

Оптимизация условий экспрессии рекомбинантных субъединиц шигатоксина 2-го типа *Escherichia coli* при использовании различных алгоритмов получения целевого белка

М.А.Шкуратова, М.А.Марьин, М.М.Рогозин, О.В.Калмантаева, А.Е.Хлынцева, А.К.Сурин, В.В.Фирстова

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Московская область, Оболенск, Российская Федерация

Шигатоксин (Stx), продуцируемый *Escherichia coli*, является основной причиной желудочно-кишечных расстройств, включая геморрагический колит, а также возникновения гемолитико-уремического синдрома. Представители семейства Stx имеют АВ-структуру и состоят из токсичной А-субъединицы и пентамера из рецептор-связывающих В-субъединиц. Для изучения иммунопатогенеза, конструирования диагностических тест-систем, а также при создании терапевтических моноклональных антител необходимо получение рекомбинантного белка. Токсичность А-субъединицы шигатоксина препятствует получению высоких выходов белка за счет снижения плотности клеток культуры и/или ограничения количества белка внутри клетки-продуцента.

В представленной работе была проанализирована экспрессия А-субъединицы шигатоксина 2-го типа шестью разными продуцентами *E. coli* и синтез В-субъединицы одним продуцентом при различных условиях культивирования. В результате было выявлено, что оптимальная продукция А- и В-субъединиц шигатоксина 2-го типа наблюдалась в составе химерного продукта с SUMO-пептидом штамма *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS.

Экспрессию проводили в установленных в ходе исследования условиях культивирования: продуцента субъединицы А – 20°C, 10 мкМ индуктора, 16 ч; продуцента субъединицы В – 20°C, 100 мкМ индуктора, 16 ч. Фрагмент SUMO-His был удален с помощью протеазы, и в результате работы был получен белок без дополнительных аминокислотных последовательностей. Установленный в ходе исследования алгоритм получения субъединиц использовали для получения целевого белка.

Конечный выход А- и В-субъединиц шигатоксина 2-го типа составил 1,5 и 4 мг с литра культуральной жидкости соответственно. Идентичность рекомбинантных пептидов последовательностям Stx2A и Stx2B подтвердили методом масс-спектрометрии. Доказали функциональную активность полученных белков и образование холотоксина при соединении растворов субъединиц *in vitro*.

Ключевые слова: шигатоксин 2-го типа, рекомбинантный белок, инактивирующий рибосомы белок, культивирование

Для цитирования: Шкуратова М.А., Марьин М.А., Рогозин М.М., Калмантаева О.В., Хлынцева А.Е., Сурин А.К., Фирстова В.В. Оптимизация условий экспрессии рекомбинантных субъединиц шигатоксина 2-го типа *Escherichia coli* при использовании различных алгоритмов получения целевого белка. Бактериология. 2024; 9(3): 8–19. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-8-19

Optimization of the expression conditions of recombinant shiga toxin type 2 subunits from *Escherichia coli* using various algorithms for producing the target protein

M.A.Shkuratova, M.A.Maryin, M.M.Rogozin, O.V.Kalmantaeva, A.E.Khlyntseva, A.K.Surin, V.V.Firstova

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

Для корреспонденции:

Шкуратова Мария Андреевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзор

Адрес: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, р.п. Оболенск,

Территория «Квартал А», 24

E-mail: shkuratova@obolensk.org

Телефон: (4967) 36-00-03

Статья поступила 15.03.2024, принята к печати 30.09.2024

For correspondence:

Maria A. Shkuratova, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 24 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation

Phone: (4967) 36-0147

E-mail: borzilov@obolensk.org

The article was received 15.03.2024, accepted for publication 30.09.2024

Shiga toxin (Stx) produced by *Escherichia coli* is a main cause of gastrointestinal disorders, including hemorrhagic colitis, as well as of hemolytic-uremic syndrome. Members of the Stx family have an AB structure and consist of a toxic A subunit and a pentamer of receptor-binding B subunits. To study immunopathogenesis, design diagnostic test systems, and to create therapeutic monoclonal antibodies, it is necessary to produce a recombinant protein. The toxicity of the Stx A subunit prevents the production of the high-yield protein by reducing the density of culture cells and/or limiting the amount of the protein inside a producing cell.

The present work dealt with expression of the Stx2 A subunit by six different *E. coli* producers as well as with synthesis of the B subunit by the same one producer under different culture regimen. As a result, it was revealed that the optimal production of Stx2 A and B subunits by *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS strain was observed as a part of a chimeric product with a SUMO protein. Expression was performed under culture conditions determined during the research. The A subunit producer was cultured at 20°C in the presence of 10 µM inducer for 16 h. The B subunit producer was cultured at 20°C with 100 µM inducer for 16 h. The SUMO-His fragment was excised with protease, and as a result, of the work, a protein was obtained without additional amino acid sequences. The algorithm for producing the subunits established during the research was used to obtain the target protein

The final yield of the Stx2 A and B subunits was 1.5 mg/L and 4 mg/L of the culture fluid, correspondingly. The identity of the recombinant peptides to the Stx2 A and Stx2 B sequences was confirmed by mass spectrometry. The functional activity of the produced proteins and the formation of the holotoxin during combining solutions of the subunits *in vitro* were confirmed.

Key words: shiga toxin type 2, recombinant protein, ribosome inactivating protein, cultivation

Shkuratova M.A., Maryin M.A., Rogozin M.M., Kalmantaeva O.V., Khlyntseva A.E., Surin A.K., Firstova V.V. Optimization of the expression conditions of recombinant shiga toxin type 2 subunits from *Escherichia coli* using various algorithms for producing the target protein. *Bacteriology*. 2024; 9(3): 8–19. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-8-19

Пroduцирующие шигатоксин *Escherichia coli* (STEC) являются возбудителями тяжелой пищевой инфекции, которая может привести к опасным для жизни осложнениям, варьирующим от кровавой диареи и геморрагического колита до гемолитико-уремического синдрома (ГУС) и неврологических проблем [1]. Основными факторами патогенности STEC-штаммов являются шигатоксины (Stx), которые подразделяются на 2 типа: шигатоксин типа 1 (Stx1) и шигатоксин типа 2 (Stx2), гомологичный шигатоксину 1-го типа на 56% [2]. При этом штаммы *E. coli*, продуцирующие Stx2, более вирулентны и чаще связаны с развитием ГУС у людей [3]. В связи с этим проблема своевременной диагностики, профилактики и терапии STEC-инфекции является актуальной. Для разработки средств диагностики и терапии необходимо получение рекомбинантного Stx2.

Все члены семейства шигатоксинов сходны по строению и механизму действия. Данные белки представляют собой двухкомпонентные молекулы, в которых А-субъединица обладает ферментативной активностью, а В-субъединица отвечает за связывание с рецептором. Представители семейства относятся к группе токсинов, инактивирующих рибосомы, и вследствие этого ведут к ингибированию синтеза белка в клетке, индуцированию апоптоза, а также могут вызывать измененную экспрессию генов/белков в эпителиальных клетках, эндотелиальных клетках, моноцитах и мезангиальных клетках [4].

Цельный токсин (холотоксин, голотоксин) имеет структуру АВ₅, т.е. он образован одной крупной (32–33 кДа) А-субъединицей и пятью небольшими (7–8 кДа) В-субъединицами, формирующими пентамерное кольцо (35–40 кДа). Общая масса белка составляет ~70 кДа [5]. Пентамер из В-субъединиц выполняет рецептор-связывающую функцию и обеспечивает перемещение холотоксина внутрь клеток-мишеней посредством эндоцитоза. Функциональным рецептором Stx1 и Stx2 цитоплазматических мембран эукариотических клеток является нейтральный гликофинголипид глоботриазиоилцерамид (Gb3) или глоботетраозиоилцерамид (Gb4) [1, 6]. Энзиматическая субъединица А состоит из двух фрагментов (А1 и А2), соединенных дисульфидной

связью. Небольшой фрагмент А2 обеспечивает связывание с пентамером из В-субъединиц через центральную пору, а фрагмент А1 отвечает за проявление токсичности [1, 7]. Между фрагментами StxA расположен узнаваемый протеазами цитозоля участок. В этом месте субъединица разрезается при попадании в клетку, после чего фрагменты остаются соединенными между собой только дисульфидной связью. Полный разрыв происходит, когда токсин попадает в эндоплазматическую сеть [8, 9]. Тогда А1-фрагмент выходит в цитозоль, попадает к рибосомам и инактивирует их, отщепляя аденин на 28S рРНК 60S-субъединицы эукариотических рибосом или 23S рРНК 50S-субъединицы прокариотических рибосом у большинства видов организмов [1, 10]. В результате ингибирования синтеза белка запускаются необратимые процессы, приводящие к гибели клетки [4].

