

На правах рукописи



Замятина Анна Валерьевна

**Иммунохимический анализ С-терминального домена
гемолизина II *Bacillus cereus***

1.5.4 – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Пущино – 2024

Работа выполнена в Пушкинском филиале Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)» на базе лаборатории иммунохимии филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Научный Руденко Наталья Васильевна,

руководитель: кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории иммунохимии, филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Официальные Дыкман Лев Абрамович,

оппоненты: доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунохимии, руководитель группы иммунотехнологии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра “Саратовский научный центр Российской академии наук”

Шляпников Юрий Михайлович,

доктор химических наук, заведующий лабораторией наноструктур и нанотехнологий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук

Ведущая Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный
организация: центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Защита диссертации состоится « » 2025 года в на заседании Диссертационного совета 24.1.241.02 при ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» по адресу: 109240, г. Москва, Устьинский проезд, д. 2/14.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» по адресу: 109240, г. Москва, Устьинский проезд, д. 2/14 и на сайте организации <https://ion.ru>.

Автореферат разослан « » 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Шумакова А.А.

1. Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования

Bacillus cereus - условно-патогенная грамположительная анаэробная спорообразующая бактерия, обитающая в разнообразных средах. *B. cereus* способны вызывать пищевые токсикоинфекции желудочно-кишечного тракта, в том числе эметический и диарейный синдромы, а также при ослаблении иммунитета множество других тяжелых и часто смертельных клинических инфекций, таких как остеомиелит, септицемия, пневмония, абсцесс печени и менингит [Марусич, О.С., 2018; Попова О.В., 2022]. Факторами патогенности *B. cereus* являются секретируемые токсины. Согласно ежегодному отчету Европейского агентства по безопасности пищевых продуктов (EFSA), 13–30% вспышек пищевых отравлений в Европе, вызванных бактериальными токсинами, связаны с *B. cereus* [Yang, S., 2023]. Эти бактерии являются одной из наиболее распространенных причин внутрибольничных инфекций, их относят к группе условно-патогенных, проявляющих патогенность по отношению к ослабленным организмам и недоношенным новорожденным [Glasset, B., 2018; Messelhäuser, U., 2018].

Одним из основных факторов патогенности *B. cereus* является гемолизин II (НлуII), относящийся к классу β -складчатых каналообразующих цитолизиннов. НлуII продуцируется бактерией в форме мономеров, которые в инфицированном организме олигомеризуются на клеточных мембранах, встраиваются в фосфолипидный слой и образуют пору, что приводит к гибели клеток [Ramarao, N., 2013].

НлуII отличается от других токсинов наличием на С-конце молекулы избыточности из 94 аминокислотных остатков с молекулярной массой около 10 кДа (С-терминальный домен, НлуIICTD). Делеция НлуIICTD снижает гемолитическую активность токсина в 8 раз [Miles, G., 2002]. В связи с этим актуально выяснение возможной функциональной роли С-конца гемолизина II.

С-концевой домен обладает уникальной β -складчатой бочкообразной пространственной структурой, способной образовывать *цис- транс*-изомерные формы. Исследование С-терминального домена гемолизина II *B. cereus* позволит определить его функциональную роль в порообразовании и патогенезе. В ходе выполнения исследовательской работы будет использован рекомбинантный препарат НлуIICTD для получения моноклональных антител (МА) к С-концевому участку гемолизина II *B. cereus*, с помощью которых предполагается выяснить его возможную функциональную роль.

Цель работы и основные задачи исследования

Целью работы являлся иммунохимический анализ С-терминального домена гемолизина II, секретируемого *B. cereus*, и выявление его возможной роли в процессе порообразования.

Для достижения поставленной цели были определены следующие **задачи исследования:**

1. Получить и охарактеризовать моноклональные антитела против HlyIICTD. Определить расположение участков связывания полученных антител на молекуле рекомбинантного белка.
2. Исследовать полученные антитела на предмет токсин-нейтрализующей активности.
3. Показать принципиальную возможность взаимодействия HlyIICTD с клеточными мембранами.
4. С помощью антител показать возможность образования олигомерных форм HlyIICTD в присутствии клеточных мембран и липосом.
5. Показать возможное действие HlyIICTD на клетки иммунной системы.

Научная новизна и практическая значимость работы

Получены 24 стабильных гибридных клон, продуцирующих моноклональные антитела к различным участкам рекомбинантного препарата HlyIICTD.

Высокая специфичность полученных моноклональных антител позволила использовать их как инструмент исследования для определения функциональной роли HlyIICTD. Определен эпитоп антитела HlyIIIC-15, распознающего тромбиновый сайт. Обнаружено антитело HlyIIIC-20, способное подавлять цитолитическую активность гемолизина II. Штамм-специфическая нейтрализация токсина была продемонстрирована в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Впервые, с использованием МА, продемонстрирована способность HlyIICTD связываться с клеточными мембранами. Определены количественные показатели этого взаимодействия с эритроцитами различной природы. Также, впервые продемонстрирована способность HlyIICTD образовывать олигомерные формы в присутствии эритроцитов.

Впервые исследовано действие HlyIICTD на клетки иммунной системы. С-терминальный домен наиболее эффективно разрушал клетки Т-клеточного происхождения, в меньшей степени макрофагального происхождения и не действовал на клетки В-клеточного происхождения. Определены количественные характеристики взаимодействия HlyIICTD с клетками иммунной системы.

Данная работа вносит вклад в понимание механизма действия гемолизина II *B. cereus*. Результаты, полученные в работе, указывают на то, что высокая гемолитическая активность гемолизина II в сравнении с другими, гомологичными ему представителями β -пороформирующих токсинов, обеспечивается присутствием С-терминального домена. Обладая способностью независимо связываться с мембранами клетки-мишени в составе полноразмерного токсина, HlyIICTD усиливает его гемолитическую активность.

Схожесть симптоматики заболеваний, вызванных бактериями, патогенными факторами которых являются гемолитические токсины, например, гемолизин II *B. cereus* и α -токсин *S. aureus*, делает необходимой диагностику заболевания для выбора терапевтической стратегии, а, следовательно, точное определение возбудителя инфекции. В связи с этим, актуальной является задача разработки диагностических тест-систем для определения гемолизина II, как одного из ключевых вирулентных факторов *B. cereus*. Полученная представительная панель специфических моноклональных антител может быть использована для их разработки.

Выбор участка молекулы в качестве терапевтической мишени важен для разработки высокоспецифичных и безвредных вакцин, а также терапевтических и диагностических антител. Правильный выбор терапевтической мишени позволит иммунной системе распознавать специфические патогены и реагировать на них. В развитии этого направления важно получение и определение механизмов защитного действия антитела против NlyIICTD, состоящего в блокировании гемолитической активности токсина. Этот результат может быть полезным как при создании миметиков - действующих частей вакцин - так и препаратов, нейтрализующих действие NlyII *B. cereus*, на фоне растущей антибиотикорезистентности микроорганизмов.

Результаты, полученные в данной работе, в частности использование моноклональных антител как инструмента исследования механизмов функционирования токсина белковой природы, используются в учебном процессе как на теоретических, так и на практических занятиях на факультете БиомедФармТехнологий Пущинского филиала Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)» (ПущГЕНИ филиал РОСБИОТЕХ).

Методология и методы исследования

В данном диссертационном исследовании использовались методы биохимического, молекулярно-генетического и иммунохимического анализа. Основным объектом исследования являлся С-терминальный домен пороформирующего токсина *B. cereus* гемолизина II.

Положения, выносимые на защиту

1. Полученная панель моноклональных антител взаимодействует с различными участками на молекуле рекомбинантного С-терминального домена гемолизина II *B. cereus*, причем антитела линии NlyIIС-20 оказывают штамм-специфическую защиту эритроцитов от гемолитического действия токсина.
2. NlyIICTD способен ориентированно связываться с клеточными мембранами с образованием олигомерных форм с константой аффинности около $5,3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$.
3. NlyIICTD оказывает литическое действие на Т-клетки (Jurkat) и макрофаги (J774 и ТНР-1), взаимодействуя с мембранами этих клеток с константами аффинности равными $1,96 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ и около $6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ соответственно.

Апробация результатов исследования

По теме диссертации опубликовано 20 научных работ, из них 5 статей в периодических изданиях из перечня ведущих рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК РФ, и 15 публикаций в сборниках докладов и тезисов в материалах российских и международных научных конференций.

Связь с государственными программами

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ № 19-04-00592.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа содержит введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, выводы и список литературы. Работа изложена на 133 страницах, содержит 32 рисунка, 9 таблиц и 4 формулы. Список литературы включает 247 источников отечественной и зарубежной литературы.

2. Основное содержание работы

2.1. Получение стабильных гибридных клонов-продуцентов моноклональных антител к HlyIICTD *B. cereus*

Все рекомбинантные белки, используемые в данной работе, были предоставлены сотрудниками лаборатории молекулярной микробиологии института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук «Федерального исследовательского центра «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН» под руководством д.б.н. Солонина А.С.

Гибридные клоны, продуцирующие МА к С-терминальному домену гемолизина II *B. cereus*, получали по методу Келлера и Мильштейна [Kohler, G., 1975]. В качестве антигена использовали рекомбинантный белок HlyIICTD, первичная структура которого включала последовательность интактного С-терминального домена, а также вспомогательные участки: линкер, тромбиновый сайт и шестигистидиновый тэг (рис. 1).

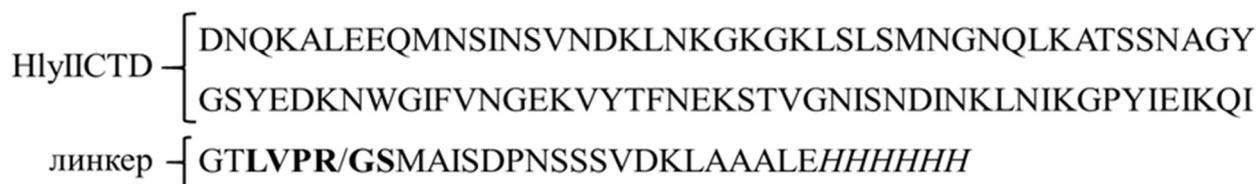


Рис. 1. Аминокислотная последовательность HlyIICTD, клонированная из HlyII *B. cereus* ATCC 14579^T в pET29b. Молекулярная масса клонированного HlyIICTD, 13906,59 Да. Жирными буквами выделен тромбиновый сайт, курсивом обозначен участок с шестью гистидинами.

Титры сывороток иммунизированных мышей определяли методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА) на планшетах с иммобилизованным антигеном из раствора с концентрацией 1 мкг/мл. Для получения гибридом-продуцентов специфических МА использовали спленоциты мыши, сыворотка которой максимально взаимодействовала с антигеном, используемым для иммунизации (титр 1:2 000 000).

В результате было отобрано 24 гибридомных клона, стабильно продуцирующих моноклональные антитела против HlyIICTD.

