

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ОДНОЦЕПОЧЕЧНОГО АНТИТЕЛА К АЛЬФА/БЕТА-ГИДРОЛАЗЕ МИКРОСПОРИДИИ *PARANOSEMA LOCUSTAE* И ИММУНОЛОКАЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТА В ЗАРАЖЕННОЙ КЛЕТКЕ ХОЗЯИНА

© В. В. Долгих,¹ А. А. Царев, И. В. Сендерский, С. А. Тимофеев

Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений,
Санкт-Петербург—Пушкин, 196608;

¹ электронный адрес: dollslav@yahoo.com

Микроспоридии — широко распространенная группа близких к грибам облигатных внутриклеточных паразитов. Прямой контакт большинства микроспоридий с цитоплазмой зараженной клетки хозяина предполагает возможность секреции паразитами разнообразных белков для управления ее физиологическими процессами. В предыдущих экспериментах с помощью поликлональных антител к альфа/бета-гидролазе микроспоридии *Paranosema locustae* была показана секреция значительных количеств фермента в цитоплазму зараженных клеток жирового тела перелетной саранчи *Locusta migratoria*. Однако дрожжевые грибы *Pichia pastoris* не распознавали фермент как секреторный в ходе его гетерологической экспрессии. В данном исследовании сконструирована библиотека рекомбинантных одноцепочечных антител (scFv-фрагментов) к белкам зараженного жирового тела саранчи. Использование технологии фагового дисплея позволило отобрать из нее мини-антитело, специфично распознающее изучаемый фермент. Иммуноблоттинг и иммуномечение замороженных срезов жирового тела саранчи с помощью отобранного scFv-фрагмента подтвердили факт секреции альфа/бета-гидролазы *Paranosema locustae* в зараженную клетку хозяина в виде двух различных по размеру форм. Рассматриваются перспективы использования отобранного scFv-фрагмента для дальнейшего изучения механизма секреции паразитического белка и его роли во взаимоотношениях паразита и хозяина.

Ключевые слова: микроспоридии, паразито-хозяинные отношения, секретлируемые белки, альфа/бета-гидролаза, рекомбинантные одноцепочечные антитела, иммунолокализация.

Принятые сокращения: БСА — бычий сывороточный альбумин, ДСН — додецилсульфат натрия, ДСН-ПААГЭ — электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии ДСН, ИПТГ — изопротил-β-D-тиогалактопиранозид, ИФА — иммунофлуоресцентный анализ, СП — сигнальный пептид, ФМСФ — фенилметилсульфонилфторид, ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота, ЭР — эндоплазматический ретикулум.

Микроспоридии — группа родственных грибам облигатных внутриклеточных паразитов практически всех систематических групп животных, человека и ряда простейших (Исси, Воронин, 2007). Для них характерны широкое распространение среди членистоногих (ракообразных и насекомых), развитие подавляющего большинства видов в прямом контакте с цитоплазмой клетки хозяина, глубокая зависимость от ее обменных процессов и удивительная минимизация собственного метаболического аппарата (Williams et al., 2014). Длительная адаптация микроспоридий к внутриклеточному развитию предполагает наличие у этих паразитов совершенных инструментов управления физиологическими процессами и молекулярными программами зараженной клетки хозяина (Тимофеев и др. 2016). В отличие от представителей систематических групп Apicomplexa и Kinetoplastida микроспоридии остаются плохо изученными с точки зрения молекулярных аспектов взаимоотношений с зараженной клеткой. Во многом это связано со строго облигатным характером внутриклеточного паразитизма микроспоридий и невозможностью их культивирования вне клетки хозяина.

Гетерологичная экспрессия в *Escherichia coli* ряда генов микроспоридии *Paranosema locustae* и получение поликлональных антител к рекомбинантным продуктам позволили подтвердить, что паразиты этой группы действительно секретируют функционально различные белки в зараженную клетку (Senderskiy et al., 2014). Одним из таких белков, способных играть важную роль в паразито-хозяинных отношениях, оказался представитель мультифункционального семейства α/β-гидролаз (Ollis et al., 1992). В составе α/β-гидролазы *P. locustae* обнаружены С-концевые пролин-богатые повторы, предполагающие ее функциональное сходство с липазами млекопитающих, активируемых солями желчных кислот (Wang, Hartsuck, 1993). Поскольку истощение липидных запасов хозяина при различных микроспоридиозах давно известно (Canning, 1962; Darwish et al., 1989), дальнейшее изучение роли этого фермента в мобилизации резервных липидов жирового тела саранчи и ее патогенезе представляет несомненный интерес.

При иммуноблоттинге белков жирового тела саранчи, зараженного микроспоридией *P. locustae*, антитела рас-

познавали две полосы размером около 63 и 90 кДа (Senderskiy et al., 2014). Электрофоретическая подвижность нижней полосы соответствовала подвижности продукта, экспрессированного в бактериях *E. coli*. В то же время выявление более высокомолекулярной полосы могло быть следствием неспецифичной реакции поликлональных антител и требовало дальнейшего изучения. ИФА срезов зараженного жирового тела с помощью полученных поликлональных антител показал интенсивное мечение цитоплазмы зараженных клеток хозяина. Однако в отличие от других изученных секреторных белков *P. locustae* (Senderskiy et al., 2014) гетерологичная экспрессия этого фермента в дрожжевых грибах *Pichia pastoris* не сопровождалась его выделением в культуральную среду. При подтверждении факта накопления α/β -гидролазы *P. locustae* в цитоплазме зараженных клеток хозяина можно было бы предположить наличие у микроспоридий нетрадиционного механизма секреции белков (Nickel, 2003), несвойственного дрожжевым клеткам.