Использование анатоксина в лабораторных экспериментах затруднено из-за низкого выхода белка при выделении из естественных продуцентов [11]. Несмотря на большое количество статей, в которых описываются различные подходы к получению рекомбинантных шигатоксинов [11–15], остается актуальной проблема получения полноразмерных биологически активных шигатоксинов и увеличения конечного выхода рекомбинантных белков. Это связано с тем, что токсичная А-субъединица может приводить к мутациям, нестабильности штаммов экспрессии (модификации и/или гибели продуцентов), многоэтапности и трудоемкости процесса очистки белков [14]. Также трудность получения холотоксина сопряжена с нестабильностью отдельных субъединиц. В конце концов, неестественно высокие скорости синтеза токсичного белка могут приводить к отсутствию дисульфидных связей и неправильной укладке белка, что, в свою очередь, ведет к деградации белка или образованию телец включения [11, 14].

Для увеличения выхода конечного продукта, в первую очередь, удобно синтезировать субъединицы отдельно друг от друга и производить сборку после очистки [11]. Также раздельное получение субъединиц упрощает работу с продуцентами с точки зрения биологической безопасности (про-

дуценты холотоксина, согласно СанПиНам, с 2011 г. относятся ко II группе патогенности) [16].

Таким образом, при получении рекомбинантного шигатоксина 2-го типа для увеличения выхода конечного продукта оптимально синтезировать субъединицы отдельно, особое внимание необходимо уделить А-субъединице, оказывающей токсический эффект на клетки-продуценты.

Цель нашего исследования заключалась в оптимизации способа получения рекомбинантных субъединиц А и В шигатоксина 2-го типа (rStx2A и rStx2B).

Материалы и методы

Получение продуцентов рекомбинантных субъединиц А и В шигатоксина 2-го типа

Получение штаммов *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS, несущих экспрессионные плазмиды pET SUMO-Stx2B и pET SUMO-Stx2A, описано авторами в предыдущей статье [17]. Вкратце, гены субъединиц шигатоксинов получали методом ПЦР-амплификации ДНК штамма *E. coli* O157:H7 (ГКПМ-Оболensk, №6098) и клонировали в экспрессионный вектор pET SUMO (Invitrogen). Плазмиды с генами белков интереса трансформировали в штамм *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS. Клетки выращивали в аутоиндукционной питательной среде ZYM-5052 при 25°C в течение 24 ч. В результате хроматографической очистки получили rStx2A и rStx2B. Выход с 1 л культуры составлял около 1 и 2 мг соответственно.

Дополнительно плазида pET SUMO-Stx2A была трансформирована методом электропорации в штамм NiCo21(DE3) (NEB).

Полноразмерный ген А-субъединицы Stx2 в данном исследовании был также получен методом ПЦР-амплификации ДНК штамма *E. coli* O157:H7 (№6098). Для реакций использовали высокоточную ДНК-полимеразу Phusion Hot Start II (Thermo Fisher Scientific, США) и в первом случае праймеры Stx2A_LIC51F (5'-GGTGATGATGATGACAAGCGGGAGTTTACGATAGACTTT-3') и Stx2A_LIC51R (5'-GGAGATGGGAAGTCATATTTACCGGTTGATATAAAAAC-3') для клонирования в вектор pLATE (Thermo Scientific) по технологии безлигазного клонирования; во втором случае – праймеры Stx2ANcoF (5'-ATATCCATGGGTCGGGAGTTTACGATAGACTTT-3') и Stx2AXhoR (5'-TTAACTCGAGTTTACCGGTTGATATAAAAAC-3') для клонирования в вектор pET-22b(+) (Novagen) по сайтам NcoI/XhoI согласно протоколу, указанному в руководстве. Параметры амплификации в обеих реакциях были следующими: первоначальная денатурация в течение 1 мин при 98°C, далее 30 циклов: 10 с при 98°C, 15 с при 58°C и 1 мин при 72°C; финальная элонгация длилась 2 мин. Продукты реакций очищали при помощи микроцентрифужных колонок QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen).

Плазмиды методом трансформации вводили в электрокомпетентные клетки *E. coli* DH12S. Бактериальные колонии, выросшие на селективной питательной среде с ампициллином (Amp, 100 мкг/мл), подвергали скринингу на наличие вставки методом ПЦР. Амплификацию проводили с помощью Taq ДНК-полимеразы и прямого праймера, огибающегося в области T7-промотора T7forward (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'), и соответствующих вставке ген-специфических обратных праймеров: для

Таблица 1. Характеристика полученных штаммов-продуцентов субъединиц шигатоксина 2-го типа *E. coli*
 Table 1. Characteristics of the obtained strains producing subunits of Shiga toxin type 2 *E. coli*

№	Штамм / Strain	Плазида / Plasmid	Ген белка / Protein gene	Антибиотик для селекции / Antibiotic for selection
1	NiCo21(DE3)	pET SUMO	stx2A	Канамицин / Kanamycin
2		pET-22b(+)	stx2A	Ампициллин / Ampicillin
3		pLATE51	stx2A	Ампициллин / Ampicillin
4	<i>E. coli</i> Rosetta (DE3)pLysS	pET SUMO	stx2A	Канамицин, хлорамфеникол / Kanamycin, Chloramphenicol
5		pET-22b(+)	stx2A	Ампициллин, хлорамфеникол / Ampicillin, Chloramphenicol
6		pLATE51	stx2A	Ампициллин, хлорамфеникол / Ampicillin, Chloramphenicol
7	<i>E. coli</i> Rosetta (DE3)pLysS	pET SUMO	stx2B	Канамицин, хлорамфеникол / Kanamycin, Chloramphenicol

штаммов с плазмидой pLATE – LIC Reverse Sequencing primer (5'- GAGCGGATAACAATTTACACAGG-3), для штаммов с плазмидой pET-22b(+) – Stx2ANcoF, при следующих условиях: первоначальная денатурация в течение 3 мин при 95°C с последующими 23 циклами по 30 с при 95°C, 30 с при 55°C и 1 мин при 72°C. По результатам анализа отбирали клоны, которые использовали при проведении дальнейшей работы.

Для подтверждения соответствия нуклеотидных последовательностей гену белка Stx2A и их правильной ориентации в векторах плазмиды отправляли на секвенирование (ЗАО «Евроген Ру», Москва, РФ). Сконструированные плазмиды назвали pLATE-Stx2A и pET-22b(+)-Stx2A. Полученные векторы экспрессии, несущие ген белка Stx2A, трансформировали в экспрессионные штаммы *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS (Novagen) и NiCo21(DE3).

Краткая характеристика всех полученных продуцентов представлена в табл. 1.

Таким образом, для экспрессии субъединиц шигатоксинов 2-го типа *E. coli* в нашей лаборатории было получено 6 продуцентов Stx2A и 1 продуцент Stx2B.

Культивирование и экспрессия белка

Штаммы NiCo21(DE3) и *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS, несущие экспрессионные плазмиды pLATE51-stx2A, pET-22b(+)-stx2A, pET SUMO-stx2A, а также штаммы *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS, несущие экспрессионную плазмиду pET SUMO-stx2B, высевали на ночь на твердую агаризованную среду с соответствующими антибиотиками (табл. 1) в рабочей концентрации (Kan – 30 мкг/мл; Amp – 100 мкг/мл; Cam – 25 мкг/мл). Единичные колонии петлей переносили в жидкую среду 2xYT, содержащую 0,1% глюкозы и соответствующие штам-

мам и плазмидам антибиотики, и инкубировали при 37°C в течение 24 ч.

Инокуляты из пробирок со штаммами-продуцентами Stx2A вносили в соответствующие пробирки на 50 мл, содержащие 5 мл свежей среды, до OD600 0,01–0,03 (OD600 – оптическая плотность суспензии при $\lambda = 600$ нм). Культивирование осуществляли при вращении на ротационном шейкере (200 об./мин) при 37°C. При достижении OD600 ~0,9 охлаждали пробирки с продуцентами до комнатной температуры и добавляли индуктор – изопропил- β -D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) – в разной концентрации: 100, 10 и 1 мкМ/мл. Дальнейшее наращивание проводили при пониженных температурах: 30, 25 и 20°C. Отбирали пробы клеток из всех образцов Stx2A до добавления индуктора и через 2 и 16 ч после введения в среду ИПТГ. Осадки из 200 мкл культуры лизировали в буфере (50 мМ трис pH 8, 50 мМ хлорида натрия, 0,2% тритон x-100, 1 мМ дитиотриетол, 0,1 мг/мл лизоцим) и анализировали в восстанавливающих условиях методом вертикального электрофореза в 12%-м полиакриламидном геле (ПААГ) с окрашиванием ку-масси R-250.