2.2. Взаимодействие моноклональных антител с рекомбинантными препаратами HlyIICTD и HlyII

Все полученные антитела эффективно взаимодействовали с денатурированными препаратами HlyII и HlyIICTD в иммуноблоттинге. На рисунках 2А и 2Б представлены иммуноэлектрофореграммы, на которых каждое из полученных МА интенсивно окрашивало белковую полосу с молекулярной массой около 14 кДа, соответствующую HlyIICTD. На рисунке 2В каждое из полученных МА интенсивно окрашивало белковую полосу с молекулярной массой около 48 кДа, соответствующую полноразмерному HlyII.

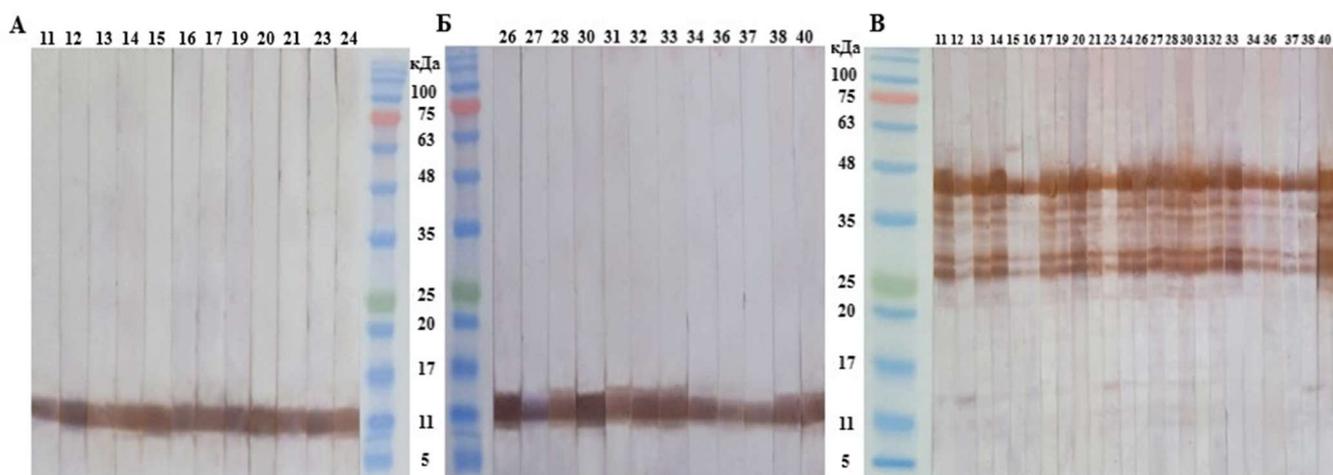


Рис. 2. А, Б - Иммуноблоттинг HlyIICTD с МА; В - Иммуноблоттинг HlyII с МА. Номера антител указаны над треками.

2.3. Выявление участков связывания моноклональных антител на поверхности HlyIICTD

В состав рекомбинантного белка, используемого для иммунизации животных при получении гибридомных клонов, кроме 94 аминокислотных остатков HlyIICTD входили дополнительные участки. В связи с этим возможно наличие в полученной панели антител, распознающих эпитопы, не принадлежащие HlyIICTD. Для выявления участков взаимодействия HlyIICTD с МА были использованы рекомбинантные белки различного состава, содержащие и не содержащие линкер, С-терминальный домен и 6-гистидиновый тэг. Взаимодействие МА с рекомбинантными препаратами анализировали ИФА, сорбируя препараты на иммунопланшеты из раствора с концентрацией 1 мкг/мл. Полученные результаты также подтверждали иммуноблоттингом после электрофоретического разделения рекомбинантных препаратов и окрашиванием каждым из полученных МА.

МА HlyIIС-15, HlyIIС-34 и HlyIIС-37 взаимодействовали с HlyIICTD, который не содержал С-терминальный домен, но содержал сайт узнавания тромбином, линкер и 6-гистидиновый тэг. Препарат HlyII В771, представляющий собой полноразмерный токсин без

дополнительных участков, включающий в себя НlyIICTD, распознавался антителами, не узнающими НlyIIACTD. Только НlyIIC-15, НlyIIC-34 и НlyIIC-37 взаимодействовали с препаратом PlcR (регулятор транскрипции), содержащим тромбиновый сайт, линкер и 6-гистидиновый тэг. Результаты ИФА и иммуноблоттинга представлены в таблице 1.

Таблица 1. Расположение эпитопов МА на рекомбинантном НlyIICTD.

Участки рекомбинантного белка	Моноклональные антитела
НlyIICTD	НlyIIC-11, НlyIIC-12, НlyIIC-13, НlyIIC-14, НlyIIC-16, НlyIIC-17, НlyIIC-19, НlyIIC-20, НlyIIC-21, НlyIIC-23, НlyIIC-24, НlyIIC-26, НlyIIC-28, НlyIIC-30, НlyIIC-31, НlyIIC-32, НlyIIC-33, НlyIIC-36, НlyIIC-38, НlyIIC-40
Тромбиновый сайт	НlyIIC-15
Линкер	НlyIIC-34, НlyIIC-37
6-гистидиновый тэг	-

2.4. Локализация эпитопа, узнаваемого моноклональным антителом НlyIIC-15

Методом фагового дисплея был определен эпитоп на молекуле рекомбинантного белка для антитела НlyIIC-15, взаимодействующего с линкерным пептидом. Фаговый дисплей — это метод селекции, при котором библиотека вариантов пептидов экспрессируется на поверхности вирионов фагов, а генетический материал, кодирующий каждый вариант, находится внутри фаговой частицы. В исследовании была использована библиотека случайных двенадцатичленных пептидов (New England Biolabs, США), отображаемых на фаге M13KE и экспонированных в составе белка рIII бактериофагов. Отбор фагов, взаимодействующих с МА НlyIIC-15, проводили, инкубируя пептидную библиотеку с антителами, сорбированными на иммунологических планшетах, с последующей элюцией связавшихся фагов и их амплификацией. После проведения трех раундов аффинной селекции из неамплифицированного элюата последнего раунда были отобраны 30 фаговых клонов, каждый из которых был проанализирован на предмет эффективности взаимодействия с НlyIIC-15. В результате были отобраны фаговые клоны, наиболее эффективно взаимодействующие с антителами, ДНК которых и была секвенирована.

После выравнивания последовательностей всех анализированных пептидов были обнаружены четыре консенсусных аминокислотных остатка из последовательности тромбинового сайта, входящие в состав эпитопа НlyIIC-15 – LVPR. Эпитоп НlyIIC-15 был подтвержден иммуноблоттингом с рекомбинантными белками, содержащими и не содержащими тромбиновый сайт, результат представлен на рисунке 3. НlyIIC-15 формировало иммунные комплексы с препаратами, содержащими тромбиновый сайт в последовательности рекомбинантных белков. При этом антитело не окрашивало препараты, не содержащие

тромбиновый сайт, такие как полноразмерный HlyII дикого типа и HlyIIR (регулятор экспрессии).

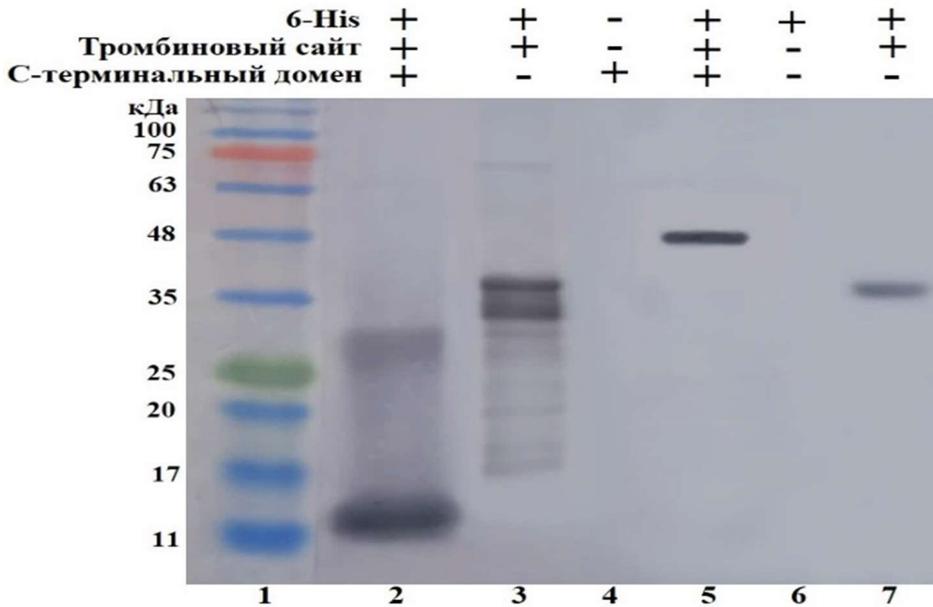


Рис. 3. Иммуноблоттинг с использованием HlyIIC-15.

1 - маркерные белки;
2 - HlyIICTD;
3 - HlyIIΔCTD;
4 - Гемолизин II *B. cereus* B771, клонированный в *B. subtilis*;
5 - HlyII6His;
6 - HlyIIR;
7 - PlcR.

2.5. Токсин-нейтрализующее действие моноклонального антитела HlyIIC-20 в экспериментах *in vitro*

Каждое из антител было проверено на предмет нейтрализации гемолитической активности токсина. Было выявлено HlyIIC-20, способное подавлять гемолитическую активность, что проверено на гемолизинах *B. cereus* штаммов ATCC 14579^T, B771 и ATCC 4342. На рисунке 4 сплошными линиями показаны зависимости влияния HlyIIC-20 на гемолиз эритроцитов после предварительной инкубации гемолизинами HlyII ATCC 14579^T (рис. 4А), HlyII B771 (рис. 4Б) и HlyII ATCC 4342 (рис. 4В) с HlyIIC-20. Пунктирными линиями указано действие гемолизинами, соответствующих штаммов, на эритроциты кролика без антител.

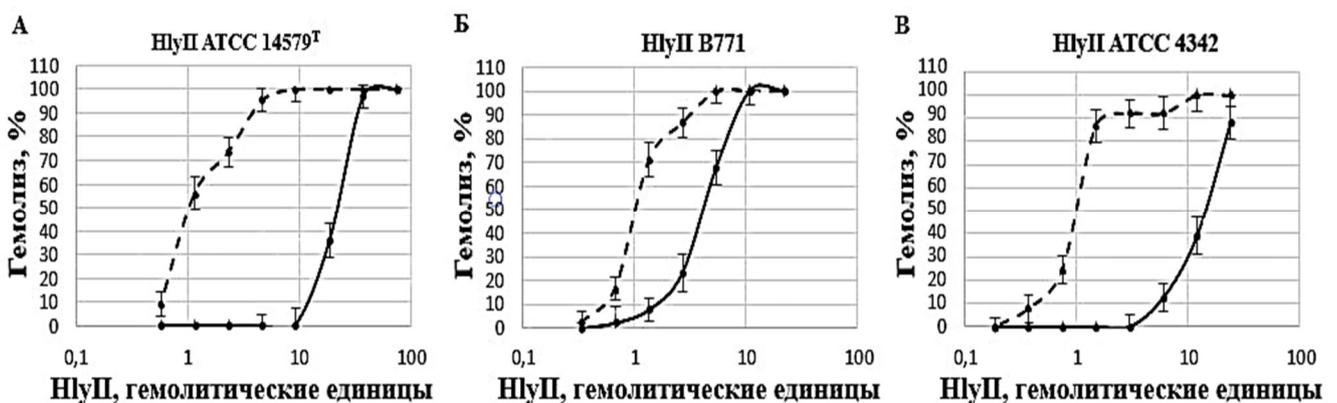


Рис. 4. Подавление антителом HlyIIC-20 гемолиза эритроцитов кролика, вызванного различными гемолизинами. А - HlyII ATCC 14579^T до (пунктирная линия) и после (сплошная линия) добавления HlyIIC-20; Б - HlyII B771; В - HlyII ATCC 4342. Результаты представлены как $Mean \pm SD$, $n=5$.

