NlyII B-771 в мембране эритроцита.

номерному токсину (рис. 3, дорожка 2), и отсутствие таковой в дорожке, в которую был нанесен материал из контрольного экспериментального образца (рис. 3, дорожка 3), в которой магнитные частицы с иммобилизованными несущественными антителами инкубировали с делипидизированными порами. Таким образом, антитела LCTD-83 взаимодействовали с порой, образованной в мембране эритроцита токсином HlyII B-771.

mAb HlyIIС-20 предотвращало образование олигомерных форм и взаимодействовало с мономерной формой токсина [16], тогда как mAb LCTD-83 взаимодействовало с формой токсина, связанной с мембраной, предотвращая лизис эритроцитов. Эффективность защиты от гемолиза mAb HlyIIС-20 и mAb LCTD-83 была более эффективной для штамма HlyII B-771, в последовательности которого в положении 324 присутствует пролин, в отличие от лейцина в этой позиции у HlyII штамма *B. cereus* ATCC14579 [16].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Рекомбинантные белки. Получение HlyII штаммов *B. cereus* ATCC14579, ATCC4342 и B-771, а также их мутантных форм HlyII ATCC14579 Leu324Pro и HlyII B-771 Pro324Leu было описано ранее в работе [16]. Получение денатурированной формы HlyII LCTD и неденатурированной формы, слитой с шапероном SlyD, описано ранее в работе [15].

Гибридомы, секретирующие mAbs против HlyII LCTD. Иммунизацию рекомбинантным белком проводили 2–3-месячным мышам линии BALB/c (15 самок, вес ~20 г, получены из Питомника лабораторных животных ФИБХ РАН, г. Пущино). mAbs получали гибридомной технологией [32], скрининг иммунных сывороток и клеточных клонов проводили, как описано в работе [15].

Очистка mAbs класса М. Полученные mAbs нарабатывали в надклеточных супернатантах при культивировании соответствующей гибридомы. После двукратного осаждения насыщенным раствором сульфата аммония раствор антител диализовали против PBS и наносили на колонку с сефакилом S-200 (100 × 1.5 см) (Pharmacia, Швеция). Хроматографию в PBS проводили со скоростью 0.5 мл/мин. В результате получали

гомогенный препарат антител, который при разделении элюировался со свободным объемом колонки.

Скрининг защитной активности антител против гемолиза, вызванного HlyII. Для получения эритроцитов проводили забор крови из краевой ушной вены кролика в консервирующий раствор (2%-ный лимоннокислый цитрат натрия, 3%-ная глюкоза, 0.015%-ный левомицетин, pH 5.5). Процедуру проводили в виварии Института биофизики клетки РАН – обособленного подразделения ФГБУН “Федеральный исследовательский центр “Пущинский научный центр биологических исследований” РАН. Для получения эритроцитов полученную суспензию отмывали в PBS центрифугированием (200 g, Life Science, Китай) не менее 3 раз до получения прозрачного, неокрашенного супернатанта. Для получения суспензии эритроциты отбирали из осадка.

mAbs в диапазоне концентраций 0–2 мкМ, полученных путем двукратных последовательных разведений, инкубировали с 1 ГЕ токсина при 37°C в течение 15 мин. Затем добавляли равный объем 1%-ной суспензии эритроцитов кролика, смесь дополнительно инкубировали в течение 30 мин при той же температуре. После инкубации эритроциты отделяли центрифугированием, а надосадочную жидкость использовали для спектрофотометрического анализа уровня гемолиза при измерении оптической плотности на планшетном спектрофотометре iMark (США) при длине волны 541 нм. Уровень гемолиза выражали в процентах от гемолиза, где максимальное значение оптической плотности супернатанта после реакции принимали за 100%. Для характеристики подавляющего (защитного) действия mAbs рассчитывали значение концентрации антитела, при которой происходит подавление 50% активности 1 ГЕ токсина.

Иммобилизация LCTD-83 на магнитные частицы. mAb иммобилизовали с плотностью 1 мг/мл суспензии на магнитные частицы с СООН-группой (Sileks, Россия), согласно протоколу производителя [33].