Суточную культуру штамма-продуцента Stx2B использовали для инокуляции в свежую питательную среду до ~0,01–0,03 OD600. Культивирование Stx2B осуществляли в колбах Эрленмейера объемом 750 мл, содержащих по 100 мл питательной среды в каждой, при вращении на ротационном шейкере (200 об./мин) при 37°C до достижения логарифми-



Рис. 1. Анализ синтеза Stx2A в штамме *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS с плазмидой pET SUMO в среде 2xYT при различных условиях культивирования через 16 ч после добавления индуктора. Электрофорез лизатов клеток в 12%-м ПААГ в восстанавливающих условиях. Иммуноблот с мышинными МКА против His-Tag. Стрелкой указана рассчитанная с помощью программы молекулярная масса целевого белка.

Дорожки: 1 – маркер молекулярного веса белка PageRuler Prestained Plus Protein Ladder; 2 – 30°C, 100 мкМ ИПТГ; 3 – 30°C, 10 мкМ ИПТГ; 4 – 30°C, 1 мкМ ИПТГ; 5 – 25°C, 100 мкМ ИПТГ; 6 – 25°C, 10 мкМ ИПТГ; 7 – 25°C, 1 мкМ ИПТГ; 8 – 20°C, 100 мкМ ИПТГ; 9 – 20°C, 10 мкМ ИПТГ.

Fig. 1. Analysis of Stx2A synthesis in *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS strain with pET SUMO plasmid in 2xYT medium under different cultivation conditions 16 h after addition of the inducer. Electrophoresis of cell lysates in 12% PAGE under reducing conditions. Immunoblot with mouse MAbs against His-Tag. The arrow indicates the molecular weight of the target protein calculated using the program.

Lanes: 1 – PageRuler Prestained Plus Protein Ladder molecular weight marker; 2 – 30°C, 100 μ M IPTG; 3 – 30°C, 10 μ M IPTG; 4 – 30°C, 1 μ M IPTG; 5 – 25°C, 100 μ M IPTG; 6 – 25°C, 10 μ M IPTG; 7 – 25°C, 1 μ M IPTG; 8 – 20°C, 100 μ M IPTG; 9 – 20°C, 10 μ M IPTG.

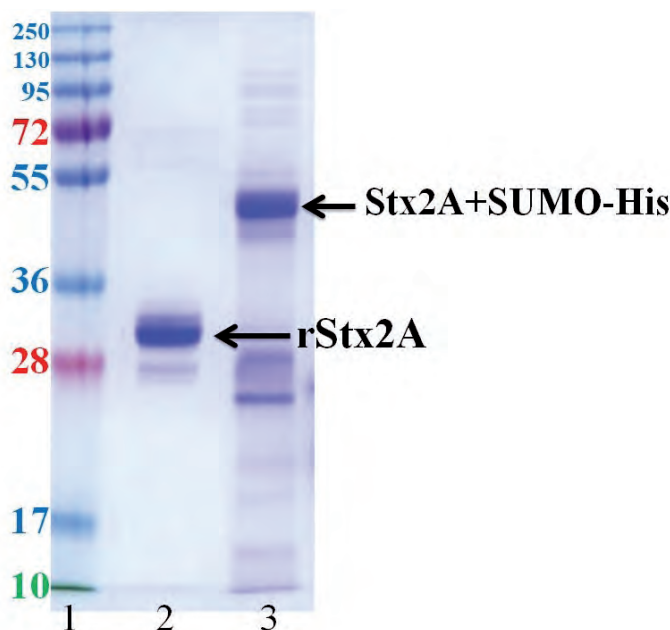


Рис. 2. Результаты хроматографической очистки А-субъединицы шигатоксина 2-го типа. Электрофорез образцов в 12%-м ПААГ в восстанавливающих условиях. Стрелками указаны молекулярные массы целевого белка в составе химерного продукта и после удаления слитого белка, рассчитанные с помощью программы.

Дорожки: 1 – маркер молекулярного веса белка PageRuler Prestained Plus Protein Ladder; 2 – рекомбинантный Stx2A после разрезания SUMO-протеазой (33 кДа), 3 мкг; 3 – рекомбинантный Stx2A в составе химерного продукта (Stx2A + SUMO-His, 46 кДа), 3 мкг.

Fig. 2. Results of chromatographic purification of the A-subunit of Shiga toxin type 2. Electrophoresis of samples in 12% PAGE under reducing conditions. Arrows indicate the molecular weights of the target protein as part of the chimeric product and after removal of the fusion protein, calculated using the program.

Lanes: 1 – molecular weight marker of the protein PageRuler Prestained Plus Protein Ladder; 2 – recombinant Stx2A after cleavage with SUMO protease (33 kDa), 3 μ g; 3 – recombinant Stx2A as part of the chimeric product (Stx2A + SUMO-His, 46 kDa), 3 μ g.

ческой фазы (~0,6 OD600). Далее охлаждали колбы с продуцентами до комнатной температуры и добавляли ИПТГ в различных концентрациях. Дальнейшее наращивание проводили при пониженных температурах. Отбирали пробы клеток из образцов штамма-продуцента Stx2B до добавления индуктора и через 2 и 16 ч после введения в среду ИПТГ. Условия культивирования после введения индуктора представлены в табл. 2.

Отобранные осадки из 200 мкл культуры также лизировали в 100 мкл буфера для лизиса и анализировали в восстанавливающих условиях методом вертикального электрофореза в 12%-м или 15%-м ПААГ. Собранные центрифугированием со 100 мл культуры осадки клеток замораживали при -80°C для хранения.

Анализ синтеза целевых белков

Анализ синтеза целевых белков проводили методом иммуноблоттинга. Для этого проводили электрофорез лизатов (по 5 мкл/лунку) в восстанавливающих условиях в 12%-м ПААГ по методу Лэммли. Белки из гелей переносили на нитроцеллюлозные мембраны с помощью полуэлектридной ячейки для переноса TransBlot SD SemiDry (Bio-Rad) по стан-

Таблица 2. Условия культивирования штамма-продуцента Stx2B в среде 2xYT
 Table 2. Cultivation conditions of the Stx2B producer strain in 2xYT medium

№	Штамм и плазмида / Strain and plasmid	Концентрация антибиотика, мкг/мл / Antibiotic concentration, µg/ml	Температура экспрессии, °C / Expression temperature, °C	Концентрация ИПТГ, мкМ/мл / IPTG concentration, µM/ml	Время, ч / Time, h
1	E. coli Rosetta (DE3)pLysS с плазмидой pET SUMO	Kan30, Cam25	30	1	2; 16
2			30	10	2; 16
3			25	1	2; 16
4			25	10	2; 16
5			25	100	2; 16
6			20	10	2; 16
7			20	100	2; 16

дартному протоколу. Мембраны блокировали в 1%-м молоке. После отмывки мембраны инкубировали с первичными антителами в концентрации 3 мкг/мл. Для контроля синтеза белка Stx2A использовали мышинное моноклональное антитело (МКА) против гистидина (6x-His-Tag Monoclonal Antibody, Thermo Fisher Scientific, США). Для контроля синтеза белка Stx2B использовали коммерческое гуманизованное МКА уртоксазумаб (ТМА-15) [18, 19]. После инкубации мембраны производили отмывку от несвязавшихся антител. Для детекции анти-Stx2A-МКА и анти-Stx2B-МКА использовали вторичные антитела, связанные с пероксидазой хрена: козье антимышиное (в разведении 1:500) и козье против γ -цепи иммуноглобулина G человека (в разведении 1:5000) соответственно. Визуализацию осуществляли с помощью реактива 3,3-диаминобензидин тетрагидрохлорид (Sigma).

Очистка целевых белков и их характеристика

Оптимальный протокол индукции, подобранный в ходе исследования, использовали для культивирования штаммов-продуцентов целевых белков. Биомассу, собранную центрифугированием с 1 л жидкой культуры клеток, замораживали для хранения при 80°C.

Бактериальные осадки ресуспендировали в буфере А (25 мМ трис-НСl, рН 8,6; 150 мМ NaCl, 10мМ имидазола, 0,2% твин-20 и 2% глицерина) и лизировали по стандартному протоколу с дальнейшей мягкой обработкой ультразвуком (Bandelin SONOPULS HD 2200, Германия) на льду до полного разрушения клеток. Клеточный дебрис осаждали на центрифуге при 48000 g в течение 15 мин при 4°C.

Очистку рекомбинантных белков из осветленных лизатов проводили с использованием хроматографа Amersham Biosciences ÄKTA FPLC (Швеция).

Осветленный лизат наносили на предварительно уравновешенную буфером А колонку с сорбентом (Seraph Technologies, Китай). Проскок собирали для анализа. Белки элюировали буфером Б состава: 25 мМ трис-НСl, рН 8,6; 150 мМ NaCl, 200 мМ имидазола, 0,2% твин-20 и 2% глицерина. Полученный образец подвергали диализу против буфера А в течение ночи для удаления имидазола из раствора. Полученный раствор белка инкубировали с протеазой SUMO (1 мкг/мл и 10X SUMO Protease Buffer) и DTT (дитиотреитол 1 мкг / мл) при 30°C в течение 2-3 ч и повторно наносили на колонку с сорбентом Polar MC60-Ni Excel. Целевые белки содержались в проскоке. Сорбированный на колонке остаток элюировали буфером Б. На каждом этапе отбирали пробы для анализа.