Эффективность токсин-нейтрализующего действия HlyIIC-20 различалась по отношению к гемолизинам исследованных штаммов. Наиболее эффективно HlyIIC-20 защищал эритроциты от действия HlyII ATCC 14579^T, в меньшей степени подавляя гемолитическую

активность HlyII ATCC 4342. Если 6,7 μM МА практически полностью подавляли гемолиз, вызванный HlyII ATCC 14579^T, в диапазоне токсина от 1 до 10 гемолитических единиц (HU), то та же концентрация антител подавляла гемолиз только до 5 гемолитических единиц в случае токсина, секретируемого *B. cereus* штамма ATCC 4342. В случае HlyII, секретируемого штаммом *B. cereus* В771, гемолитическая активность подавлялась менее всего. При используемой концентрации антитела эффективность гемолиза HlyII В771 также снижалась, но не происходило полного подавления гемолиза.

2.6. Определение константы аффинности взаимодействия моноклонального антитела HlyIIС-20 с рекомбинантными препаратами гемолизина

Для оценки сродства HlyIIС-20 по отношению к исследуемым токсинам определяли константы аффинности ($K_{\text{афф}}$) непрямым твердофазным ИФА по методу Битти. Были определены $K_{\text{афф}}$ HlyIIС-20 с HlyIIСТD, HlyII ATCC 14579^T и HlyII В771 по взаимодействию с иммобилизованными препаратами этих рекомбинантных белков. Для определения $K_{\text{афф}}$ строили графики зависимости оптической плотности (A_{490}) от концентрации МА в логарифмических координатах при двукратно различающихся концентрациях антигена. Полученные графики имели сигмоидный характер, что позволило определить концентрации антител, соответствующие 100% связыванию и 50% связыванию с сорбированным антигеном (рис. 5). Вычисляли значение соответствующих констант аффинности с помощью формулы:

$$K_{\text{афф}} = \frac{n - 1}{n \times [\text{HlyIIС-20}'] \times [\text{HlyIIС-20}]},$$

Где n - отношение концентраций иммобилизованного на планшете токсина, в данном случае равно 2;

$[\text{HlyIIС-20}']$ – концентрация МА, при которой связывание составляло 50% от максимального при сорбции антигена 10 нг/лунку;

$[\text{HlyIIС-20}]$ – концентрация МА, при которой связывание составляло 50% от максимального при сорбции антигена 20 нг/лунку.

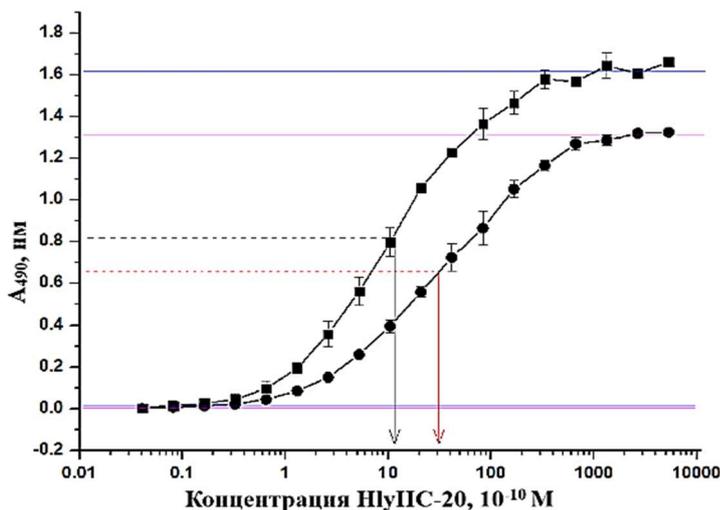


Рис. 5. График титрования антитела HlyIIС-20 для определения его константы аффинности с 10 (●) и 20 (■) нг/лунку HlyII ATCC 14579^T. Стрелками показано определение концентрации МА HlyIIС-20, соответствующего 50% связыванию при соответствующей концентрации HlyII. Результаты представлены как $Mean \pm SD$, $n=5$.

Значения $K_{\text{афф}}$, характеризующих взаимодействие HlyIIС-20 с рекомбинантными полипептидами представлены в таблице 2.

Таблица 2. Константы аффинности при взаимодействии HlyIIС-20 с HlyIICTD, HlyII ATCC 14579^T и HlyII B771.

Полипептид	$K_{\text{афф}}$
HlyIICTD	$3,4(\pm 0,1) \times 10^9 \text{ M}^{-1}$
HlyII ATCC 14579 ^T	$2,6(\pm 0,1) \times 10^9 \text{ M}^{-1}$
HlyII B771	$1,8(\pm 0,1) \times 10^9 \text{ M}^{-1}$

Полученные значения $K_{\text{афф}}$ свидетельствовали о том, что степень доступности эпитопа для HlyIIС-20 в природных гемолизинах различна и отличается от сродства к рекомбинантному HlyIICTD. Эти данные коррелируют с данными по подавлению гемолитической активности токсинов. HlyIIС-20 более эффективно связывалось с гемолизином ATCC 14579^T и активнее подавляло гемолиз, вызванный этим токсином.

2.7. Влияние аминокислотного остатка в положении 324 (Leu/Pro) в HlyII на способность HlyIIС-20 подавлять гемолитическую активность токсина

Используемые природные штаммы имеют различия в аминокислотных последовательностях. В частности, штаммы *B. cereus* B771 и 14579^T, для которых наблюдалось существенное различие в подавлении гемолиза антителом HlyIIС-20, различаются по аминокислотному остатку в положении 324: штаммы ATCC 14579^T и ATCC 4342 содержат Leu324, а штамм B771 – Pro324. Pro за счет изгиба полипептидной цепи способен менять конформацию белка. Был создан набор генетических конструкций для проверки влияния аминокислотного остатка в положении 324 на подавление гемолиза антителом HlyIIС-20.

Сконструированные мутанты гемолизина II ATCC 14579^T и B771 тестировали на предмет эффективности защиты эритроцитов кролика от гемолиза моноклональным антителом HlyIIС-20.

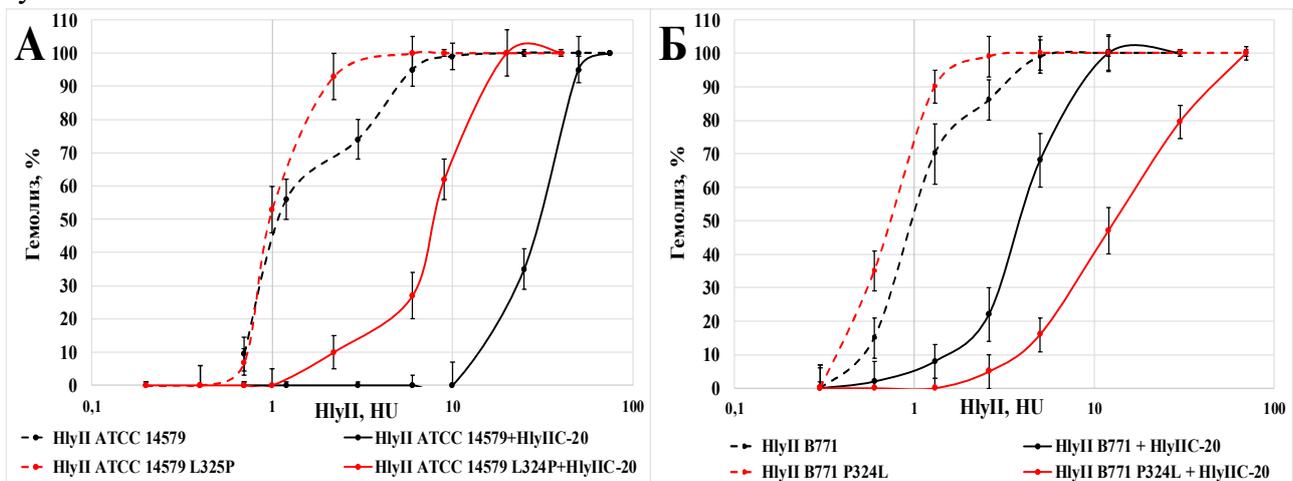


Рис. 6. Подавление МА HlyIIС-20 гемолиза эритроцитов кролика. Красным цветом показан гемолиз, вызванный мутантными формами гемолизинов, черным – природными штаммами. А - HlyII ATCC 14579^T до (пунктирная линия) и после (сплошная линия) добавления HlyIIС-20; Б - HlyII B771. Результаты представлены как Mean±SD, n=5.

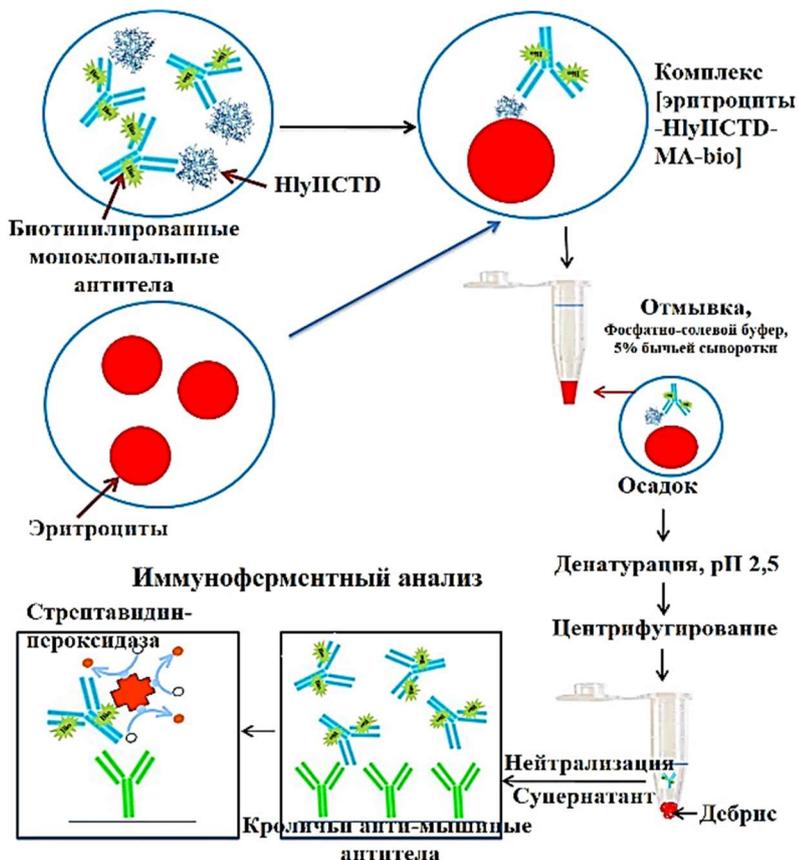
Сравнение данных по подавлению гемолиза, вызванного гемолизином II ATCC 14579^T, на рисунке 6А выявило снижение защиты от гемолиза антителом при замещении L324R. Напротив, замена P324L в гемолизине II В771 (рис. 6Б) приводила к более эффективному подавлению гемолиза антителом, чем у дикого типа. Этот факт объясняет штамм-специфическую защиту.