Иммунопреципитация пор, образованных HlyII, на мембранах эритроцитов. Суспензию эритроцитов (4%) в PBS лизировали HlyII B-771 (1.25 мкМ в 100 мкл суспензии) в течение 40 мин при 37°C, инкубируя реакционную смесь до пол-

ного лизиса. Далее реакционную смесь центрифугировали (14 000 g, Life Science, Китай) не менее 3 раз до получения белого осадка. После каждого осаждения осадок ресуспендировали в PBS. Полученный препарат мембран в объеме 1 мл подвергали обработке эндотоксин-экстрактором (Sileks, Россия) согласно инструкции производителя [34].

Магнитные частицы с иммобилизованными антителами LCTD-83 для предотвращения неспецифического связывания предварительно инкубировали с раствором 1%-ного желатина в PBST (PBS, 0.1% Tween-20) с использованием мульти-ротатора (BioSun, Латвия), 13 об/мин, в течение 1.5 ч при комнатной температуре. К полученному препарату, содержащему поры, образованные HlyII B-771, в объеме 150 мкл (0.125 мкМ) добавляли Tween-20 до 0.5% и инкубировали с магнитными частицами (12 мкл) с иммобилизованными mAbs LCTD-83 при перемешивании с использованием мульти-ротатора 13 об/мин, в течение 1.5 ч при комнатной температуре. В качестве отрицательного контроля использовали магнитные частицы с иммобилизованными несущественными моноклональными антителами (изотип-контроль). После инкубации магнитные частицы отмывали не менее 5 раз PBST. К осадку частиц добавляли буфер для нанесения образцов. После кипячения образцов препараты подвергали электрофоретическому разделению в 10%-ном ПААГ [35]. Иммуноблоттинг проводили, как описано в работе [36].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведен поиск антител, защищающих от действия HlyII, среди панели, полученной против большого C-концевого фрагмента (Met225–Ile412) гемолизина II *B. cereus*. Найдено mAb LCTD-83, обладающее штамм-специфической нейтрализующей активностью. Взаимодействие антитела с формой токсина, связанной с мембранами, идентифицированное иммунопреципитацией, свидетельствовало о том, что в составе поры участок, расположенный между коровой частью и C-концевым доменом, становится доступным для взаимодействия с mAb LCTD-83. Подавление этим mAb гемолиза HlyII штамма B-771, в котором присутствует Pro324, было наиболее эффективным. Выявлен механизм подавления цитолитической активности HlyII mAb LCTD-83, который

заключается в блокировании уже образовавшейся поры и препятствии лизису клетки. Возможны различные механизмы подавления гемолиза, вызванного HlyII при участии mAb, от предотвращения олигомеризации мономеров до блокирования образовавшейся поры. По-видимому, для эффективного подавления гемолиза, вызванного HlyII, необходимо использование различных mAbs, взаимодействующих с токсином на разных этапах порообразования.

Понимание возможных механизмов подавления действия порообразующего токсина, а также поиск факторов, влияющих на эффективность этого подавления, играет важную роль при поиске средств, способных защитить ослабленный организм при развитии оппортунистической инфекции. LCTD-83 демонстрировало потенциальные возможности как прототип препарата, подавляющего гемолитическую активность HlyII.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные и институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Исследования на животных одобрены Комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных ФИБХ РАН (протокол № 998/24 от 21.09.2024).

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

О.С. Ветрова, Н.В. Руденко, А.П. Каратовская разработали методологию исследования, а также подготовили рукопись; О.С. Ветрова, Н.В. Руденко, А.П. Каратовская, А.В. Замятина, А.С. Нагель, Ж.И. Андреева-Ковалевская, А.В. Сиунов проводили исследование; Ф.А. Бровка, А.С. Солонин курировали данные.