Далее проводили гель-фильтрационную очистку на уравновешенной фосфатно-солевым буфером (ФСБ) колонке Superdex Peptide 10/300 GL (GE Healthcare, США) для замены буфера и удаления низкомолекулярных веществ. На основании данных электрофореза в 15%-м ПААГ в денатурирующих условиях определяли фракции, в которых содержались белки интереса, и объединяли растворы.

Концентрацию очищенного белка измеряли при помощи спектрофотометра Smart Spec Plus (BioRad Laboratories, США) при длине волны 250–350 нм, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин (БСА).

Также для определения концентрации использовали инфракрасный спектрофотометр Direct Detect (Millipore, США). Систему заранее откалибровали с использованием раствора БСА в ФСБ.

Для оценки чистоты полученных рекомбинантных белков проводили электрофорез в 12%-м и 15%-м ПААГ в денатурирующих условиях по методу Лэммли. Гель окрашивали кумасси бриллиантовым синим (R-250), молекулярную массу полученных полос сравнивали с коммерческим маркером молекулярных масс PageRuler Prestained Plus Protein Ladder.

Масс-спектрометрический анализ белков

Разделение пептидов проводили на нанопотоковом хроматографе Easy nLC 1000 (Thermo Scientific, США), соединенном с масс-спектрометром высокого разрешения Orbitrap Elite ETD (Thermo Scientific, Германия). Параметры хроматографии: колонка, набитая в лабораторных условиях диаметр 75 мкм, длина 150 мм, заполнена фазой Aeris 3,6 мкм WIDEPORЕ XB-C18 (Phenomenex, США). Буферы для градиента А: вода mQ, 0,1% муравьиной кислоты. Фаза В: 80% ацетонитрила, 0,1% муравьиной кислоты. Разделение проводили в профиле элюции с 5% В до 60% В в течение 120 мин. Скорость потока элюента 250 нл/мин. Панорамный масс-спектр записывали с разрешением 60 000 на 400 m/z, спектры фрагментации – с разрешением 15 000 на 400 m/z. Фрагментацию ионов проводили в автоматическом режиме с использованием метода HCD (фрагментация, активированная соударениями в высокоэнергетической ячейке). Все измерения проводили при следующих условиях: напряжение на входном капилляре 1,8 кВ, температура входного капилляра – +200°C, нормализованная энергия активации для HCD – 28,0, ширина изоляции целевого иона – 2 m/z. Анализ масс-спектрометрических данных проводили с помощью коммерческой программы PeaksStudio 7.5.



Рис. 3. Идентификация методом масс-спектрометрического анализа с использованием программного обеспечения PEAKS Studio. Синим цветом на рисунке с последовательностью белка обозначены идентифицированные пептиды.

Fig. 3. Identification by mass spectrometric analysis using PEAKS Studio software. The identified peptides are shown in blue in the figure with the protein sequence.

Функциональная активность рекомбинантных субъединиц и оценка цитотоксичности Stx2

Исследования функциональной активности рекомбинантных субъединиц и цитотоксичности полученного Stx2 проводили на клеточной линии Vero в MTT-тесте [20]. Для опреде-

ления CD50 холотоксина в пробирке соединяли рекомбинантные субъединицы Stx2A и Stx2B, причем Stx2B всегда добавляли в 5-молярном превышении по отношению к Stx2A (для сохранения соотношения AB5). В культуральные планшеты с клеточной линией Vero, содержащие $1 \cdot 10^4$ клеток/

лунку, добавляли Stx2A, Stx2B и Stx2 в различных концентрациях: 240; 120; 60; 30; 15; 7,5; 3,7; 1,8 нг/мл. В качестве контроля использовали лунки со средой без токсина (100% жизнеспособных клеток, контроль сравнения K1) и лунки с добавлением мертиолята натрия (Oskar Tropitzsch, Германия) до конечной концентрации 0,024% (100% нежизнеспособных клеток, контроль сравнения K2). Все исследуемые точки дублировали в 6 повторностях. Подготовленные культуральные планшеты оставляли на 72 ч в CO₂-инкубаторе. Через 72 ч инкубации в лунки добавляли по 10 мкл стокового раствора МТТ (тиазолил синий тетразолий бромид) и инкубировали еще 4 ч. Затем аккуратно убирали культуральную среду с МТТ и лизировали клеточный слой добавлением 200 мкл диметилсульфоксида (Sigma-Aldrich, США). Для полного лизиса клеток и равномерного растворения кристаллов формазана планшеты помещали на платформу шейкера TS-100С (BioSan, Латвия) и качали 10 минут 500 об./мин при комнатной температуре. Оптическую плотность клеточного лизата измеряли при длине волны 540 нм (OD540) на планшетном спектрофотометре xMark (Bio-Rad, США). Процент выживших клеток после добавления Stx определяли по формуле:

$$\text{Процент выживших клеток} = \frac{\text{ОП}_{\text{ср. опытных лунок}}}{\text{ОП}_{\text{ср. контрольных лунок (K1-K2)}}} \times 100\%, \quad (1)$$

где

ОП_{ср. опытных лунок} – это средняя (для 6 повторностей) оптическая плотность лунок с исследуемыми образцами;

ОП_{ср. контрольных лунок} – разница оптической плотности контрольных лунок:

K1 – контроль сравнения, 100% жизнеспособных клеток;

K2 – контроль сравнения, 100% нежизнеспособных клеток.

Результаты исследования и их обсуждение

Получение рекомбинантной А-субъединицы шигатоксина 2-го типа

Для конструирования оптимального продуцента субъединицы А шигатоксина 2-го типа использовали 2 штамма: NiCo21(DE3) и *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS.

В геноме клеток коммерческого штамма NiCo21(DE3) инактивированы гены протеолитических ферментов *lon* (цитоплазматическая протеаза) и *ompT* (периплазматическая протеаза), что в нашем эксперименте предотвращает возможную протеолитическую деградацию синтезируемого Stx2A-полипептида.

Клетки штамма *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS содержат тРНК для кодонов AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA, которые редко используются в *E. coli* дикого типа, что обеспечивает усиление экспрессии гетерологичных белков. Также штамм *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS содержит плазмиду pLysS, которая продуцирует лизоцим фага T7, дополнительно ингибирующий транскрипцию T7-управляемых гетерологичных генов, что задерживает синтез токсичных для клеток-продуцентов белков до начала индукции.

Поскольку Stx2A является токсичным белком для клеток хозяина (*E. coli*), базальная экспрессия гена может привести к нестабильности плазмиды и/или гибели клеток-продуцен-

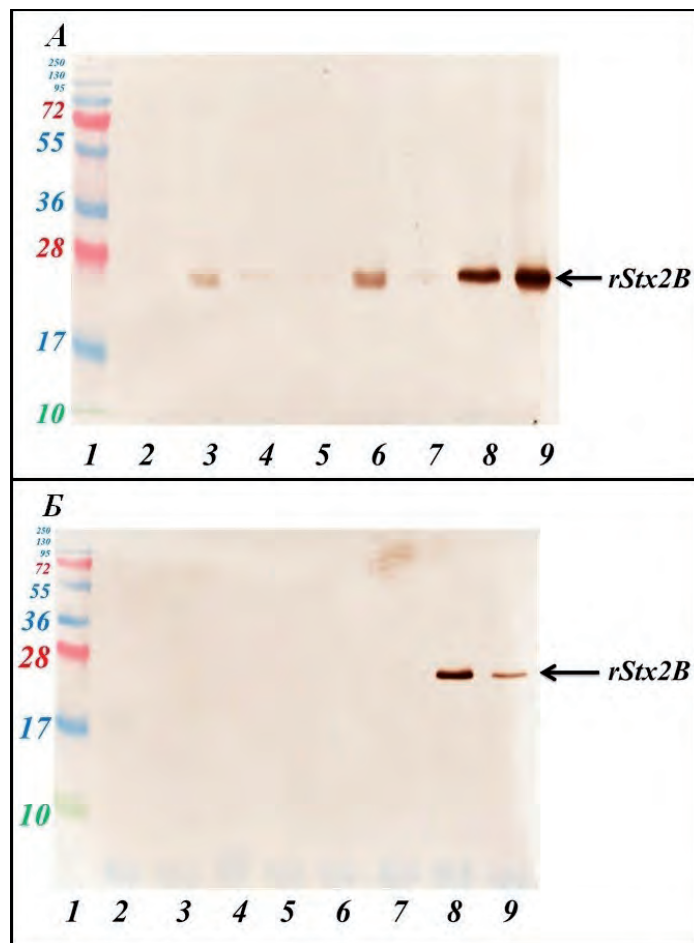


Рис. 4. Анализ синтеза Stx2B, слитого с SUMO-белком, в клетках *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS при различных условиях культивирования через 2 (А) и 16 ч (Б) после добавления индуктора. Электрофорез лизатов клеток в 12%-м ПААГ в невозстанавливающих условиях. Иммуноблот с коммерческим гуманизированным МКА TMA-15 (уртоксазумаб), специфичным к Stx2B.