2.8. Эффективность токсин-нейтрализующего действия моноклонального антитела HlyIIС-20 *in vivo*

Эффективность нейтрализующего антитела HlyIIС-20 была проверена в экспериментах *in vivo* с использованием гемолизинов *B. cereus* штаммов ATCC 14579^T и В771. Полулетальную дозу (LD₅₀) определяли предварительно. Для определения токсин-нейтрализующего действия HlyIIС-20 токсины предварительно инкубировали с эквимольным количеством и молярными избытками антитела (x2, x5, x10, x20). При использовании токсина HlyII ATCC 14579^T предварительная инкубация с антителом оказывала нейтрализующее действие, и все экспериментальные мыши оставались живыми после 24 ч наблюдения. Защитное действие проявили все используемые концентрации антитела, в то время как только 50% животных контрольной группы выживали. При использовании HlyII из *B. cereus* В771 антитело не демонстрировало заметной нейтрализующей активности.

2.9. Взаимодействие HlyIIСТD с эритроцитами в составе иммунных комплексов

Для определения возможного взаимодействия С-терминального домена с клеточными



мембранами, биотинилированные антитела, полученные в данной работе, инкубировали с HlyIICTD, далее добавляли эритроциты кролика (рис 7). После стадии отмывок клеточный осадок лизировали. Полученные образцы лизатов анализировали в ИФА. Биотинилированные антитела, ранее входящие в состав иммунных комплексов [HlyIICTD+МА-bio], связавшиеся с эритроцитами, выявляли по взаимодействию с иммобилизованными на иммунопланшетах антителами кролика против иммуноглобулинов мыши.

Рис. 7. Взаимодействие HlyIICTD с кроличьими эритроцитами, ИФА. Схема эксперимента.

Среди использованных в данном эксперименте биотинилированных антител не выявлялись на конечной стадии анализа: НlyIIС-15, НlyIIС-30, НlyIIС-34, НlyIIС-37; детектировались в лизатах: НlyIIС-16 и НlyIIС-23. При понижении температуры с 37°C до комнатной (КТ) содержание антител в лизатах падало на 29%, что показывало снижение эффективности взаимодействия НlyIIСТD с эритроцитами при более низкой температуре (рис. 8). Полученные результаты свидетельствовали о том, что НlyIIСТD взаимодействовал с мембраной эритроцита, однако, это взаимодействие выявлялось только МА НlyIIС-16 и НlyIIС-23, не препятствующими связыванию НlyIIСТD с эритроцитами, в результате чего можно предположить, что их эпитопы находятся на участках НlyIIСТD, которые не контактируют с клеточной мембраной.

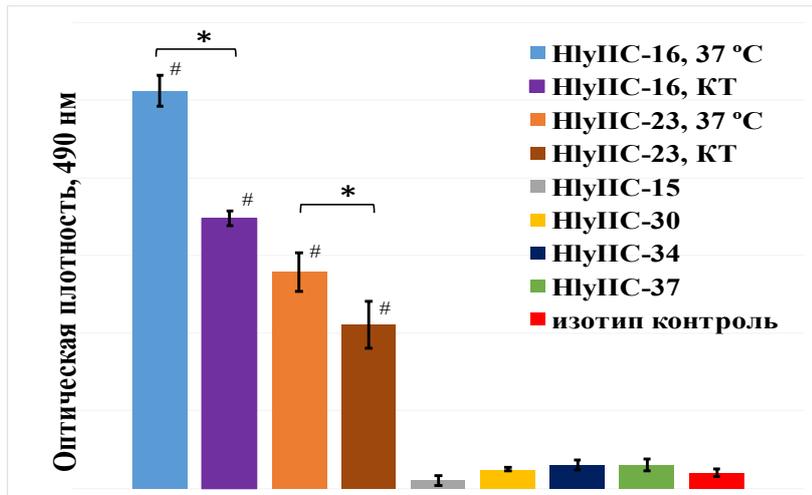


Рис. 8. Относительное содержание антител в лизатах эритроцитов. Результаты представлены как $Mean \pm SD$, $n=5$. # – $P < 0,05$, по сравнению с контролем изотипа (в качестве контроля изотипа использовали смесь биотинилированных МА IgG1, содержащих цепь к, не взаимодействующих с антигеном) (критерий Манна-Уитни); * – $P < 0,05$ (критерий Манна-Уитни).

2.10. Количественные характеристики взаимодействия НlyIIСТD с мембранами эритроцитов

Способность С-терминального домена связываться с мембраной клетки-мишени показана также с использованием биотинилированного препарата НlyIIСТD, который инкубировали с эритроцитами кролика в присутствии серийных разведений немеченого препарата. Связывание НlyIIСТD-bio в присутствии избытков немеченого белка ингибировалось почти на 90% (рис. 9), что свидетельствовало о специфичности взаимодействия НlyIIСТD с мембранами эритроцитов.

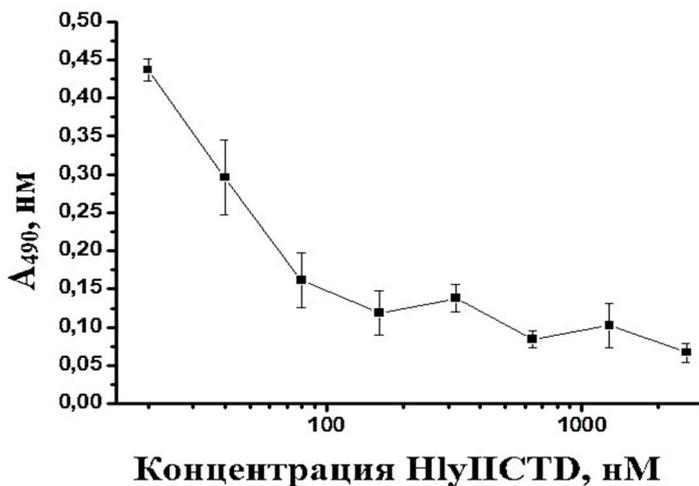


Рис. 9. Ингибирование связывания меченного НlyIIСТD-bio избытком немеченого при взаимодействии с эритроцитами. Результаты представлены как $Mean \pm SD$, $n=5$.

Для количественной характеристики степени взаимодействия НлуIICTD с клеточными мембранами определяли $K_{\text{афф}}$. Известно, что наиболее чувствительными к действию НлуII являются эритроциты кролика, в меньшей степени - эритроциты человека, наименее чувствительны - эритроциты мыши [Miles, G., 2002]. Поэтому, было интересно сравнить показатели, характеризующие взаимодействие НлуIICTD с эритроцитами различных типов. Количественные параметры связывания НлуIICTD с эритроцитами кролика, мыши и человека оценивали в координатах Скэтчарда. Графики представлены на рисунке 10, количественные значения $K_{\text{афф}}$ указаны в таблице 3. Значения констант аффинности НлуIICTD по отношению к эритроцитам различного происхождения различались незначительно, в отличие от гемолитического эффекта полноразмерного НлуII на эритроциты различных животных.

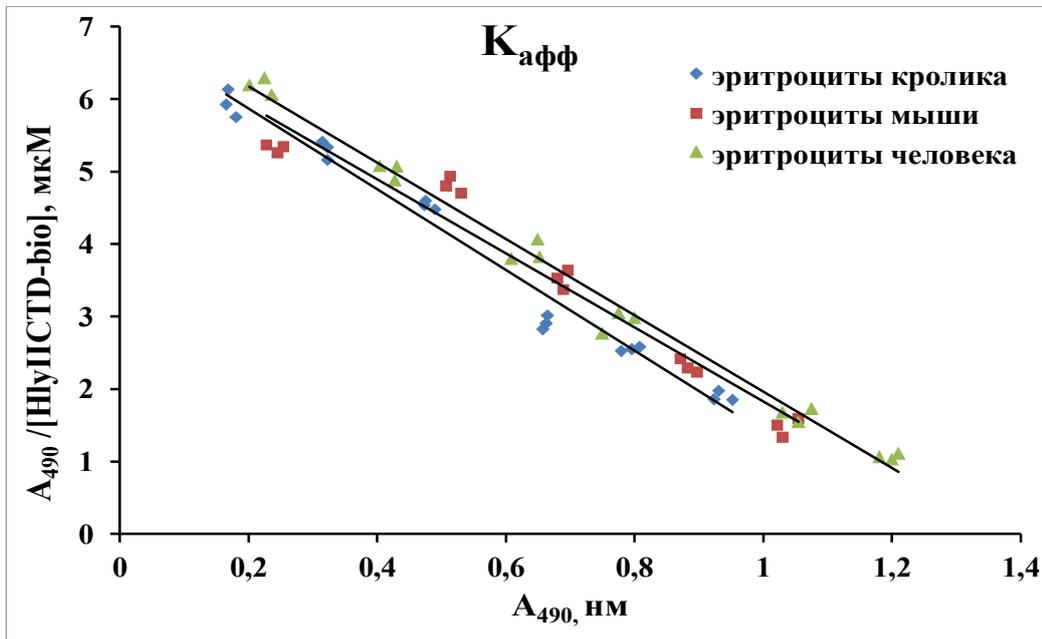


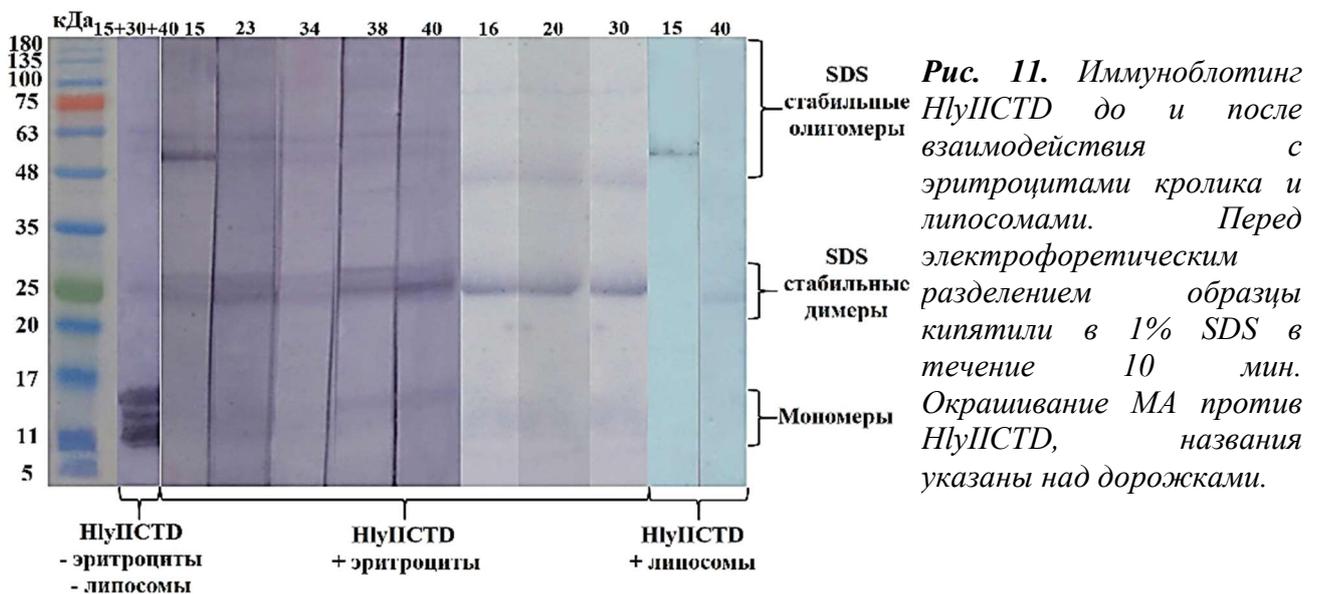
Рис. 10. График Скэтчарда для определения $K_{\text{афф}}$ взаимодействия НлуIICTD с эритроцитами различного происхождения (концентрация эритроцитов 0,025%). Для линеаризации данных использовали Microsoft Excel 2016.