С целью дальнейшего изучения α/β -гидролазы *P. locustae*, механизмов ее секреции и роли во взаимоотношениях паразита с клеткой хозяина в настоящей работе предпринята попытка получения одноцепочечного антитела (scFv-фрагмента) к изучаемому ферменту. Поскольку специфичность рекомбинантных мини-антител сопоставима со специфичностью моноклональных, их использование помогло бы подтвердить факт секреции фермента в зараженную клетку хозяина, а также доказать наличие общего эпитопа в составе двух форм, выявляемых при иммуноблоттинге. Высокая специфичность одноцепочечных антител могла бы оказаться полезной и при анализе точной локализации белка в структурах клетки паразита и хозяина. Кроме того, наличие полигистидиновой последовательности в С-концевой области рекомбинантного антитела позволило бы осуществить его пространственно-ориентированную иммобилизацию на Ni-содержащих носителях для иммуноаффинного выделения фермента из зараженной ткани хозяина.

Создание библиотеки последовательностей, кодирующих рекомбинантные одноцепочечные антитела к белкам зараженного жирового тела саранчи, и использование технологии фагового дисплея позволили отобрать scFv-фрагмент, специфично распознающий α/β -гидролазу *P. locustae*. Использование полученного мини-антитела позволило подтвердить факт секреции значительных количеств гидролазы в зараженную клетку хозяина, доказать присутствие в жировом теле саранчи двух форм фермента с различной молекулярной массой и продемонстрировать возможность успешного выделения обеих форм из гомогената зараженной ткани с помощью scFv-фрагмента, иммобилизованного на Ni-содержащей смоле.

Материал и методика

Создание библиотеки рекомбинантных антител к белкам зараженного жирового тела саранчи. Для получения фракции белков зараженной ткани хозяина жировые тела саранчи мягко разрушали на льду в изотоническом фосфатно-солевом буферном растворе (PBS: 138 мМ NaCl, 3 мМ KCl, 1.5 мМ KH_2PO_4 и 8 мМ Na_2HPO_4 , pH 6.8) с помощью стеклянного гомогенизатора и неплотно пригнутого тefлонового пестика. Споры и стадии внутриклеточного развития микроспоридий осаждали при 100 g в течение 10 мин,

супернатант дополнительно центрифугировали при 20 000 g в течение 20 мин и растворимую фракцию использовали для иммунизации пяти мышей. Животных иммунизировали в ходе 4 внутрибрюшинных инъекций с 10-суточным интервалом, используя полный адъювант Фрейнда при первой инъекции и неполный при последующих.

Общую РНК селезенки иммунизированных животных выделяли с использованием реагента Trizol (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции фирмы-производителя. Синтез кДНК осуществляли в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 2.5 мкг РНК, 10 мМ Трис-Cl (pH 8.8), 50 мМ KCl, 5 мМ MgCl_2 , 1 мМ каждого дНТФ, 1 мкг олиго-дТ в качестве затравки, 200 ед. RevertAidTM-MuLV-обратной транскриптазы (Thermo Fisher Scientific) и 5 Е ингибитора РНКазы в течение 1 ч при 37 °С. После этого смесь прогревали 5 мин при 95 °С и использовали 1.6 мкл для постановки ПЦР. 20 мкл смеси для проведения ПЦР помимо кДНК содержала 67 мМ Трис-Cl (pH 8.6), 2.5 мМ MgCl_2 , 16.6 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5 мМ каждого дНТФ, 10 пмоль праймеров и 2.5 ед. Taq ДНК-полимеразы (Силекс, Россия). Для амплификации всего разнообразия последовательностей вариабельных фрагментов тяжелых (VH) и легких (VL) цепей IgG мыши использовали 22 сочетания специально подобранных праймеров (Progen, Германия). Матрицу денатурировали 3 мин при 94 °С и ДНК амплифицировали в течение 30 циклов, каждый из которых включал в себя денатурацию (94 °С, 30 с), отжиг (55 °С, 30 с) и синтез (72 °С, 30 с). ПЦР-продукты размером около 400 п. н. выделяли из агарозного геля и использовали в качестве матрицы для проведения второго раунда ПЦР с праймерами, содержащими на 5'-конце сайты рестриктаз для встраивания в вектор pSEX81 (Progen).