Дорожки: 1 – маркер молекулярного веса белка PageRuler Prestained Plus Protein Ladder; 2 – контроль, до добавления IPTG; 3 – 30°C, 1 мкМ ИПТГ; 4 – 25°C, 1 мкМ ИПТГ; Дорожка 5 – 30°C, 10 мкМ ИПТГ; 6 – 25°C, 10 мкМ ИПТГ; 7 – 20°C, 10 мкМ ИПТГ; 8 – 25°C, 100 мкМ ИПТГ; 9 – 20°C, 100 мкМ ИПТГ.

Fig. 4. Analysis of the synthesis of Stx2B fused with SUMO protein in *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS cells under different cultivation conditions 2 (A) and 16 h (B) after the addition of the inducer. Electrophoresis of cell lysates in 12% PAGE under non-reducing conditions. Immunoblot with commercial humanized mAb TMA-15 (urtoxazumab), specific for Stx2B.

Lanes: 1 – molecular weight marker of the protein PageRuler Prestained Plus Protein Ladder; 2 – control, before the addition of IPTG; 3 – 30°C, 1 μM IPTG; 4 – 25°C, 1 μM IPTG; Lane 5 – 30°C, 10 μM IPTG; 6 – 25°C, 10 μM IPTG; 7 – 20°C, 10 μM IPTG; 8 – 25°C, 100 μM IPTG; 9 – 20°C, 100 μM IPTG.

тов. Для решения данной проблемы эффективно использовать один из плазмидных векторов, рекомендованных для получения токсичных белков. При создании векторов экспрессии наш выбор остановился на трех вариантах: pET SUMO, pET-22b(+), pLATE.

На базе двух штаммов *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS с NiCo21(DE3) и с использованием трех экспрессионных векторов pET SUMO, pET-22b(+), pLATE было сконструировано 6 продуцентов Stx2A. Для получения высокого выхода целевого белка подбирали температурный режим (30, 25 и 20°C),

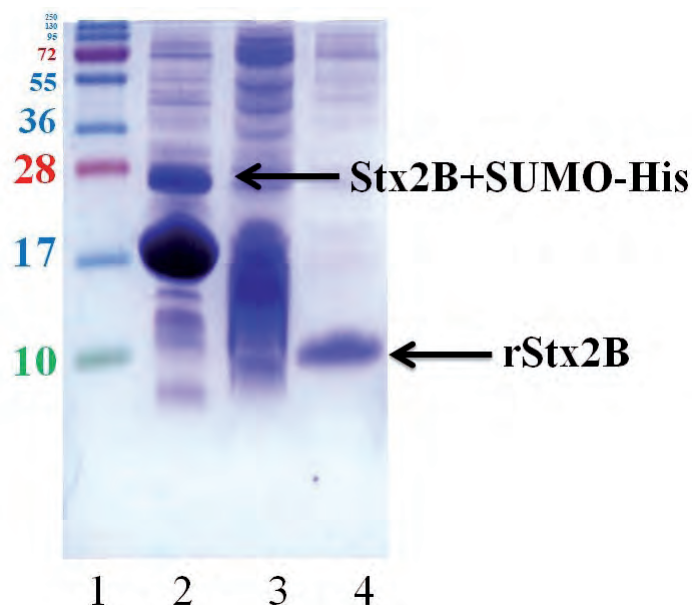


Рис. 5. Результаты хроматографической очистки В-субъединицы шигатоксина 2-го типа. Электрофорез образцов в 15%-м ПААГ в восстанавливающих условиях. Стрелками указаны молекулярные массы целевого белка в составе химерного продукта и после удаления слитого белка, рассчитанные с помощью программы.

Дорожки: 1 – маркер молекулярного веса белка PageRuler Prestained Plus Protein Ladder; 2 – рекомбинантный Stx2B в составе химерного продукта (Stx2A+ SUMO-His, 21 кДа), 3 мкг; 3 – элюат после разрезания, содержащий SUMO-His (13 кДа); 4 – рекомбинантный Stx2B после разрезания SUMO-протеазой (8 кДа), 3 мкг.

Fig. 5. Results of chromatographic purification of the B-subunit of Shiga toxin type 2. Electrophoresis of samples in 15% PAGE under reducing conditions. Arrows indicate the molecular weights of the target protein in the chimeric product and after removal of the fusion protein, calculated using the program.

Lanes: 1 – molecular weight marker of the protein PageRuler Prestained Plus Protein Ladder; 2 – recombinant Stx2B in the chimeric product (Stx2A+ SUMO-His, 21 kDa), 3 µg; 3 – eluate after cleavage, containing SUMO-His (13 kDa); 4 – recombinant Stx2B after cleavage with SUMO protease (8 kDa), 3 µg.

концентрацию индуктора (100, 10 и 1 мкМ) и продолжительность культивирования штаммов-продуцентов (2, 16 ч).

После культивирования штаммов-продуцентов Stx2A при разных условиях было отобрано и проанализировано методами электрофореза 108 образцов. Однако после окрашивания гелей не наблюдалось полос на уровне теоретически ожидаемой молекулярной массы целевого продукта, что может свидетельствовать о низкой концентрации целевого белка или полном его отсутствии. Поэтому дополнительно мы использовали иммуноблоттинг, который является более чувствительным методом выявления специфического белка. Согласно расчетам, выполненным с использованием компьютерных программ (<https://web.expasy.org/protparam/>), целевой белок, находящийся в составе химерного продукта (Stx2A+SUMO-His), должен иметь молекулярную массу ~46 кДа, а во всех остальных случаях – ~33 кДа. В результате иммуноблоттинга было установлено, что Stx2A содержится в лизатах штамма *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS с плазмидой pET SUMO-stx2A в составе химерного продукта Stx2A+SUMO-His (рис. 1). В остальных образцах белок Stx2A не выявили.

Также анализ результатов иммуноблоттинга позволил выявить наиболее оптимальные условия получения rStx2A в

штамме *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS, несущем плазмиду pET SUMO. На основании сравнительного исследования было выявлено, что наибольшее количество Stx2A наблюдается в образце №8, культивируемом при условиях 20°C, 10 мкМ ИПТГ, через 16 ч после добавления индуктора (рис. 1, дорожка 9).

Штамм-продуцент А-субъединицы шигатоксина *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS наращивали по выбранной стратегии культивирования, бактериальные осадки лизировали и проводили металл-хелатную хроматографическую очистку. После гидролиза химерного продукта, катализируемого SUMO-протеазой, получили белок с молекулярной массой ~33 кДа, что соответствует молекулярной массе Stx2A. Результаты хроматографической очистки представлены на рис. 2.

Конечный выход Stx2A составил 1,5 мг с литра, что сопоставимо с данными других исследователей [11–15]. Чистота белка, проанализированная с помощью программного обеспечения Gel-Pro Analyzer, составляла 90%.

Верификацию белка Stx2A проводили с использованием масс-спектрометрического анализа. В результате анализа был определен 151 пептид белка субъединицы А с суммарным покрытием последовательности белка 84% (рис. 3). Пептидов, соответствующих последовательности субъединицы В, обнаружено не было.

Для идентификации белка мы брали содержащую лидерный пептид последовательность Stx2A из базы данных. Полученный нами белок не содержит лидерного пептида, поэтому данный фрагмент не обнаруживается в образце. Таким образом, суммарное покрытие относительно целевой последовательности рекомбинантной А-субъединицы шигатоксина 2-го типа составляет 90%.

Получение рекомбинантной В-субъединицы шигатоксина 2-го типа

На следующем этапе мы получили В-субъединицу Stx2. Для этого использовали штамм *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS, несущий экспрессионную плазмиду pET SUMO-Stx2B. При культивировании штамма-продуцента Stx2B в среде 2xYT при разных условиях было отобрано и проанализировано 14 индуцированных образцов. Согласно расчетам, произведенным с помощью компьютерной программы (<https://web.expasy.org/protparam/>), молекулярная масса белка интереса, находящегося в составе химерного продукта (Stx2B+SUMO-His), должна составлять 21 кДа. Поскольку электрофорез лизатов клеток-продуцентов не демонстрировал четкого различия интенсивности окраски белковых полос, мы использовали иммуноблоттинг для выявления Stx2B в образцах.

В результате анализа с использованием коммерческого МКА был выявлен белок, соответствующий по молекулярной массе Stx2B+SUMO-His (рис. 4).

В результате иммуноблоттинга было установлено, что Stx2B содержится в двух образцах уже через 2 ч (рис. 4А) и практически во всех образцах через 16 ч (рис. 4Б) после индукции, причем наибольшее количество целевого белка обнаруживалось в образце №7 (20°C, 100 мкМ ИПТГ) через 16 ч после добавления индуктора (дорожка 9).