Таблица 3. Константы аффинности при взаимодействии НлуIICTD с различными типами эритроцитов.

Типы клеток	$K_{\text{афф}}$
Эритроциты кролика	$5,57(\pm 0,049) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$
Эритроциты мыши	$5,12(\pm 0,081) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$
Эритроциты человека	$5,27(\pm 0,111) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$

2.11. Олигомеризация НлуIICTD в присутствии мембран клеток-мишеней

Олигомеризация мономерных форм порообразующего белка в присутствии мембран является одной из важнейших и необходимых стадий порообразования. В связи с этим, была проверена способность НлуIICTD образовывать олигомеры в присутствии мембран клеток-мишеней. Для этого НлуIICTD инкубировали с эритроцитами кролика и липосомами. Образование олигомеров выявляли иммуноблоттингом полученных комплексов [НлуIICTD+мембрана]. На рисунке 11 показано, что различные моноклональные антитела против НлуIICTD идентифицируют белок в разной степени олигомеризации. На мембране были детектированы окрашенные белковые полосы, соответствующие по молекулярной массе олигомерным формам НлуIICTD (полоса на уровне 27 кДа (димер) и полоса на уровне 56 кДа (тетрамер), выявленная МА НлуIIС-15).

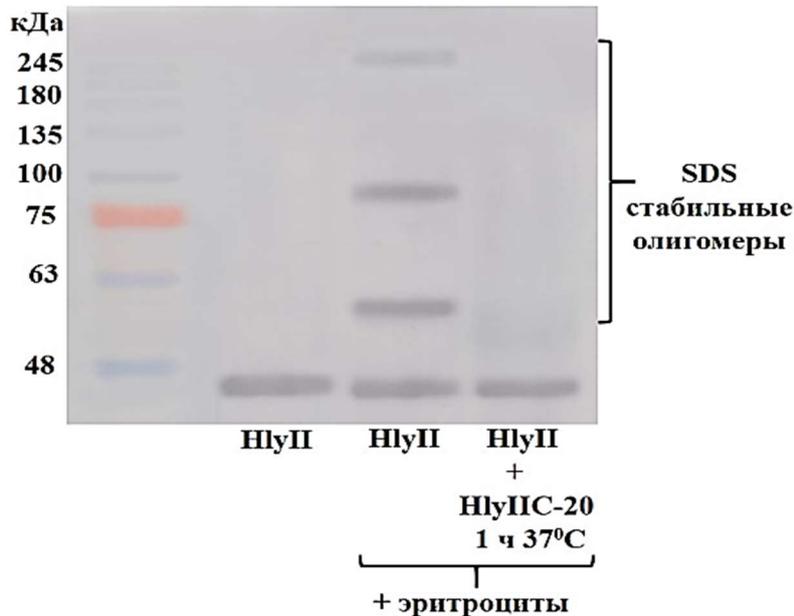


Изменения в доступности эпитопов, узнаваемых МА, после олигомеризации в присутствии мембран эритроцитов указывают на конформационные изменения в структуре НлуIICTD. Олигомеры оказались стабильными после кипячения в 1% SDS. При этом содержание мономерной формы в образцах НлуIICTD, инкубированных с эритроцитами, значительно снижалось. Таким образом, присутствие эритроцитов и липосом приводило к эффективной олигомеризации НлуIICTD.

По-видимому, именно способность НлуIICTD связываться с мембраной клетки-мишени и олигомеризоваться в ее присутствии усиливает гемолитическую активность полноразмерного НлуII по сравнению с делеционным вариантом без С-концевого домена. Полученные результаты указывают на то, что функция С-концевого домена НлуII важна для увеличения локальной концентрации белка НлуII на мембране. Возможно, что первичная посадка НлуIICTD на мембрану запускает конформационную перестройку НлуII из мономерной растворимой формы в олигомерную форму на мембране, а затем в порообразующую.

2.12. Зависимость олигомеризации HlyII от присутствия HlyIIС-20

В присутствии клетки-мишени мономеры HlyII олигомеризуются и формируют канал в мембране. Иммуноблоттингом показано, что предварительная обработка токсина антителом HlyIIС-20 предотвращает образование стабильных олигомерных форм. Следовательно, механизм действия HlyIIС-20 состоит в предотвращении стадии олигомеризации токсина в присутствии клеточной мембраны (рис. 12).



*Рис. 12. Иммуноблоттинг HlyII *B. cereus* в присутствии/отсутствии эритроцитов с/без предварительной инкубации с HlyIIС-20, окрашенный биотинилированной формой HlyIIС-20 и стрептавидином, конъюгированным с пероксидазой хрена.*

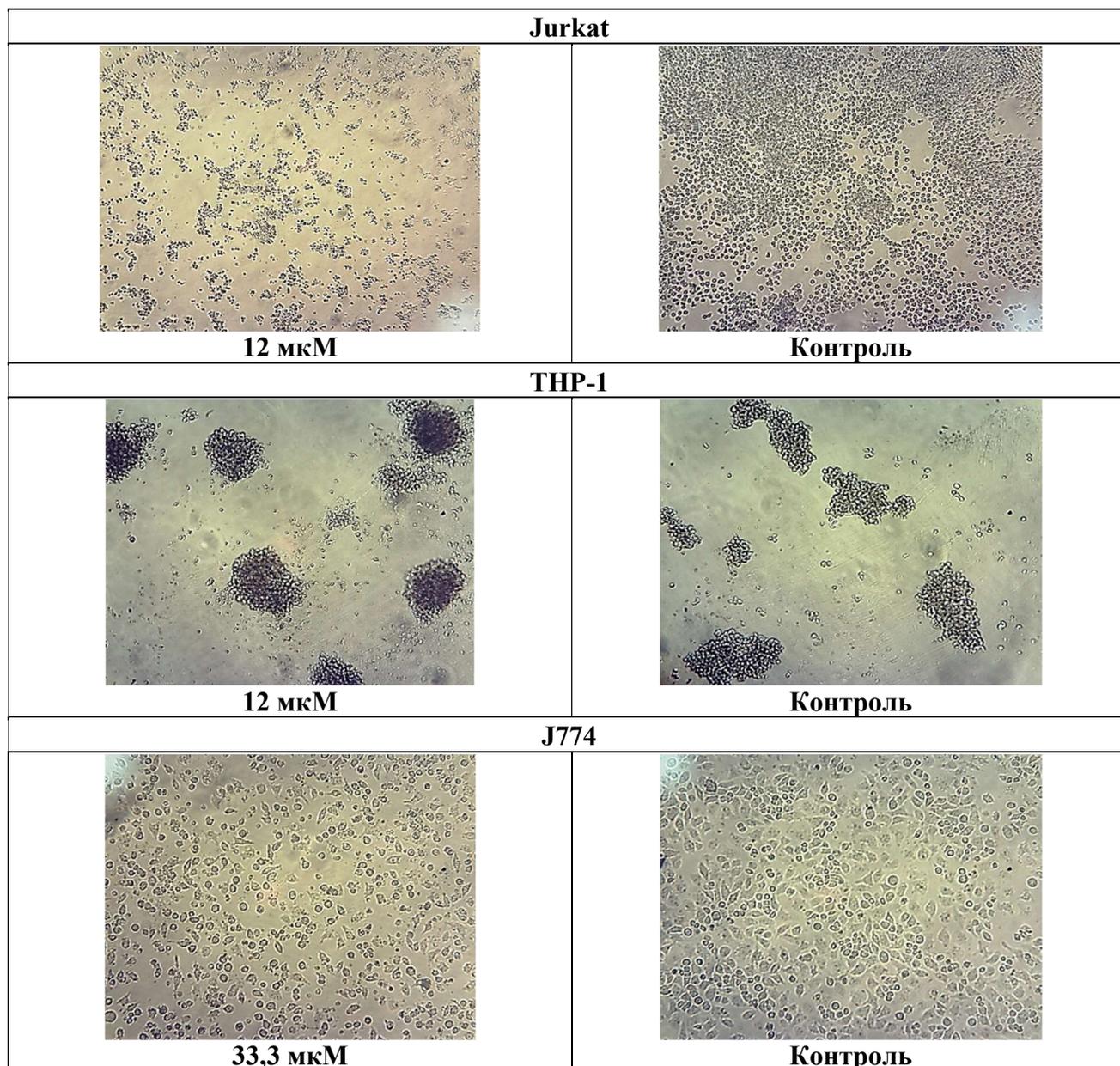
Данный вывод подтверждается экспериментами, в которых антитело добавляли после внесения в реакционную смесь эритроцитов. В этом случае HlyIIС-20 не защищало от гемолиза. После формирования олигомера и его встраивания в мембрану клетки-мишени HlyIIС-20 не способно препятствовать гемолизу, вызванному токсином.

2.13. Определение действия HlyIIСТD на клетки иммунной системы

Описаны случаи негативного действия токсинов на клетки иммунной системы. Поскольку HlyIIСТD способен связываться с клеточными мембранами и оказывать гемолитическое действие, было важно проверить его возможное действие на клетки иммунной системы. Способность HlyIIСТD действовать на клетки иммунной системы проверяли путем добавления HlyIIСТD к культурам Т-клеточного (Jurkat), макрофагального (THP-1 и J774) и В-клеточного (Daudi и Raji) происхождения. Каждый тип клеток в количестве 1×10^5 инкубировали с 12 мкМ и 33,3 мкМ HlyIIСТD в течение 24 часов.