ПЦР-продукты, кодирующие VH-фрагменты, после электрофореза выделяли из агарозного геля, объединяли и встраивали в вектор по сайтам рестриктаз *NcoI* и *HindIII*. Клетки *E. coli* (штамм XL1-Blue MRF') трансформировали полученными конструкциями с помощью электропорации, высевали на 20 чашек с твердой средой SOB, содержащей ампицилин (100 мкг/мл) и 0.1 М глюкозы (SOB-ГА), и растили в течение 1 сут при 30 °С. Поскольку на каждой чашке вырастало приблизительно 25 тыс. колоний, общая представительность полученной суббиблиотеки составила приблизительно 500 тыс. трансформантов. ПЦР-анализ 20 колоний с использованием праймеров прямого pSEX *Nco* (TGCTGCTGCTGGCAGCTCAG) и обратного pSEX *Hind* (CTTCTGAAAATTCACCTTC) показал, что отдельные трансформанты несут разнообразные по размеру VH-фрагменты. Бактериальные клетки соскребали стеклянным шпателем с чашек и хранили при -80 °С в среде 2×YT, содержащей ампицилин (100 мкг/мл), 0.1 М глюкозы (2×YT-ГА) и 25 % глицерина. Для встраивания в полученную суббиблиотеку последовательностей, кодирующих VL-фрагменты легких цепей иммуноглобулинов, плазмидную ДНК выделяли методом щелочного лизиса, линеаризовали рестриктазами *MluI/NotI* и использовали для встраивания ПЦР-амплифицированных VL-фрагментов, обработанных теми же рестриктазами. Электропорация клеток XL1-Blue MRF' конструкциями после лигирования позволила получить библиотеку, высеванную на 20 чашек с твердой средой SOB-ГА и состоящую приблизительно из 500 тыс. колоний-трансформантов. ПЦР-скрининг 20 отдельных колоний с использованием праймеров прямого pSEX *Mlu*

(GAAGGTGAATTTTCAGAAG) и обратного pSEX Not (TGATATCTTTGGATCCAG) показал наличие различающихся по размеру вставок во всех проанализированных вариантах. Бактериальные клетки соскребали с чашек стеклянным шпателем и полученную библиотеку хранили при -80°C в среде $2\times\text{YT}$ -ГА, содержащей 25 % глицерина.

Отбор рекомбинантных scFv-фрагментов к белкам зараженного жирового тела саранчи. Полученную библиотеку в виде 50 мл бактериальной суспензии в среде $2\times\text{YT}$ -ГА с плотностью 0.025 оптических ед. при длине волны 600 нм (OD_{600} -0.025), доращивали при 37°C до OD_{600} -0.1 и заражали хелперным гиперфагом M13 K07ΔpIII (Progen), добавляя приблизительно 100 фаговых частиц на каждую бактериальную клетку. После инкубации 20 мин при 37°C без перемешивания и 50 мин при перемешивании на орбитальном шейкере (260 об/мин) среду заменяли на $2\times\text{YT}$ с ампициллином (100 мкг/мл) и канамицином (50 мкг/мл). Бактериальную культуру инкубировали на орбитальном шейкере в течение ночи при 37°C , клетки осаждали центрифугированием и к супернатанту добавляли 1/5 объема 20%-ного ПЭГ6000 (Serva, Германия), содержащего 2.5 М NaCl. После инкубации суспензии на льду в течение 1 ч фаговые частицы осаждали центрифугированием при 14 000 g и 4°C в течение 20 мин, ресуспендировали в 4.5 мл буфера для разведения фаговых частиц (10 мМ Трис-Cl, pH 7.5, 20 мМ NaCl и 2 мМ ЭДТА) и хранили при -80°C . Для отбора вирусных частиц, несущих антитела к белкам зараженного жирового тела саранчи, 0.75 мл (1/6 часть) полученной суспензии фагов разводили 1 : 5 в Трис-солевом буферном растворе (ТСБ: 50 мМ Трис-HCl, pH 7.5, и 150 мМ NaCl), содержащем 1 % БСА, инкубировали 15 мин при комнатной температуре и переносили в пробирки MaxiSorp (Nunc, Дания) с иммобилизованным на стенках антигеном — фракцией растворимых белков зараженного жирового тела саранчи, использованной для иммунизации мышей. Белки иммобилизовывали на стенках пробирки в 0.1 М Na-карбонатном буфере (pH 9.6), инкубируя 2 ч на ротационном шейкере при комнатной температуре. После отмывки пробирок от несвязавшегося антигена сайты неспецифического связывания блокировали 1 ч при комнатной температуре в растворе ТСБТ (ТСБ, содержащий 0.1 % Твин-20) и 1 % БСА, в пробирку переносили суспензию фагов и инкубировали, переворачивая в течение ночи при 4°C . После тщательной отмывки ТСБТ, а затем ТСБ связавшиеся со стенками пробирки фаги элюировали в течение 5 мин в 0.75 мл 0.1 М триэтиламина и элюат быстро нейтрализовали добавлением равного объема 1 М Трис-Cl (pH 7.5). Полученную суспензию фагов добавляли к 20 мл культуры клеток *E. coli* XL1-Blue MRFα, доращенных в $2\times\text{YT}$ при 37°C до OD_{600} -0.4. После инкубации в течение 20 мин при 37°C без перемешивания и 50 мин при перемешивании на орбитальном шейкере (260 об/мин) бактерий, инфицированных фагом, высевали на 5 чашек с твердой селективной средой SOB-ГА и колонии трансформантов выращивали при 30°C . Общее число колоний, полученных после первого раунда селекции, составило приблизительно 60 тыс.

Повторное заражение бактериальной суспензии хелперным фагом, наработка и ПЭГ-преципитация фаговых частиц, несущих рекомбинантные антитела, инкубация суспензии в присутствии иммобилизованного антигена и последующая элюция вирусов позволили заразить

ими клетки *E. coli* и осуществить таким образом второй, а затем и третий раунд отбора. После третьего раунда селекции выделили плазмидную ДНК и провели ПЦР-амплификацию общего пула последовательностей, кодирующих рекомбинантные антитела, с использованием прямого и обратного праймеров pSEX Nco и pSEX Not соответственно.