А.П. Каратовская и А.В. Замятина подготовили рукопись к публикации. Окончательный вариант рукописи был утвержден всеми авторами.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Thery M., Cousin V.L., Tissieres P., Enault M., Morin L. // *Front. Pediatr.* 2022. V. 10. P. 978250. <https://doi.org/10.3389/fped.2023.1178208>
2. Logan N.A. // *J. Appl. Microbiol.* 2012. V. 112. P. 417–429. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05204.x>
3. Messelthäuser U., Ehling-Schulz M. // *Curr. Clin. Microbiol. Rep.* 2018. V. 5. P. 120–125. <https://doi.org/10.1007/s40588-018-0095-9>
4. McDowell R.H., Sands E.M., Friedman H. // In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459121/>
5. 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>
6. Ramarao N., Sanchis V. // *Toxins (Basel)*. 2013. V. 5. P. 1119–1139. <https://doi.org/10.3390/toxins5061119>
7. Shenggang D., Yue Y., Yunchang G., Donglei L., Ning L., Zhitao L., Jinjun L., Yuyan J., Santao W., Ping F., Jikai L., Hong L. // *China CDC Weekly*. 2023. V. 5. P. 737–741. <https://doi.org/10.46234/ccdcw2023.140>
8. European Food Safety Authority (EFSA), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) // *EFSA J.* 2023. V. 21. P. e8442. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.8442>
9. Dietrich R., Jessberger N., Ehling-Schulz M., Märklbauer E., Granum P.E. // *Toxins*. 2021. V. 13. P. 98. <https://doi.org/10.3390/toxins13020098>
10. 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>
11. Hu H., Liu M., Sun S. // *Drug Des. Devel. Ther.* 2021. V. 15. P. 3773–3781. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S322393>
12. Miles G., Bayley H., Cheley S. // *Protein Sci.* 2002. V. 11. P. 1813–1824. <https://doi.org/doi.org/10.1110/ps.0204002>
13. Chow S.K., Casadevall A. // *Toxins (Basel)*. 2012. V. 4. P. 430–454. <https://doi.org/10.3390/toxins4060430>
14. 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. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2020. V. 46. P. 321–326. <https://doi.org/10.31857/S013234232003029X>
15. 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>
16. Rudenko N., Nagel A., Zamyatina A., Karatovskaya A., Salyamov V., Andreeva-Kovalevskaya Z., Siunov A., Kolesnikov A., Shepelyakovskaya A., Boziev K., Melnik B., Brovko F., Solonin A. // *Toxins (Basel)*. 2020. V. 12. P. 806. <https://doi.org/10.3390/toxins12120806>
17. Valeva A., Palmer M., Bhakdi S. // *Biochemistry*. 1997. V. 36. P. 13298–13304. <https://doi.org/10.1021/bi971075r>
18. Song L., Hobaugh M.R., Shustak C., Cheley S., Bayley H., Gouaux J.E. // *Science*. 1996. V. 274. P. 1859–1866. <https://doi.org/10.1126/science.274.5294.1859>
19. Menestrina G., Serra M.D., Prévost G. // *Toxicon*. 2001. V. 39. P. 1661–1672. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(01\)00153-2](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(01)00153-2)
20. von Hoven G., Qin Q., Neukirch C., Husmann M., Hellmann N. // *Biol. Chem.* 2019. V. 400. P. 1261–1276. <https://doi.org/10.1515/hsz-2018-0472>
21. Rasool S., Martinez-Coria H., Wu J.W., LaFerla F., Glabe C.G. // *J. Neurochem.* 2013. V. 126. P. 473–482. <https://doi.org/10.1111/jnc.12305>
22. Adekar S.P., Takahashi T., Jones R.M., Al-Saleem F.H., Ancharski D.M., Root M.J., Kapadnis B.P., Simpson L.L., Dessain S.K. // *PLoS One*. 2008. V. 3. P. e3023. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003023>
23. Reason D., Liberato J., Sun J., Camacho J., Zhou J. // *Toxins (Basel)*. 2011. V. 3. P. 979–990. <https://doi.org/10.3390/toxins3080979>
24. Chi X., Yan R., Zhang J., Zhang G., Zhang Y., Hao M., Zhang Z., Fan P., Dong Y., Yang Y., Chen Z., Guo Y., Zhang J., Li Y., Song X., Chen Y., Xia L., Fu L., Hou L., Xu J., Yu C., Li J., Zhou Q., Chen W. // *Science*. 2020. V. 369. P. 650–655. <https://doi.org/10.1126/science.abc6952>