На рисунке 13 показаны микрофотографии каждого исследуемого типа клеток в присутствии и в отсутствие HlyIIСТD после 24 ч инкубации. На микрофотографиях видно, что HlyIIСТD эффективно влияет на жизнеспособность моноцитов, макрофагов и Т-лимфоцитов и практически не влияет на рост и морфологические параметры клеток линий В-клеточного происхождения. Микрофотографии Т-клеток Jurkat показывают, что под действием HlyIIСТD практически все клетки утратили черты живых клеток (наблюдаются только небольшие темные тени) по сравнению с состоянием контрольных клеток в отсутствие HlyIIСТD. Моноциты

ТНР-1 успевали образовывать колонии, характерные для живых клеток, как и в контроле, но внутри колоний большинство клеток были мертвыми (темное окрашивание, при котором границы клеток не видны, отсутствуют прозрачность и «блеск», характерные для живых клеток). Клетки макрофагальной линии J774 в значительной степени утратили способность прилипать к поверхности (не достигали монослоя) и характеризовались уменьшением занимаемой площади и степени разрастания клеток, т. е. также утратили основные морфологические признаки, характерные для живых клеток. Инкубация линий В-клеточного происхождения с NlyIICTD не приводила к видимым изменениям в культурах клеток. Таким образом, эксперименты показали, что С-концевой домен *B. cereus* NlyII действовал на Т-клетки (линия Jurkat), макрофаги (линия J774), моноциты (ТНР-1) и практически не действовал на линии В-клеток (Daudi и Raji). Наиболее чувствительной к действию NlyIICTD из анализируемых типов клеток была клеточная линия Jurkat, так как для полного разрушения этих клеток было достаточно концентрации 12 мкМ, это значение меньше, чем для других клеточных линий. По этой причине дальнейшие эксперименты по анализу состояния клеток в присутствии NlyIICTD были проведены на клетках линии Jurkat.



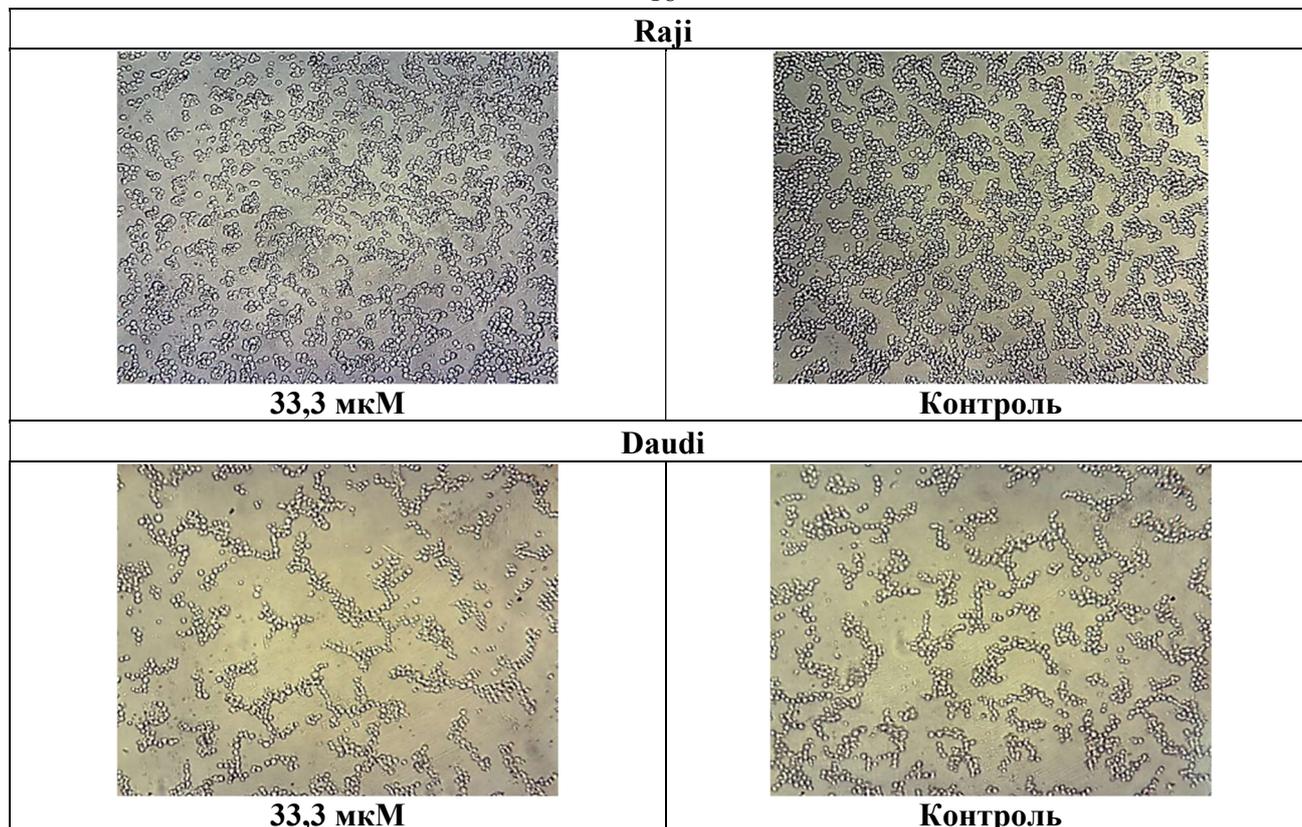


Рис. 13. Микрофотографии клеток (10/0.25, MVV5000 Digital Electronic Eyepiece for Microscope). Указана минимальная доза NlyICTD (мкМ), оказывающая видимое действие на клетки.

2.14. Проточный цитофлуориметрический анализ влияния NlyICTD на культивируемые клетки Jurkat

Степень воздействия NlyICTD на культивируемые клетки Jurkat оценивали методом проточной цитофлуориметрии по их способности связывать флуоресцентно меченный аннексин V, выявляющий клетки на начальных стадиях апоптоза, и детекцией мертвых клеток 7-аминоактиномицином D (7-AAD).

Образцы клеток с NlyICTD и без него (контроль) одновременно окрашивали конъюгатом аннексин V R-фикоэритрин и 7-аминоактиномицином D и анализировали проточной цитометрией, собирая по 5000 отдельных событий (клеток).

На рисунке 14 представлены данные цитофлуориметрии в виде графиков, разделённых на квадранты в соответствии с максимальными значениями флуоресценции интактных клеток после окрашивания конъюгатом аннексин V R-фикоэритрин и 7-аминоактиномицином D. Точки, которые попадают в нижний левый квадрант - «интактные клетки», клетки, которые не были повреждены во время инкубации с NlyICTD. В верхнем левом квадранте находятся «апоптотические клетки», окрашенные только конъюгатом аннексин V R-фикоэритрин, в верхнем правом квадранте - «мертвые клетки», клетки, окрашенные как аннексином V, меченным R-фикоэритрином, так и 7-аминоактиномицином D, что указывает на серьезное повреждение мембран этих клеток, т. е., на их гибель.

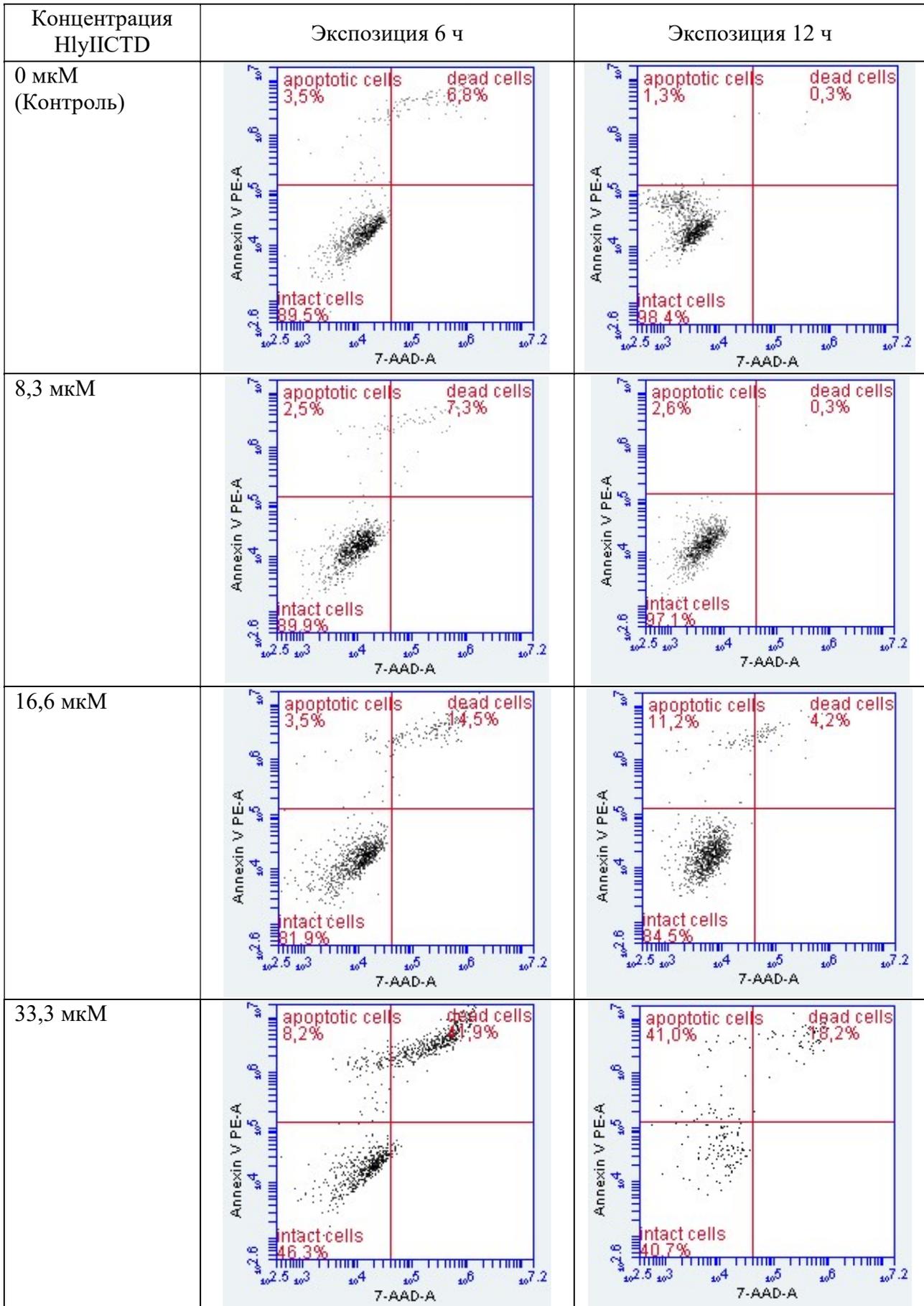


Рис. 14. Цитофлуориметрический анализ клеток Jurkat после окрашивания конъюгатом аннексин V R-фикоэритрин и 7-аминоактиномицином D спустя 6 и 12 ч инкубации с НлуICTD.