Гетерологичная экспрессия scFv-фрагментов в бактериях *E. coli*. ПЦР-амплифицированный пул последовательностей был встроен в вектор pOPE101 (Progen) по сайтам рестрикции *NcoI/NotI* и полученные конструкции использовали для трансформации бактерий XL1-Blue MRF' методом электропорации. Колонии-трансформанты, выросшие на чашках с селективной средой SOB-ГА при 30°C , переносили в виде реплик на нитроцеллюлозную мембрану и помещали на ту же среду, но без глюкозы и содержащую 0.4 мМ ИПТГ (специфического индуктора промотора, контролирующего экспрессию антител). После 4-часовой инкубации колоний на чашках при 30°C мембрану кипятили 5 мин в 0.5%-ном ДСН и использовали для Вестерн-блот-анализа с антителами к полигистидиновой последовательности (Sigma-Aldrich, США), входящей в состав рекомбинантных антител. Отдельные колонии, показавшие высокий уровень экспрессии антител, переносили в лунки иммунологических планшетов, доращивали в жидкой среде $2\times\text{YT}$ -ГА до OD_{600} -0.4, осаждали клетки центрифугированием и ресуспендировали в той же среде, содержащей 0.04 мМ ИПТГ, но без глюкозы. После экспрессии рекомбинантных антител в течение 4 ч при комнатной температуре к суспензии добавляли 1 мМ ФМСФ, 1 мМ ЭДТА- Na_2 и 1 мкг/мл пепстатина А (указаны конечные концентрации), бактерий разрушали ультразвуком, дебрис осаждали центрифугированием планшетов при 2500 об/мин в течение 30 мин и супернатант использовали для тестирования антигенсвязывающей активности антител. В каждую лунку помещали две небольшие полоски нитроцеллюлозы после кратковременного разделения белков зараженного и контрольного жировых тел саранчи методом ДСН-ПАГЭ и переноса на мембрану.

Наработку антител в большем объеме бактериальной культуры (50 мл) осуществляли по методике, использованной для анализа колоний в иммунологических планшетах. Клетки осаждали центрифугированием и разрушали ультразвуком на льду в 5 мл ТСБ, содержащего ФМСФ, пепстатин А и ЭДТА. Для экстракции белков периплазматического пространства бактерий предварительно инкубировали 20 мин на льду в присутствии 25 мМ Трис-Cl-буфера (pH 7.4), содержащего 1 мМ ЭДТА и 25 % глюкозы, или 50 мМ Трис-Cl-буфера (pH 8.0), содержащего 1.5 мМ ЭДТА и 20 % сахарозы; клетки осаждали центрифугированием, супернатант использовали в дальнейших экспериментах.

ДСН-ПАГЭ и иммуноблотинг. Пробы зараженного микроспоридией *P. locustae* и контрольного жировых тел саранчи смешивали с равным объемом Трис-Cl-буфера (125 мМ), содержащего 4 % ДСН, 10 % 2-меркаптоэтанола и 20 % глицерина, и инкубировали в течение 10 мин при 95°C . Белки разделяли с помощью ДСН-ПААГЭ в 12%-ном геле с использованием камеры Mini-PROTEAN (Bio-Rad, США) и переносили на нитроцеллюлозную мембрану того же производителя с помощью вкладыша для блотинга Mini-Trans-Blot согласно инструкции. Мембраны блокировали 1 ч в присутствии ТСБТ и 1 % БСА, инкубировали ночь при 4°C с разбав-

ленными рекомбинантными антителами (тем же раствором, 1 : 50), выделенными из бактерий, и отмывали ТСБТ. Далее мембраны последовательно инкубировали 2 ч при комнатной температуре с моноклональными антителами к полигистидиновой последовательности (Sigma-Aldrich), разбавленными ТСБТ 1 : 2000, а затем с поликлональными антителами к иммуноглобулину мыши, конъюгированными с пероксидазой хрена (Bio-Rad), с промежуточной отмывкой ТСБТ. Обработку мембран поликлональными антителами к α/β -гидролазе *P. locustae* осуществляли по ранее описанной методике (Senderskiy et al., 2014). После отмывки в ТСБТ, а затем в ТСБ мембраны инкубировали для проявления пероксидазной реакции в свежеприготовленном растворе, содержащем ТСБ, 15 % метанола, 0.05 % 4-хлоро-1-нафтол (Sigma-Aldrich) и 0.02 % H_2O_2 .

Иммунофлуоресцентная микроскопия. Отпрепарированное жировое тело саранчи незамедлительно фиксировали в ФСБ, содержащем 4 % параформальдегида, отмывали ФСБ, инкубировали в 30%-ном растворе сахарозы, использованном в качестве криопротектора, и замораживали в жидком азоте. Замороженные срезы толщиной 10 мм изготавливали на криотоме Microm HM 520 (Microm International, Германия) и помещали на предметные микроскопические стекла. Полученные препараты блокировали 1 ч при комнатной температуре в присутствии ТТСБ, содержащего 1 % БСА, и инкубировали с рекомбинантными мини-антителами, разбавленными 1 : 5 в блокирующем растворе, в течение ночи при 4 °С. После качественной отмывки в ТСБТ срезы обрабатывали моноклональными антителами к с-Мус-эпиту (Sigma-Aldrich), разведенными ТСБТ в 50 раз, а затем антителами против иммуноглобулинов мыши, конъюгированными с флуоресцентным красителем Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific) и разведенными 1 : 50 в блокирующем растворе. Обработку срезов поликлональными антителами к α/β -гидролазе *P. locustae* осуществляли по ранее описанной методике (Senderskiy et al., 2014) с использованием антител к иммуноглобулину кролика, конъюгированных с флуоресцентным красителем Alexa Fluor 546 того же производителя. Обработанные антителами препараты заключали в среду Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, США) и анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа AxioImager M1 (Carl Zeiss, Германия).