25. 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. 24. P. 16437.
<https://doi.org/10.3390/ijms242216437>
26. 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>
27. Schmidpeter P.A., Koch J.R., Schmid F.X. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2015. V. 1850. P. 1973–1982.
<https://10.1016/j.bbagen.2014.12.019>
28. Vakilian M. // *Clin. Immunol.* 2022. V. 234. P. 108896.
<https://doi.org/10.1016/j.clim.2021.108896>
29. Ünal C.M., Steinert M. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2014. V. 78. P. 544–571.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00015-14>
30. 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>
31. 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>
32. Köhler G., Milstein C. // *Nature*. 1975. V. 256. P. 495–497.
33. SileksMag-COOH. Карбоксилированные магнитные частицы для прямой ковалентной иммобилизации антител, белков, ферментов, нуклеотидных зондов. Версия 210217.
https://sileks.com/assets/files/protocol-for-kits/sileksmag-cooh-v_210217-rus.pdf
34. Endotoxin Extractor: полимер для удаления эндотоксинов из растворов. ООО “Силекс”, 2007–2020.
<https://sileks.com/assets/files/protocol-for-kits/endotoxin-extractor-ver201129.pdf>
35. Laemmli U.K. // *Nature*. 1970. V. 227. P. 680–685.
<https://doi.org/doi.org/10.1038/227680a0>
36. Zamyatina A.V., Rudenko N.V., Karatovskaya A.P., Shepelyakovskaya A.O., Siunov A.V., Andreeva-Kovalevskaya Zh.I., Nagel A.S., Salyamov V.I., Kolesnikov A.S., Brovko F.A., Solonin A.S. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2020. V. 46. P. 1214–1220.
<https://doi.org/10.31857/S013234232006038X>

Monoclonal Antibody Against the Oligomeric Form of the Large C-Terminal Fragment (Met225–Ile412) of Hemolysin II of *Bacillus cereus* are Capable of Strain-Specific Suppression of Hemolytic Activity

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

[#] E-mail: nrudkova@mail.ru

* Branch of the Federal State Budgetary Institution of Science, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry Russian Academy of Sciences, prosp. Nauki 6, 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

Pore-forming toxin hemolysin II (HlyII) secreted by the gram-positive bacterium *Bacillus cereus* is one of the main pathogenic factors of this microorganism. The action of HlyII leads to cell lysis due to pore formation on membranes. Monoclonal antibodies against the large C-terminal fragment (Met225–Ile412, HlyII_{LCTD}) of HlyII *B. cereus* were obtained using hybridoma technology with the use of a recombinant soluble form of HlyII_{LCTD} as an antigen, which was obtained using the chaperone protein SlyD. Monoclonal antibody LCTD-83 inhibited the hemolytic activity of HlyII, the degree of protection depended on the presence/absence of proline at position 324 in the primary sequence of the toxin. The antibody most effectively inhibited erythrocyte hemolysis caused by HlyII B-771, in the sequence of which Pro is present at position 324 instead of Leu. It was shown that the LCTD-83 antibody interacts with the formed pores on the erythrocyte membranes, thereby blocking the possible release of intracellular contents. HlyII and its mutant forms were obtained using recombinant producer strains of *Escherichia coli* BL21 (DE3). The ability of antibodies to recognize antigens was characterized by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoblotting; immunoprecipitation was used to demonstrate interaction with the membrane pores formed by the toxin. LCTD-83 interacted less effectively with the full-length toxin than with HlyII_{LCTD}, which confirmed the fact that pore formation is accompanied by a change in the toxin conformation. In this regard, antibodies interacting with its oligomeric form are promising for suppressing the cytolytic effect of hemolysin II. LCTD-83 has the potential to identify ways to neutralize the toxin.

Keywords: pore-forming toxin, hybridoma, neutralizing monoclonal antibodies, hemolysis, protein conformation, mutagenesis, immunoprecipitation