При концентрации НлуИСТД 8,3 мкМ после 6 и 12 часов воздействия количество живых клеток и клеток на разных стадиях гибели практически не отличалось от контрольных образцов, инкубированных без добавления НлуИСТД. После 6 часов воздействия НлуИСТД в концентрации 16,6 мкМ у 3,5% клеток уже наблюдались признаки апоптоза и к тому времени 14,5% клеток погибли. В то же время (после 6 ч) при концентрации НлуИСТД 33,3 мкМ апоптоз инициировался в 8,2% клеток и 41,9% клеток погибло. После 12 ч воздействия доля клеток с признаками апоптоза в образце при концентрации 16,6 мкМ увеличилась до 11,2%, но количество клеток с двойным окрашиванием (мертвых) снизилось до 4,2%. Уменьшение количества мертвых клеток свидетельствует об их разрушении к тому времени. Разрушение клеток после 12 ч воздействия более четко видно при концентрации НлуИСТД 33,3 мкМ. Как на графике светорассеяния, так и на графике флуоресценции аннексина V/7-AAD события, соответствующие параметрам интактных клеток, практически отсутствуют, поскольку к тому времени почти все клетки были лизированы в результате действия НлуИСТД.

При увеличении эффективной концентрации НлуИСТД для достижения заданного параметра количества клеток (5000) устройству приходилось забирать возрастающие объемы клеточных суспензий. Например, объем суспензии клеток, взятой из контрольных точек, составил 22 мкл, а из 12-часовой точки с концентрацией НлуИСТД, равной 33,3 мкМ, объем составил 500 мкл, что было недостаточно для достижения заданного параметра. На диаграмме на рисунке 15 сравнивается количество клеток в каждой экспериментальной пробе, рассчитанное с учетом количества зафиксированных цитофлуориметром клеток и объема, забираемого прибором. Как видно, количество клеток в каждом из образцов уменьшалось с увеличением концентрации и времени воздействия НлуИСТД. Эти результаты демонстрируют, что длительная инкубация (до 12 часов) НлуИСТД в концентрации 33,3 мкМ с клетками Jurkat приводила к их полному лизису.

Таким образом, с помощью проточной цитофлуориметрии было показано, что НлуИСТД действовал на клетки Jurkat, эффект был пролонгирован во времени и требовал микромолярных концентраций токсина.

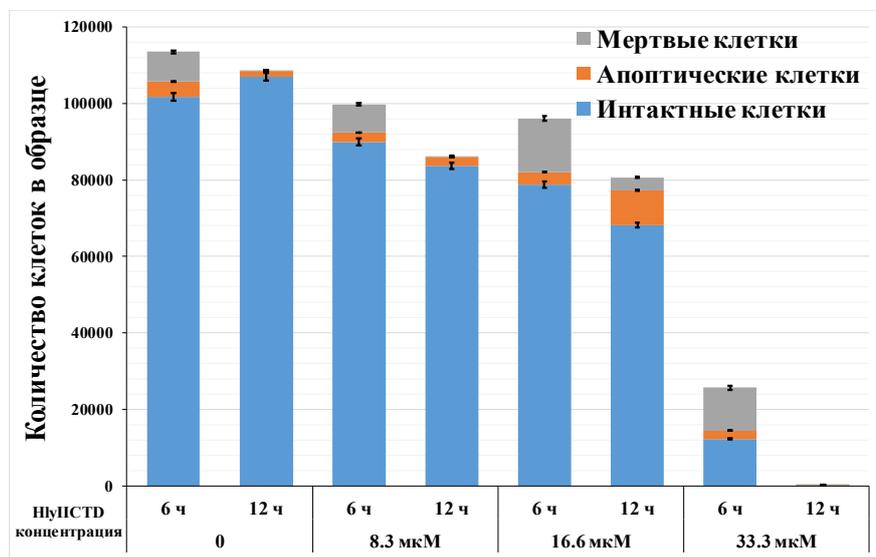


Рис. 15. Зависимость количества клеток в образце от времени инкубации и концентрации НлуИСТД. Каждый столбик диаграммы показывает общее количество клеток, включая интактные, апоптотические и мертвые клетки. Лизированные клетки в результатах не учитывались. Результаты представлены как $Mean \pm SD$, $n=3$.

2.15. Определение констант аффинности взаимодействия HlyIICTD с клетками иммунной системы

Значение константы аффинности определяли для взаимодействия HlyIICTD с Т-клетками линии Jurkat, макрофагами линии J774, моноцитами THP-1, строили графики в координатах Скэтчарда, которые представлены на рисунке 16. Поскольку не было выявлено влияния HlyIICTD на В-клетки, для линий Daudi и Raji $K_{афф}$ не определяли.

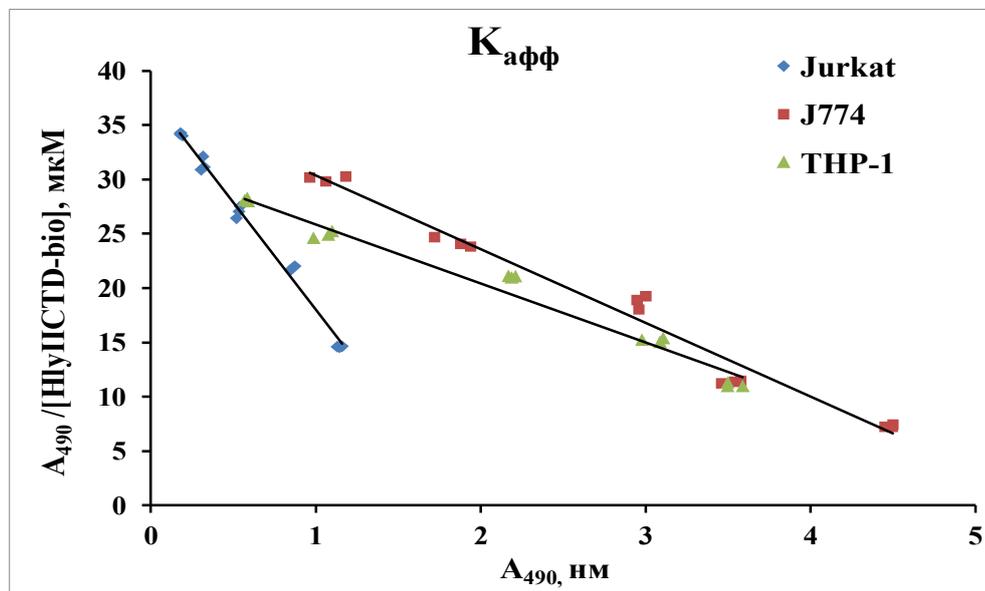


Рис. 16. График Скэтчарда для определения $K_{афф}$ для суспензии клеток при концентрации 4×10^5 для J774 и THP-1 и 2×10^5 для Jurkat. Для линеаризации данных использовали Microsoft Excel 2016.

Было показано, что HlyIICTD наиболее эффективно взаимодействует с Т-лимфоцитами Jurkat. Близость значений коэффициентов сродства HlyIICTD к эритроцитам и к линиям клеток THP-1 и J774 могут указывать на схожесть структурных особенностей клеточной поверхности этих клеток. В то же время заметное увеличение коэффициента сродства к Т-клеткам может указывать на наличие дополнительных сайтов связывания для HlyIICTD, например, специфических рецепторов (табл. 4).

Таблица 4. Константы аффинности связывания HlyIICTD с различными типами клеток.

Типы клеток	$K_{афф}$
THP-1	$5,40(\pm 0,181) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$
J774	$6,77(\pm 0,162) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$
Jurkat	$19,60(\pm 0,156) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$

3. Заключение

Гемолизин II (HlyII) является одним из патогенных факторов *B. cereus*. Клинические изоляты *B. cereus* демонстрируют повышенный уровень экспрессии HlyII, что свидетельствует о его важной роли в инфекционном процессе. Целью данной работы являлось иммунохимическое изучение С-терминального домена гемолизина II, секретируемого *B. cereus*, и его роли в процессе порообразования.

Получена панель моноклональных антител к рекомбинантному препарату С-терминального домена гемолизина II, с высокой специфичностью взаимодействующих с рекомбинантным белком. Большинство антител взаимодействуют с С-терминальным доменом, что позволяет использовать их в качестве инструмента исследования функционирования как домена, так и полноразмерного токсина, а также эти антитела могут быть перспективными при разработке диагностических тест-систем для детекции гемолизина II *B. cereus* в различных биологических жидкостях и пищевой продукции. МА НлуПС-15, НлуПС-34 и НлуПС-37 связывались с линкерным пептидом. Направленное против сайта распознавания тромбином антитело НлуПС-15 может быть полезным при разработке генно-инженерных препаратов.

Скрининг полученной панели МА выявил МА НлуПС-20, способное подавлять гемолиз эритроцитов, вызванный гемолизином II *B. cereus*. Нейтрализация токсина происходит за счет ингибирования процесса олигомеризации мономеров токсина. Количественные характеристики защиты от гемолиза, вызванного гемолизинами различных штаммов *B. cereus*, антителом НлуПС-20 различались, что свидетельствует о его штамм-специфическом действии. Защитная способность антитела зависела от Leu/Pro в положении 324 в аминокислотной последовательности НлуII исследуемых штаммов. Нейтрализующая способность НлуПС-20 была продемонстрирована в экспериментах *in vivo*. Нейтрализующее антитело НлуПС-20 перспективно для разработки на его основе лекарственных препаратов, способных подавлять действие гемолизина II *B. cereus*.

В работе впервые показано, что НлуIICTD способен ориентированно взаимодействовать с мембранами клетки-мишени. При этом происходит олигомеризация НлуIICTD с образованием высокомолекулярных форм и истощение мономерной фракции. Связываясь с клеточной мембраной, НлуIICTD усиливает цитолитическую способность полноразмерного токсина. Поэтому, наличие С-терминального домена объясняет более высокую эффективность лизиса клеток–мишеней в сравнении с его гомологами, не имеющими С-терминального удлинения.

Продemonстрирована способность НлуIICTD оказывать токсическое действие на некоторые клетки иммунной системы: моноциты THP-1, в большей степени на макрофаги J774 и наиболее эффективно на Т-лимфоциты Jurkat. Длительное воздействие НлуIICTD на моноциты, макрофаги и Т-клетки приводило к их лизису, но при этом не влияло на В-клетки. Действие НлуIICTD на клетки иммунной системы коррелирует с действием полноразмерного гемолизина II *B. cereus*, объясняя его эффективное подавление иммунной системы хозяина. Различие констант аффинности, характеризующих взаимодействие НлуIICTD с различными клетками, свидетельствует о его зависимости от химического состава клеточных мембран.

Данная работа вносит вклад в изучение механизма действия гемолизина II, секретлируемого *B. cereus*. Полученные результаты могут быть применены в биотехнологической, медицинской и научной практиках.

4. Выводы

1. Получена панель моноклональных антител, эффективно распознающих рекомбинантный С-терминальный домен в нативной и денатурированной формах, а также в составе полноразмерного токсина.

2. Антитело НпуПС-20 штамм-специфически подавляет гемолиз, вызванный НпуII *in vitro* и *in vivo*: гемолиз наиболее эффективно подавляется в присутствии лейцина в положении 324. Механизм защиты от гемолиза состоит в предотвращении олигомеризации мономеров токсина на мембране клетки-мишени.

3. С помощью моноклональных антител показано, что НпуIICTD способен ориентированно взаимодействовать с клеточными мембранами. Определены значения констант аффинности для взаимодействия НпуIICTD с мембранами эритроцитов различных видов, которые в среднем составили $5,3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$.

4. НпуIICTD в присутствии клеточных мембран и липосом образует олигомерные формы, что сопровождается изменением пространственной структуры, выявляемым моноклональными антителами.