Анализ последовательности, кодирующей отобранное антитело. Плазмидную ДНК выделяли из выращенных в 2×YT-ГА бактерий и последовательность в составе вектора рОРЕ, кодирующую отобранное рекомбинантное антитело, секвенировали с использованием праймеров AAGAGGAGAAATTAAC-CATGA (прямой) и TCAATTAGCACAGGCCTCTAGA (обратный).

Иммобилизация scFv-антител на Ni-содержащей смоле и выделение α/β -гидролазы из зараженного жирового тела саранчи. Рекомбинантные антитела, выделенные из 50 мл бактериальной культуры в 5 мл ТСБ, содержащего ФМСФ, пепстатин А и ЭДТА, инкубировали в течение ночи с 0.1 мл смолы HIS-Select® Nickel Affinity Gel (Sigma-Aldrich) при 4 °С. После этого смолу отмывали ТСБ и продолжали инкубацию при тех же условиях с 3 мл фракции белков зараженного жирового тела саранчи, использованного для иммунизации мышей и селекции фаговых частиц. После тщательной отмывки ТСБ связавшиеся белки элю-

ировали в присутствии 0.3 М имидазола и анализировали с помощью иммуноблотинга с использованием рекомбинантного или поликлональных антител.

Результаты

Получение рекомбинантного scFv-фрагмента к α/β -гидролазе *P. locustae*. ПЦР-амплификация последовательностей, кодирующих рекомбинантные антитела, с использованием праймеров pSEX Nco прямого и pSEX Not обратного показала, что в ходе селекции в популяции фагов произошел отбор вирусных частиц, несущих на своей поверхности преимущественно scFv-фрагмент относительно небольшого размера. В случае плазмидной ДНК, выделенной из исходной библиотеки, а также из бактерий, зараженных фагами после первого раунда селекции, наблюдали амплификацию фрагментов размером около 800 п. н. (рис. 1, дорожка 1). После второго раунда селекции в популяции фагов постепенно накапливались вирусные частицы, несущие вариант гена scFv-фрагмента размером около 600 п. н. (дорожка 2), а после третьего раунда селекции данная конструкция в популяции фагов становилась преобладающей (рис. 1, дорожка 3).

Переклонирование последовательностей, отобранных в результате трех раундов селекции, в экспрессирующий вектор рОРЕ101 позволило наработать рекомбинантные антитела в бактериях в растворимой форме. При этом из 96 проанализированных колоний практически все отобранные трансформанты продуцировали один тип антител, распознающих растворимый белок размером около 45 кДа в пробах как зараженного, так и контрольного жирового тела саранчи. С целью отбора конструкций, кодирующих другие антитела, из геля были выделены ПЦР-продукты, имеющие размер около 700–800 п. н. и максимально свободные от примесей нижней мажорной полосы (рис. 1, дорожка 3). Переклонирование выделенных фрагментов ДНК в вектор рОРЕ101 и гетерологичная экспрессия полученных конструкций в бактериях *E. coli* позволили обнаружить вариант плазмиды, кодирующей scFv-фрагмент, специфичный к α/β -гидролазе *P. locustae*. Из 160 проанализированных трансформантов

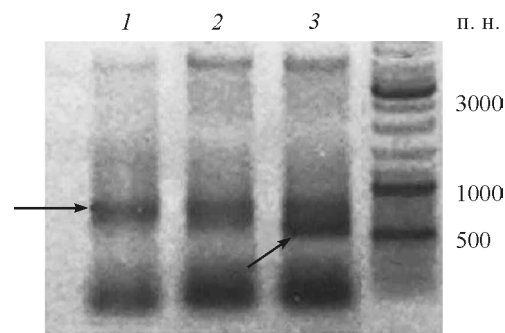


Рис. 1. ПЦР-анализ фрагментов ДНК, кодирующих рекомбинантные антитела к белкам жирового тела перелетной саранчи, зараженной микроспоридией *Paranosema locustae*, в составе вектора pSEX81.

Электрофорез ПЦР-продуктов в агарозном геле показал накопление в популяции фагов конструкций со вставкой около 550–600 п. н. (короткая стрелка) от одного раунда селекции к другому (раунд селекции соответствует номеру дорожки). Стандартный размер scFv-молекул составляет 750–800 п. н. (длинная стрелка).

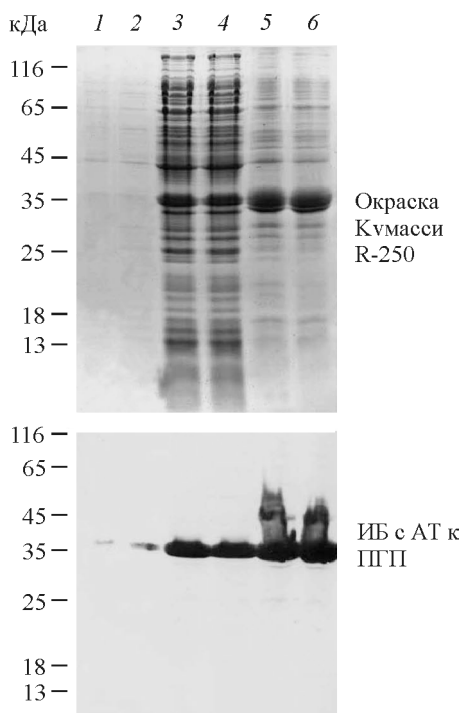


Рис. 2. Анализ экспрессии одноцепочечного антитела к α/β -гидролазе *Paranosema locustae* в бактериях *Escherichia coli*.