Таким образом, в эксперименте было установлено, что для полученного штамма-продуцента наиболее оптимальны-

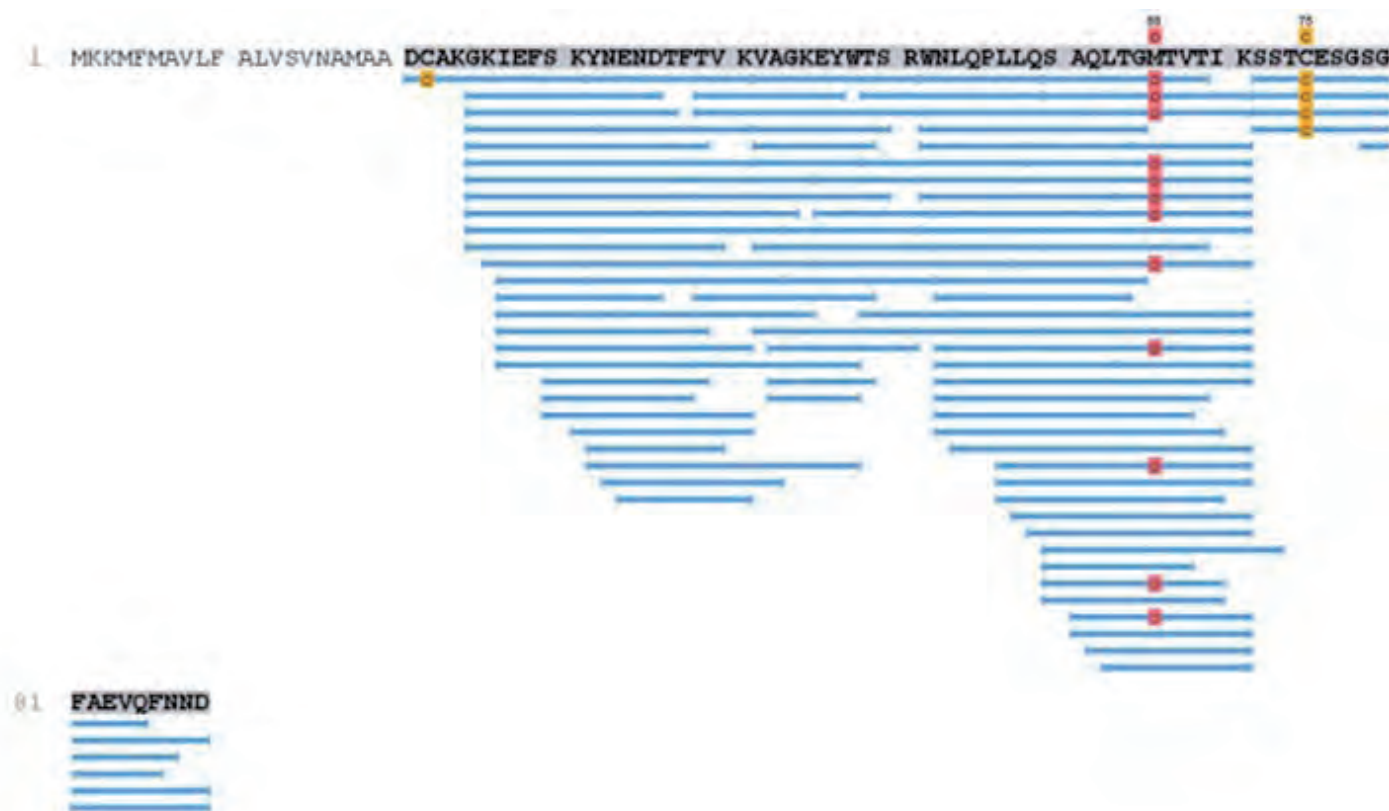


Рис. 6. Идентификация Stx2B методом масс-спектрометрического анализа с использованием программного обеспечения PEAKS Studio. Синим цветом на рисунке с последовательностью белка обозначены идентифицированные пептиды.
Fig. 6. Identification of Stx2B by mass spectrometric analysis using PEAKS Studio software. The identified peptides are shown in blue in the protein sequence figure.

ми условиями для синтеза В-субъединицы шигатоксина 2-го типа являются снижение температуры инкубирования до 20°C и увеличение времени до 16 ч при использовании ИПТГ в концентрации 100 мкМ. Методику культивирования данного образца использовали в дальнейшем для получения В-субъединицы шигатоксина.

Штамм-продуцент *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS с экспрессионной плазмидой pET SUMO-Stx2B культивировали по выбранной стратегии экспрессии, биомассу с 1 л жидкой культуры лизировали и очищали с помощью металл-хелатной хроматографии. Выделенный белок с молекулярной массой 21 кДа подвергали протеолизу с использованием SUMO-протеазы, в результате в проскоке обнаруживался белок с молекулярной массой ~8 кДа, что соответствует ожидаемой молекулярной массе Stx2B. Результаты очистки рекомбинантной В-субъединицы шигатоксина 2-го типа представлены на рис. 5.

В результате конечный выход Stx2B составил 4 мг с литра. Чистота белка, проанализированная с помощью программного обеспечения Gel-Pro Analyzer, составляла 85%.

Верификацию белка Stx2B проводили масс-спектрометрическим анализом. В результате анализа были определены 69 пептидов белка субъединицы В с суммарным покрытием последовательности белка 78% (рис. 6).

Пептидов, соответствующих последовательности субъединицы А, обнаружено не было. Так как полученный нами rStx2B не содержит лидерного пептида, который представлен на последовательности, взятой из базы данных, он не

обнаруживается в образце. В связи с вышесказанным суммарное покрытие относительно целевой последовательности В-субъединицы составляет 100%.

Оценка функциональной активности rStx2A и rStx2B и цитотоксичности холотоксина

Функциональным рецептором шигатоксина 2-го типа является нейтральный гликофинголипид глоботриацоилцерамид (Gb3), локализующийся на цитоплазматических мембранах эндотелиальных клеток почек. В связи с этим клеточную линию Vero использовали для определения функциональной активности и цитотоксичности rStx2A и rStx2B. Результаты исследования представлены на рис. 7.

В опыте белки Stx2A и Stx2B по отдельности не оказывали цитотоксического действия на культуру Vero. Однако воздействие холотоксина (соединение субъединиц *in vitro*) вызывало дозозависимую гибель клеток Vero. Значение 50%-й цитотоксической дозы для рекомбинантного шигатоксина 2-го типа в эксперименте составляло 15 нг/мл.

В первоначальных исследованиях по получению шигатоксинов полноразмерные белки синтезировались с выделением в культуральную жидкость [15], но это затрудняет выделение белка при получении его в больших объемах, а также не исключает гибели продуцентов в процессе экспрессии и не приводит к высокому выходу продукта. В России опубликован патент [21], в котором говорится о получении токсина при внесении точечных мутаций с синтезом белка в периплазму. Однако периплазматическое пространство занима-

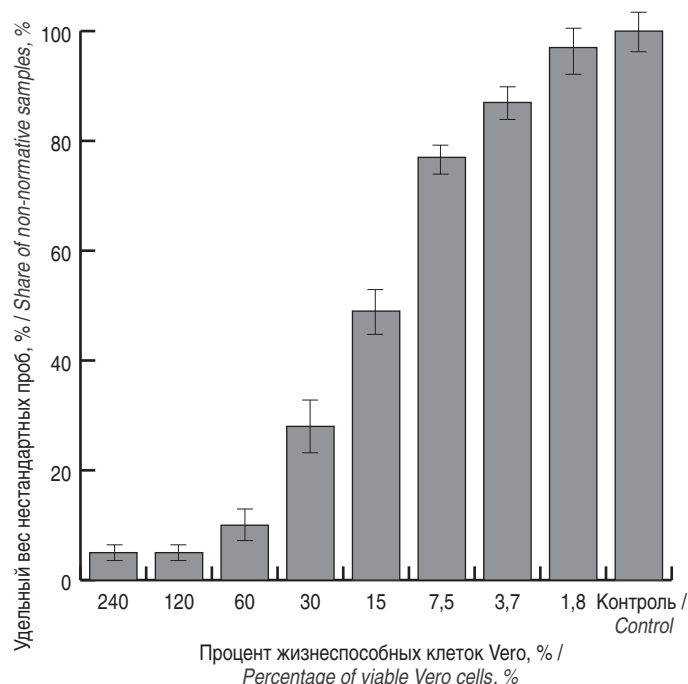


Рис. 7. Цитотоксическое действие Stx2 на клетки Vero.
Fig. 7. Cytotoxic effect of Stx2 on Vero cells.