5. НпуIICTD оказывает литическое действие на клетки иммунной системы: Т-клетки (Jurkat) и макрофаги (J774 и THP-1), при отсутствии влияния на В-клетки (Daudi и Raji). Наиболее эффективно НпуIICTD взаимодействовал с мембранами Т-клеточной линии Jurkat, константа аффинности для которой составила $1,96 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$.

6. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что С-терминальный домен способствует увеличению локальной концентрации мономеров НпуII на мембране клетки-мишени, инициируя таким образом их олигомеризацию, что объясняет повышенную цитолитическую активность полноразмерного токсина, в сравнении с гомологами, не имеющими С-терминальный домен.

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю, к.х.н., с.н.с. лаборатории иммунохимии ГНЦ ФИБХ РАН Руденко Н.В., за ценное руководство в проведении исследовательской работы, анализе полученных результатов, а также за постоянное внимание и поддержку. Автор выражает благодарность и искреннюю признательность за плодотворную совместную работу, ценные советы, анализ и обсуждение полученных результатов сотрудникам лаборатории молекулярной микробиологии института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук «Федерального исследовательского центра «Пущинский научный центр биологических исследований РАН» и заведующему лабораторией д.б.н. Солонину А.С. Автор выражает благодарность за постоянную поддержку, ценные советы, помощь и участие в ходе выполнения работы зав. лабораторией иммунохимии ГНЦ ФИБХ РАН Бровко Ф.А., к.б.н., с.н.с. Каратовской А.П., к.б.н. с.н.с. Шепеляковской А.О. и всем сотрудникам лаборатории иммунохимии ГНЦ ФИБХ РАН.

Список публикаций

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 19-04-00592 А «Функциональная роль С-концевого домена молекулы гемолизина II *Bacillus cereus*».

Публикации в рецензируемых журналах по теме кандидатской диссертации:

1. 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. «C-Terminal Domain of *Bacillus cereus* HlyII Is Able to Interact with Erythrocytes» // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. – 2020. - V. 46. - № 3. - P. 321–326. DOI: 10.1134/S1068162020030188
2. **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. «Monoclonal Antibody HlyIIC-15 to C-End Domain HlyII *B. cereus* Interacts with the Trombin Recognition Site» // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. - 2020. – V. 46 - № 6. – P. 1214-1220. DOI: 10.1134/S1068162020060382
3. Rudenko N.V., Nagel A.S., **Zamyatina A.V.**, Karatovskaya A.P., Salyamov V.I., Andreeva-Kovalevskaya Z.A., Siunov A.V., Kolesnikov A., Shepelyakovskaya A.O., Boziev K.M., Melnik B.S., Brovko F.A., Solonin A.S. «A Monoclonal Antibody against the C-Terminal Domain of *Bacillus cereus* Hemolysin II Inhibits HlyII Cytolytic Activity» // Toxins. – 2020. - V. 12 № 806. DOI: 10.3390/toxins12120806
4. Rudenko N.V., Siunov A.V., **Zamyatina A.V.**, Melnik B, Nagel A.S., Karatovskaya A.P., Borisova M, Shepelyakovskaya A.O., Andreeva-Kovalevskaya Z.A., Kolesnikov A, Surin A, Brovko F.A., Solonin A.S. «The C-terminal domain of *Bacillus cereus* hemolysin II oligomerizes by itself in the presence of cell membranes to form ion channels» // International Journal of Biological Macromolecules. – 2022. - V. 200. - P. 416–427. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.01.013
5. **Zamyatina A.V.**, Rudenko N.V., Karatovskaya A.P., Nagel A.S., Siunov A.V., Vetrova O.S., Dzhomikova D.S., Andreeva-Kovalevskaya Z.I., Ivanova T.D., Brovko F.A., Solonin A.S. «Monoclonal Antibodies to the C-Terminal Domain of Hemolysin II *Bacillus cereus*» // Opera Medica et Physiologica – 2023. – V. 10. – P. 80–86. doi: 10.24412/2500-2295-2023-2-80-86

Материалы научных конференций и тезисы докладов по теме кандидатской диссертации:

1. Нагель А.С., Ковалевская Ж.И., Сиунов А.В., Каратовская А.П., **Замятина А.В.**, Руденко Н.В. «С-концевой домен гемолизина II *B. cereus*» // Сборник тезисов 23-ой Международной Пушинской школы-конференции молодых ученых «БИОЛОГИЯ - НАУКА XXI ВЕКА». – Пушино: 2019. Стр. 177-178.
2. **Замятина А.В.**, Руденко Н.В., Каратовская А.П., Нагель А.С., Андреева-Ковалевская Ж.И., Сиунов А.В., Бровко Ф.А., Солонин А.С. «С-терминальный домен гемолитического токсина II *Bacillus cereus* способен взаимодействовать с эритроцитами» // Сборник тезисов 62-й Всероссийской научной конференции МФТИ. – Москва-Долгопрудный-Жуковский: 2019. Стр. 41-42.
3. **Замятина А.В.**, Руденко Н.В., Каратовская А.П., Нагель А.С., Андреева-Ковалевская Ж.И., Сиунов А.В., Бровко Ф.А., Солонин А.С. «Функциональная роль С-концевого домена гемолизина II *B. cereus*» // VI Пушинская школа-конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов» 2-6 декабря. Сборник тезисов (Материалы конференции) - Москва: Издательство Вода: химия и экология, 2019. Стр. 95-97.
4. **Замятина А.В.**, Руденко Н.В., Каратовская А.П., Нагель А.С., Андреева-Ковалевская Ж.И., Сиунов А.В., Бровко Ф.А., Солонин А.С. «Иммунохимический подход в изучении С-концевого домена гемолитического токсина II *Bacillus cereus*» // XXXII зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" ИБХ РАН – Москва, 2020. Стр. 47.
5. **Замятина А.В.**, Каратовская А.П., Нагель А.С., Руденко Н.В., Андреева-Ковалевская Ж.И., Сиунов А.В., Бровко Ф.А., Солонин А.С. «Моноклональные антитела к С-терминальному домену гемолизина II *Bacillus cereus*» // 24-ая Международная Пушинская школа-конференции молодых ученых «Биология - Наука XXI века». – Пушино: 2020. Стр. 95-96.

6. Siunov A.V., Nagel A.S., Andreeva-Kovalevskaya Z.I., **Zamyatina A.V.**, Rudenko N.V., Karatovskaya A.P., Borisova M.P., Brovko F.A., Salyamov V.I., Solonin A.S. «Properties of the C-terminal domain of HlyIICTD suggest that *B. cereus* HlyII is a representative potential member of trimeric autotransporter adhesins among gram-positive bacteria» // Bioinformatics of genome regulation and structure/systems biology”. с. Novosibirsk, 6-10 июля 2020 г. (BGRS/SB-2020), p.629. DOI 10.18699/BGRS/SB-2020-384
7. Каратовская А.П., **Замятина А.В.**, Нагель А.С., Колесников А.С. «Структурная часть гена гемолизина II *B. cereus* кодирует кластер белков с единой рамкой считывания и различными стартовыми точками» // Международный молодежный научный форум «ЛОМОНОСОВ-2020». М.: МАКС Пресс, 2020. Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2020».
8. Петров Е.Л., Руденко Н.В., Каратовская А.П., **Замятина А.В.**, Сиунов А.В., Андреева-Ковалевская Ж.И., Нагель А.С., Бровко Ф.А., Солонин А.С. «Взаимодействие с-терминального домена гемолизина II *Bacillus cereus* с клетками иммунной системы» // Всероссийская конференция с международным участием и элементами научной школы для молодежи "Экотоксикология-2020". - Тула: 2020. 15-16 октября 2020 г. Стр. 136-137.
9. Петров Е.Л., Руденко Н.В., Каратовская А.П., **Замятина А.В.**, Сиунов А.В., Андреева-Ковалевская Ж.И., Нагель А.С., Бровко Ф.А., Солонин А.С. «Клетки иммунной системы и С-терминальный домен гемолизина II *Bacillus cereus*» // XXXIII зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии". -2021. г. Москва., 8-11 февраль. Стр. 32.
10. Хлебалина Н.А., Лучкина П.Н., Булавина М.К., **Замятина А.В.**, Каратовская А.П. «Укороченные формы гемолизина II влияют на пороформирующую активность и обеспечивают агрегацию» // Сборник тезисов 25-ой Пушинской школы-конференции молодых ученых с международным участием «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА». Пушино: ФИЦ ПНЦБИ РАН, 18-22 апреля 2022.
11. Каратовская А. П., **Замятина А. В.**, Руденко Н. В., Бровко Ф. А., Нагель А. С., Андреева-Ковалевская Ж. И., Сиунов А. В., Солонин А. С. «Моноклональные антитела к большому с-концевому домену гемолитического токсина II *Bacillus cereus*» // IX Международная конференция молодых ученых: вирусологов, биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и биоинформатиков — 2022: Сб. тез. / АНО «Иннов. центр Кольцово». — Новосибирск: ИПЦ НГУ, 2022. — 173 с
12. Ветрова О.С., Руденко Н.В., Мельник Б.С., Джомикова Д.Ш., **Замятина А.В.**, Каратовская А.П., Марченков В.В., Нагель А.С., Андреева-Ковалевская Ж.И., Сиунов А. В., Солонин А. С. «Взаимодействие антител против С-терминального домена гемолизина II *Bacillus cereus* с полноразмерным токсином выявляет особенности пространственной структуры токсина». 26-ая Пушинская школа-конференции молодых ученых с международным участием «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА». Пушино: ФИЦ ПНЦБИ РАН, 2023.стр. 16.
13. Нагель А.С., Сиунов А.В., Андреева-Ковалевская Ж.И., Мельник Б.С., Хлебалина Н.А., Иванова Т.Д., Ветрова О.С., Джомикова Д.Ш., Каратовская А.П., **Замятина А.В.**, Руденко Н.В., Солонин А.С. «Снижение гемолитической и цитолитической активностей гемолизина II *B. cereus* и альфа-гемолизина (HLA) *Staphylococcus aureus* за счет образования дисульфидных связей» // 26-ая Пушинская школа-конференции молодых ученых с международным участием «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА». Пушино: ФИЦ ПНЦБИ РАН, 2023., стр. 47.
14. **Замятина А.В.**, Руденко Н.В., Нагель А.С., Иванова Т.Д., Каратовская А.П. «Моноклональные антитела как инструмент изучения С-терминального домена гемолизина II *Bacillus cereus*» // Перспективы реализации междисциплинарных исследований: сборник статей международной научной конференции (Нижегородск, Февраль 2023). – СПб.: МИПИ им. Ломоносова, 2023, стр. 5-8. DOI 10.58351/230221.2023.36.75.003
15. Ветрова О.С., Джомикова Д.Ш., **Замятина А.В.**, Каратовская А.П., Руденко Н.В., Бровко Ф.А., Нагель А.С., Андреева-Ковалевская Ж.И., Сиунов А.В., Солонин А.С. «Моноклональные антитела против участков С-терминального домена HlyII *B. cereus*» // XXXV зимняя молодёжная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" Москва, 7-10 февраля 2023 г, стр. 9.