Дорожки: 1, 2 — супернатанты после экстракции периплазматических белков; 3, 4 — супернатанты после разрушения бактерий ультразвуком; 5, 6 — осадки после разрушения бактерий ультразвуком. После экспрессии бактерий осаждали из 15 мл культуры, осадок разделяли на две части и ресуспендировали в 400 мкл Трис-С1-буфера (25 мМ, pH 7.4), содержащего 1 мМ ЭДТА и 25 % глюкозы, или в 400 мкл Трис-С1-буфера (50 мМ, pH 8.0), содержащего 1.5 мМ ЭДТА и 20 % сахарозы. После экстракции периплазматических белков в течение 20 мин на льду клетки осаждали центрифугированием, разрушали ультразвуком в 400 мкл ТСБ с добавлением ингибиторов протеиназ, центрифугировали 15 мин при 18 000 g и супернатанты, а также осадки, ресуспендированные в 400 мкл ТСБ, анализировали с помощью ДСН-ПААГЭ и иммуноблотинга (ИБ) с антителами (АТ) к полигистидиновой последовательности (ППП).

7 колоний продуцировали данный вариант рекомбинантного антитела. Гетерологичная экспрессия отобранных конструкций в *E. coli*, ДСН-ПААГЭ и иммуноблотинг показали накопление в бактериальных клетках scFv-фрагмента размером около 35 кДа (рис. 2). Несмотря на присутствие в составе рекомбинантного антитела N-концевой сигнальной последовательности PelB, ответственной за транспорт белка в периплазматическое пространство, инкубация бактерий в растворах для экстракции периплазматических белков приводила к солюбилизации лишь незначительного количества scFv-фрагмента (рис. 2, дорожки 1, 2). Эффективное высвобождение мини-антител из бактерий в растворимой форме наблюдали лишь после их обработки ультразвуком (рис. 2, дорожки 3, 4). При этом сопоставимое количество рекомбинантного продукта оставалось в нерастворимой форме (рис. 2, дорожки 5, 6), вероятно в виде белковых включений, накопление которых часто наблюдается при гетерологичной экспрессии белков в *E. coli* (De Groot et al., 2008).

Иммунолокализация α/β -гидролазы *P. locustae* с использованием полученного scFv-фрагмента. Иммуноблотинг проб жирового тела саранчи, а также спор и стадий внутриклеточного развития микроспоридии *P. locustae* показал идентичный

рисунок белковых полос, распознаваемых рекомбинантным scFv-фрагментом и поликлональными антителами к α/β -гидролазе паразита (рис. 3). Оба варианта антител распознавали две полосы размерами 63 и приблизительно 90 кДа в пробах зараженного, но не контрольного (незараженного) жирового тела саранчи, а также в стадиях внутриклеточного развития микроспоридий, выделенных в градиенте плотности Перколла. В очищенных спорах микроспоридий содержание гидролазы было незначительным. Полученный результат ясно показал, что в зараженном жировом теле саранчи действительно присутствуют две формы α/β -гидролазы *P. locustae*, различающиеся по размеру, но имеющие общий эпитоп, распознаваемый полученным рекомбинантным антителом.

ИФА замороженных срезов зараженного жирового тела саранчи с использованием рекомбинантного scFv-фрагмента и полученных ранее поликлональных антител против α/β -гидролазы *P. locustae* показал сходный результат. В обоих случаях наблюдали накопление значительных количеств секретируемого паразитом фермента в цитоплазме зараженных адипоцитов саранчи (рис. 4). Стадии внутриклеточного развития (их визуализировали, используя антитела к молекулярному шаперону семейства Hsp70) и споры микроспоридий выглядели на срезах жирового тела темными зонами, окруженными светящимся гало секретируемого фермента. В ядрах хозяина, а также в контрольных (незараженных) клетках жирового тела саранчи какая-либо положительная реакция отсутствовала. Полученный результат подтвердил, что мечение α/β -гидролазы *P. locustae* на срезах зараженного жирового тела саранчи с помощью двух типов антител является специфичным. Яркое свечение вокруг клеток паразита действительно свидетельствует о секреции паразитом значительных количеств изучаемого фермента в цитоплазму зараженной клетки хозяина.

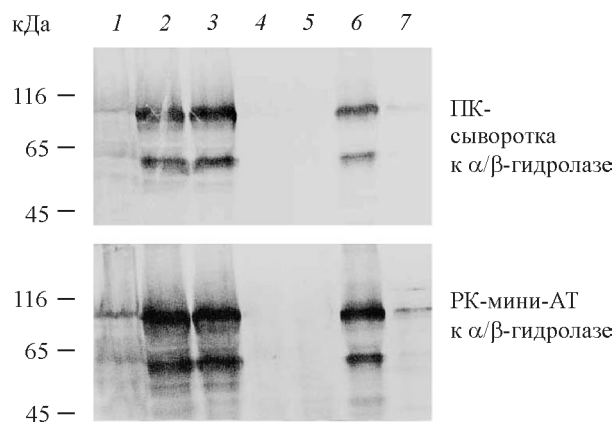


Рис. 3. Иммуноблотинг белков жирового тела саранчи и микроспоридий *Paranosema locustae* с использованием поликлональных антител (ПК-АТ) и рекомбинантного (РК) scFv-фрагмента к α/β -гидролазе.