ет малую часть от объема клетки, поэтому выход получается невысоким. В связи с этим для увеличения выхода оптимально получать субъединицы токсина отдельно друг от друга при синтезе в цитоплазму. Чаухан и соавт. [11] сообщали о получении А-субъединицы шигатоксина 2-го типа, но в их работе белок выделяется в виде телец включения и приходится проводить ренатурацию белка, что может сказываться на биологической активности продукта.

Наши исследования показали, что продукция белка в штаммах, несущих плазмиды pET-22b(+)-stx2A и pLATE51-stx2A, и штамме NiCo21(DE3) с плазмидой pET SUMO-stx2A является неудачной. Единственным штаммом, который обеспечивал синтез А-субъединицы шигатоксина 2-го типа, был *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS, трансформированный плазмидой pET SUMO-stx2A. Таким образом, целевой белок был синтезирован в составе химерного продукта. За счет этого обеспечивался правильный фолдинг и белок удалось выделить в растворимой форме. Аналогичный штамм *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS, трансформированный плазмидой pET SUMO-stx2B, использовали для получения рекомбинантной В-субъединицы шигатоксина 2-го типа.

Благодаря удалению фрагмента SUMO-His конечные А- и В-субъединицы шигатоксина 2-го типа получились без дополнительных аминокислотных последовательностей, что должно способствовать их правильной сборке в холотоксин, а также предотвращать перекрытие активных центров для сохранения функциональной активности.

Учитывая тот факт, что неестественно высокие скорости синтеза белка могут приводить к отсутствию дисульфидных связей и неправильной укладке белка, что, в свою очередь, влечет деградацию белка или образование телец включения, мы осуществляли подбор условий культивирования штаммов-продуцентов. Для решения данной проблемы бактерии наращивали при температуре индукции, пониженной до 30, 25 или 20°C, и вводили ИПТГ в различной

концентрации с одновременным увеличением времени индукции.

В результате анализа влияния различных факторов на продукцию белка были установлены оптимальные условия для получения Stx2A и Stx2B. Помимо снижения деградации белка, это также позволило повысить конечную биомассу клеток.

Клетки Vero использовали для анализа клеточной цитотоксичности, поскольку эти клетки экспрессируют высокий уровень рецептора Gb3, который связывается с шигатоксинами. В микротесте rStx2A и rStx2B проявляли цитотоксическую активность при образовании холотоксина *in vitro*, что подтверждает их функциональную активность.

Таким образом, нами были подобраны условия по оптимизации способа получения рекомбинантных субъединиц А и В шигатоксина 2-го типа (rStx2A и rStx2B). Наиболее оптимальной методикой получения субъединицы А шигатоксина 2-го типа является использование штамма *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS, несущего экспрессионную плазмиду pET SUMO, при культивировании в среде 2xYT наиболее продуктивно наращивать клетки до OD600 ≈ 1 (для набора максимальной биомассы) и инкубировать при 20°C после добавления 10 мкМ ИПТГ в течение 16 ч.

Субъединица В шигатоксина 2-го типа успешно продуцировалась в штамме *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS, несущем экспрессионную плазмиду pET SUMO, в среде 2xYT. Увеличение конечного выхода белка обеспечивалось при культивировании при сниженной до 20°C температуре после добавления ИПТГ в концентрации 100 мкМ, экспрессия белка продолжалась в течение 16 ч.

Установленный в ходе исследования алгоритм получения субъединиц использовали для получения целевого белка. Конечный выход составлял для Stx2A 1,5 мг с литра, для Stx2B – 4 мг с литра. Идентичность рекомбинантных белков Stx2A и Stx2B подтвердили методом масс-спектрометрии. В ходе данной работы была показана функциональная активность полученных белков в форме холотоксина в микротесте МТТ по определению цитотоксичности.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was carried out within the framework of the sectoral program of Rosпотребнадзор.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Menge C. Molecular Biology of *Escherichia coli* Shiga Toxins' Effects on Mammalian Cells. *Toxins* (Basel). 2020 May 23;12(5):345. DOI: 10.3390/toxins12050345
2. Basu D, Tumer NE. Do the A subunits contribute to the differences in the toxicity of Shiga toxin 1 and Shiga toxin 2? *Toxins* (Basel). 2015 Apr 29;7(5):1467-85. DOI: 10.3390/toxins7051467

- Scheiring J, Andreoli SP, Zimmerhackl LB. Treatment and outcome of Shiga-toxin-associated hemolytic uremic syndrome (HUS). *Pediatr Nephrol*. 2008 Oct;23(10):1749-60. DOI: 10.1007/s00467-008-0935-6
- Biernbaum EN, Kudva IT. AB5 Enterotoxin-Mediated Pathogenesis: Perspectives Gleaned from Shiga Toxins. *Toxins (Basel)*. 2022 Jan 16;14(1):62. DOI: 10.3390/toxins14010062
- Melton-Celsa AR. Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. *Microbiol Spectr*. 2014 Aug;2(4):EHEC-0024-2013. DOI: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013
- Lee MS, Cherla RP, Tesh VL. Shiga toxins: intracellular trafficking to the ER leading to activation of host cell stress responses. *Toxins (Basel)*. 2010 Jun;2(6):1515-35. DOI: 10.3390/toxins2061515
- Beddoe T, Paton AW, Le Nours J, Rossjohn J, Paton JC. Structure, biological functions and applications of the AB5 toxins. *Trends Biochem Sci*. 2010 Jul;35(7):411-8. doi: 10.1016/j.tibs.2010.02.003
- Johannes L. Shiga Toxin-A Model for Glycolipid-Dependent and Lectin-Driven Endocytosis. *Toxins (Basel)*. 2017 Oct 25;9(11):340. DOI: 10.3390/toxins9110340
- Sandvig K, Bergan J, Dyve AB, Skotland T, Torgersen ML. Endocytosis and retrograde transport of Shiga toxin. *Toxicon*. 2010 Dec 15;56(7):1181-5. DOI: 10.1016/j.toxicon.2009.11.021
- Olenick JG, Wolfe AD. Shigella toxin inhibition of binding and translation of polyuridylic acid by *Escherichia coli* ribosomes. *J Bacteriol*. 1980 Mar;141(3):1246-50. DOI: 10.1128/jb.141.3.1246-1250.1980
- Chauhan V, Chaudhary D, Rao MK, Dhaked RK. Expression, Purification and Immunological Characterization of Recombinant Shiga Toxin A Subunit. *Protein Pept Lett*. 2015;22(9):844-52. DOI: 10.2174/0929866522666150707115007
- Chauhan V, Chauhan R, Sonkar P, Dhaked RK. Biochemical Characterization of *In vitro* Reconstituted Biologically Active Recombinant Shiga Toxin. *Protein Pept Lett*. 2019;26(3):227-234. DOI: 10.2174/0929866526666181228161834
- Tu W, Cai K, Gao X, Xiao L, Chen R, Shi J, et al. Improved production of holotoxin Stx2 with biological activities by using a single-promoter vector and an auto-induction expression system. *Protein Expr Purif*. 2009 Oct;67(2):169-74. DOI: 10.1016/j.pep.2009.05.005
- Tu W, Li T, Wang Q, Cai K, Gao X, Wang H. A simple method for expression and purification of Shiga toxin 1 (Stx1) with biological activities by using a single-promoter vector and native signal peptide. *Biotechnol Appl Biochem*. 2016 Jul;63(4):539-45. DOI: 10.1002/bab.1398
- Huang A, de Grandis S, Friesen J, Karmali M, Petric M, Congi R, et al. Cloning and expression of the genes specifying Shiga-like toxin production in *Escherichia coli* H19. *J Bacteriol*. 1986 May;166(2):375-9. DOI: 10.1128/jb.166.2.375-379.1986
- Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 29 июня 2011 г. №86 (Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней). Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.2322-08).
- Шкуратова МА, Марьин МА, Рогозин ММ, Сурин АК, Коломбет ЛВ, Фирстова ВВ. Получение и масс-спектрометрическая характеристика рекомбинантных субъединиц шига-токсинов первого и второго типов (Stx1 и Stx2) *Escherichia coli*. *Бактериология*. 2021;6(4):30-38. DOI: 10.20953/2500-1027-2021-4-30-38
- Moxley RA, Francis DH, Tamura M, Marx DB, Santiago-Mateo K, Zhao M. Efficacy of Urtoxazumab (TMA-15 Humanized Monoclonal Antibody Specific for Shiga Toxin 2) Against Post-Diarrheal Neurological Sequelae Caused by *Escherichia coli* O157:H7 Infection in the Neonatal Gnotobiotic Piglet Model. *Toxins (Basel)*. 2017 Jan 26;9(2):49. DOI: 10.3390/toxins9020049
- Yamagami S, Motoki M, Kimura T, Izumi H, Takeda T, Katsuura Y, Matsumoto Y. Efficacy of postinfection treatment with anti-Shiga toxin (Stx) 2 humanized monoclonal antibody TMA-15 in mice lethally challenged with Stx-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis*. 2001 Sep 15;184(6):738-42. DOI: 10.1086/323082
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4
- Козлов ЮВ, Лукьянов ЕВ, Захарова ЛГ. Нетоксичный рекомбинантный шига-токсин 2-го типа (Stx2). Патент RU2573924C2, бюллетень №3, опубл. 27.01.2016.