Зараженное жировое тело саранчи гомогенизировали в PBS и осадки после последовательного центрифугирования гомогената при 100 g в течение 10 мин (дорожка 1) и 20 000 g в течение 20 мин (дорожка 2) довели до объема конечного супернатанта (дорожка 3); дорожки 4, 5 — осадок и супернатант соответственно после центрифугирования гомогената контрольного (незараженного) жирового тела при 20 000 g 20 мин; дорожка 6 — белки стадий внутриклеточного развития *P. locustae*; стадии выделены центрифугированием в градиенте плотности Перколла; дорожка 7 — гомогенат очищенных спор *P. locustae*, осветленный центрифугированием при 100 g в течение 10 мин.

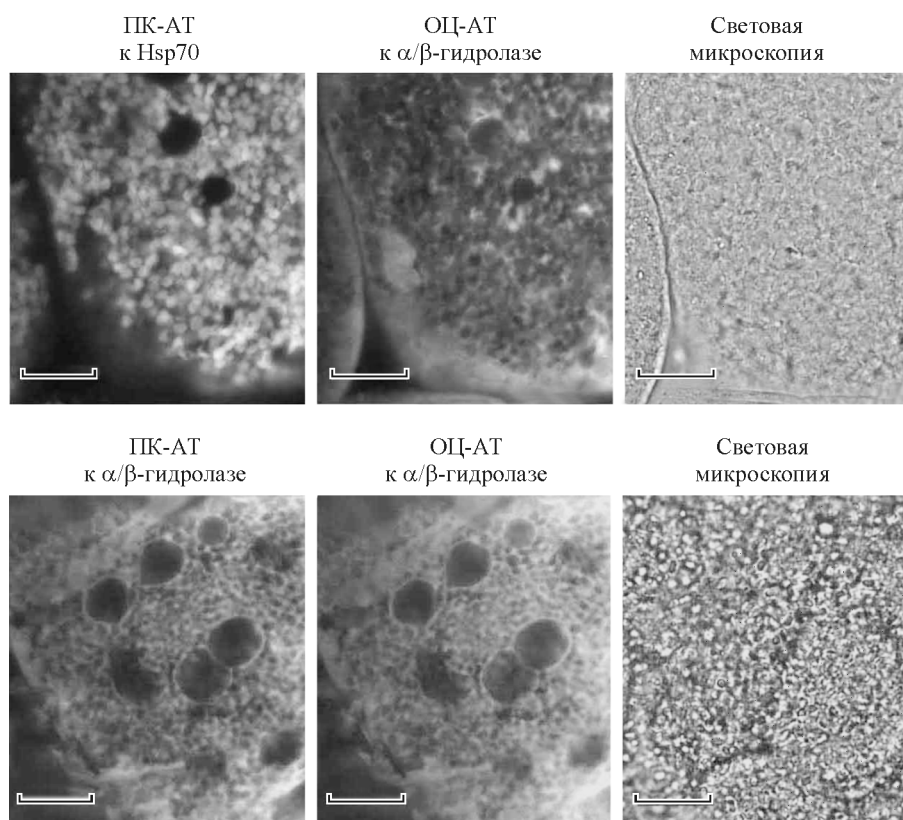


Рис. 4. Иммулокализация α/β -гидролазы *Paranosema locustae* в зараженном жировом теле саранчи.

Срезы зараженного жирового тела инкубировали с scFv-фрагментом к α/β -гидролазе *P. locustae* и одновременно с кроличьими поликлональными антителами (ПК-АТ) к одной из форм молекулярного шаперона Hsp70 *P. locustae* или к α/β -гидролазе. На *верхнем левом изображении* представлена визуализация стадий внутриклеточного развития микроспоридий (меронтов и споронотов) с помощью антител к шаперону семейства Hsp70. Стадии внутриклеточного развития паразита выглядят на срезе как многочисленные светлые клетки. Напротив, при окраске срезов одноцепочечным антителом (ОЦ-АТ, *средние изображения*) и ПК-АТ (*нижнее левое изображение*) к α/β -гидролазе *P. locustae* клетки паразита выглядят как темные, неокрашенные зоны, окруженные светящимся гало секретируемого фермента. *Масштабные отрезки*: 10 мкм.

Анализ последовательности, кодирующей рекомбинантное антитело. Расшифровка белок-кодирующей последовательности в составе вектора рOPE 101 показала, что в состав рекомбинантного антитела входят VH- и VL-фрагменты, состоящие соответственно из 122 и 121 аминокислотного остатка (рис. 5). BLAST-анализ аминокислотной последовательности VH показал около 90 % идентичности с некоторыми вариантами переменных фрагментов иммуноглобулинов мыши (pdb|1CFS|B, ABO93395.1), представленных на сайте Национального центра биотехнологической инфор-

мации США (NCBI). Последовательность VL показала 99 % идентичности с некоторыми вариантами переменных фрагментов каппа-легких цепей иммуноглобулинов мыши (ANK61053.1, pdb|1T66|L). Наиболее близкое из представленных на сайте NCBI рекомбинантное антитело (AY270182.1) имеет 77 и 94 % идентичности соответственно для VH- и VL-фрагментов. Таким образом, в результате выполненных исследований нами получено новое рекомбинантное антитело, не имеющее полной гомологии с какими-либо известными последовательностями.