References

- Menge C. Molecular Biology of *Escherichia Coli* Shiga Toxins' Effects on Mammalian Cells. *Toxins (Basel)*. 2020 May 23;12(5):345. DOI: 10.3390/toxins12050345
- Basu D, Tumer NE. Do the A subunits contribute to the differences in the toxicity of Shiga toxin 1 and Shiga toxin 2? *Toxins (Basel)*. 2015 Apr 29;7(5):1467-85. DOI: 10.3390/toxins7051467
- Scheiring J, Andreoli SP, Zimmerhackl LB. Treatment and outcome of Shiga-toxin-associated hemolytic uremic syndrome (HUS). *Pediatr Nephrol*. 2008 Oct;23(10):1749-60. DOI: 10.1007/s00467-008-0935-6
- Biernbaum EN, Kudva IT. AB5 Enterotoxin-Mediated Pathogenesis: Perspectives Gleaned from Shiga Toxins. *Toxins (Basel)*. 2022 Jan 16;14(1):62. DOI: 10.3390/toxins14010062
- Melton-Celsa AR. Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. *Microbiol Spectr*. 2014 Aug;2(4):EHEC-0024-2013. DOI: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013
- Lee MS, Cherla RP, Tesh VL. Shiga toxins: intracellular trafficking to the ER leading to activation of host cell stress responses. *Toxins (Basel)*. 2010 Jun;2(6):1515-35. DOI: 10.3390/toxins2061515
- Beddoe T, Paton AW, Le Nours J, Rossjohn J, Paton JC. Structure, biological functions and applications of the AB5 toxins. *Trends Biochem Sci*. 2010 Jul;35(7):411-8. doi: 10.1016/j.tibs.2010.02.003
- Johannes L. Shiga Toxin-A Model for Glycolipid-Dependent and Lectin-Driven Endocytosis. *Toxins (Basel)*. 2017 Oct 25;9(11):340. DOI: 10.3390/toxins9110340
- Sandvig K, Bergan J, Dyve AB, Skotland T, Torgersen ML. Endocytosis and retrograde transport of Shiga toxin. *Toxicon*. 2010 Dec 15;56(7):1181-5. doi: 10.1016/j.toxicon.2009.11.021
- Olenick JG, Wolfe AD. Shigella toxin inhibition of binding and translation of polyuridylic acid by *Escherichia coli* ribosomes. *J Bacteriol*. 1980 Mar;141(3):1246-50. DOI: 10.1128/jb.141.3.1246-1250.1980
- Chauhan V, Chaudhary D, Rao MK, Dhaked RK. Expression, Purification and Immunological Characterization of Recombinant Shiga Toxin A Subunit. *Protein Pept Lett*. 2015;22(9):844-52. DOI: 10.2174/0929866522666150707115007
- Chauhan V, Chauhan R, Sonkar P, Dhaked RK. Biochemical Characterization of *In vitro* Reconstituted Biologically Active Recombinant Shiga Toxin. *Protein Pept Lett*. 2019;26(3):227-234. doi: 10.2174/0929866526666181228161834
- Tu W, Cai K, Gao X, Xiao L, Chen R, Shi J, et al. Improved production of holotoxin Stx2 with biological activities by using a single-promoter vector and an auto-induction expression system. *Protein Expr Purif*. 2009 Oct;67(2):169-74. DOI: 10.1016/j.pep.2009.05.005
- Tu W, Li T, Wang Q, Cai K, Gao X, Wang H. A simple method for expression and purification of Shiga toxin 1 (Stx1) with biological activities by using a single-promoter vector and native signal peptide. *Biotechnol Appl Biochem*. 2016 Jul;63(4):539-45. DOI: 10.1002/bab.1398
- Huang A, de Grandis S, Friesen J, Karmali M, Petric M, Congi R, et al. Cloning and expression of the genes specifying Shiga-like toxin production in *Escherichia coli* H19. *J Bacteriol*. 1986 May;166(2):375-9. DOI: 10.1128/jb.166.2.375-379.1986
- Resolution of the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation dated June 29, 2011 №86 (Safety of working with microorganisms of III–IV pathogenicity (hazard) groups and pathogens of parasitic diseases, Sanitary and Epidemiological Rules SP 1.3.2322-08). (In Russian).

17. Shkuratova MA, Maryin MA, Rogozin MM, Surin AK, Kolombet LV, Firstova VV. Preparation and mass-spectrometric characteristics of recombinant shiga-toxin units of the first and second types (Stx1 and Stx2) *Escherichia coli*. *Bacteriology*. 2021;6(4):30-38. (In Russian).
18. Moxley RA, Francis DH, Tamura M, Marx DB, Santiago-Mateo K, Zhao M. Efficacy of Urtoxazumab (TMA-15 Humanized Monoclonal Antibody Specific for Shiga Toxin 2) Against Post-Diarrheal Neurological Sequelae Caused by *Escherichia coli* O157:H7 Infection in the Neonatal Gnotobiotic Piglet Model. *Toxins (Basel)*. 2017 Jan 26;9(2):49. DOI: 10.3390/toxins9020049
19. Yamagami S, Motoki M, Kimura T, Izumi H, Takeda T, Katsuura Y, Matsumoto Y. Efficacy of postinfection treatment with anti-Shiga toxin (Stx) 2 humanized monoclonal antibody TMA-15 in mice lethally challenged with Stx-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis*. 2001 Sep 15;184(6):738-42. DOI: 10.1086/323082
20. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4
21. Kozlov JuV, Luk'janov EV, Zakharova LG. Non-toxic recombinant shiga toxin type 2 (Stx2) 3 Patent RU2573924C2, Bull. №3, Date of publication: 27.01.2016. (In Russian).

Информация о соавторах:

Марьин Максим Александрович, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии в ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Рогозин Метхун Мадибронович, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии в ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Калмантаева Ольга Валериевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии в ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Хлынцева Анна Евгеньевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии в ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Сурин Алексей Константинович, кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов в ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Фирстова Виктория Валерьевна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии в ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Maksim A. Maryin, Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Methun M. Rogozin, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Olga V. Kalmantaeva, PhD (Biological Science), Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Anna E. Khllyntseva, PhD (Biological Science), Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Alexey K. Surin, PhD (Physics and Mathematics Science), Senior Researcher, Department of Immunobiology of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Victoria V. Firstova, PhD, DSc (Biological Science), Chief Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Модель развития вентилятор-ассоциированной пневмонии

Пневмония, ассоциированная с вентиляцией, определяется как пневмония, которая развивается у пациента, находящегося на искусственной вентиляции легких более 48 ч через эндотрахеальную трубку. Она вызвана образованием биопленки на трубке, которая вводит патогенные микробы, такие как *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* и *Candida albicans*, в нижние дыхательные пути пациента. В настоящее время отсутствуют точные модели развития вентилятор-ассоциированной пневмонии *in vitro*. Это значительно ограничивает понимание того, как среда внутри хозяина изменяет физиологию патогена, и эффективность стратегий профилактики или лечения вентилятор-ассоциированной пневмонии. Разработана воспроизводимая модель, имитирующая образование биопленки этих патогенов в среде, имитирующей хозяина, и показано, что полученная матрица биопленки отличается от наблюдаемой в стандартной лабораторной питательной среде. В модели патогены выращиваются на сегментах эндотрахеальной трубки в присутствии новой синтетической среды слизи вентилируемых дыхательных путей, которая имитирует среду внутри хозяина. Для характеристики системы с точки зрения состава и структуры матрицы биопленки по сравнению со стандартной лабораторной средой роста использовались ферменты, разрушающие матрицу, и криосканирующая электронная микроскопия. Как видно на примере пациентов, биопленки патогенов вентилятор-ассоциированной пневмонии в данной модели либо требовали очень высоких концентраций антимикробных препаратов для уничтожения, либо не могли быть уничтожены. Однако сочетание ферментов, разрушающих матрицу, с антимикробными препаратами значительно улучшило удаление биопленки всех патогенов. Эта модель эндотрахеальной трубки *in vitro* информирует о фундаментальной микробиологии в контексте вентилятор-ассоциированной пневмонии и имеет широкое применение в качестве скрининговой платформы для мер по борьбе с биопленкой, включая использование ферментов, разрушающих матрицу, в качестве антимикробных адьювантов.

Walsh D, Parmenter C, Bakker SE, Lithgow T, Traven A, Harrison F.

A new model of endotracheal tube biofilm identifies combinations of matrix-degrading enzymes and antimicrobials able to eradicate biofilms of pathogens that cause ventilator-associated pneumonia. Microbiology (Reading). 2024 Aug;170(8). DOI: 10.1099/mic.0.001480