Рис. 5. Аминокислотная последовательность scFv-фрагмента к α/β -гидролазе *Paranosema locustae*.

Варибельные фрагменты тяжелой (VH) и легкой (VL) цепей иммуноглобулинов отмечены *серым цветом*, N-концевая сигнальная последовательность PeIB выделена *курсивом*, эпитоп с-Мус и полигистидиновая последовательность *подчеркнуты*.

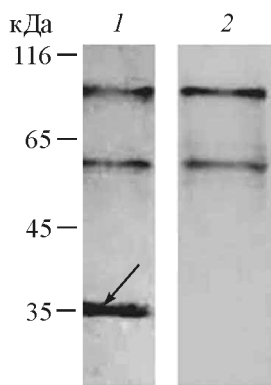


Рис. 6. Иммуноблоттинг белков жирового тела зараженной саранчи, специфично связавшихся с scFv-фрагментом, иммобилизованным на Ni-содержащей смоле.

Элюированные в присутствии 0.3 М имидазола белки разделяли с помощью ДСН-ПААГЭ, переносили на нитроцеллюлозную мембрану и инкубировали в присутствии одноцепочечного (дорожка 1) или поликлональных (дорожка 2) антител к α/β -гидролазе *Paranosema locustae*. Стрелкой указан scFv-фрагмент, распознаваемый антителами к полигистидиновой последовательности.

Выделение α/β -гидролазы *P. locustae* с использованием иммобилизованного scFv-фрагмента. Поскольку отобранное рекомбинантное антитело узнавало фермент микроспоридий как в денатурированной форме (иммуноблоттинг), так и в нативной конформации (ИФА), была изучена возможность его использования для выделения гидролазы из зараженного жирового тела саранчи. Наличие полигистидиновой последовательности в С-концевой области рекомбинантной молекулы позволило успешно иммобилизовать наработанный в *E. coli* scFv-фрагмент на Ni-содержащей агарозной смоле His-Select Nickel Affinity Gel. Инкубация частиц агарозы с растворимой фракцией гомогената зараженного жирового тела саранчи, отмывка смолы и элюция комплекса антиген—антитело в присутствии 0.3 М имидазола показали, что пространственная ориентация иммобилизованного scFv-фрагмента не препятствует его связыванию с ферментом микроспоридий. Во фракциях после элюции с помощью иммуноблоттинга были обнаружены рекомбинантное антитело размером около 35 кДа (рис. 6, указано стрелкой) и обе полосы, соответствующие двум формам α/β -гидролазы *P. locustae*. Интересно отметить, что содержание scFv-фрагмента и связавшегося с ним фермента микроспоридий оказалось приблизительно одинаковым в проанализированных пробах. Таким образом, можно утверждать, что почти каждая иммобилизованная на Ni-содержащей смоле молекула мини-антитела успешно связала по одной молекуле α/β -гидролазы в ходе инкубации с гомогенатом зараженного жирового тела саранчи. Успешное выделение обеих форм фермента позволит приступить к их дальнейшему изучению.

Обсуждение

Paranosema (Antonospora) locustae является к настоящему времени единственным видом микроспоридий, споры которых послужили основой для создания успешно применяемого биоинсектицидного препарата против прямокрылых (Vejornson, Oi, 2014). Это обуславливает интерес к поиску уникальных физиологических особенностей

изучаемого паразита, потенциально способных обеспечить его высокую патогенность в отношении насекомых-хозяев. Одной из таких особенностей вполне может оказаться наличие у паразитов α/β -гидролазы, содержащей в С-концевом регионе от трех до восьми пролин-богатых повторов. У гомологичных гидролаз всех других изученных к настоящему времени видов микроспоридий, включая энтомопатогенные виды, такие повторы отсутствуют. Как уже отмечалось, по аналогии с липазами млекопитающих, активируемых солями желчных кислот (Wang, Hartsuck, 1993), наличие таких повторов позволяет предположить важную роль фермента в мобилизации липидов жирового тела насекомых.

Создание библиотеки рекомбинантных одноцепочечных антител к белкам жирового тела саранчи, зараженного микроспоридией *P. locustae*, позволило отобрать scFv-фрагмент, не имеющий сходства с другими мини-антителами и специфично распознающий данный фермент, приступить к его дальнейшему изучению и получить первые интересные результаты. Несмотря на то что α/β -гидролаза *P. locustae* не распознается клетками дрожжей *P. pastoris* как секреторный белок (Senderskiy et al., 2014), использование отобранного scFv-фрагмента позволило подтвердить факт секреции значительных количеств паразитического фермента в цитоплазму зараженной клетки. Этот результат не только подтверждает важную роль гидролазы микроспоридий в паразито-хозяйинных отношениях, но и позволяет предположить, что фермент может секретироваться микроспоридиями с помощью одного из нетрадиционных механизмов, независимого от транслокации белка в просвет эндоплазматического ретикулума (ЭР). ЭР-независимый внутриклеточный транспорт обнаружен для ряда мембранных и секретируемых белков млекопитающих (Rubartelli, 1990; Mignatti et al., 1992; Lindstedt et al., 1993), вирусов (Chang et al., 1997; Lecellier et al., 2002) и эндопаразитических простейших (Denny et al., 2000). Одним из свойств таких белков является отсутствие сигнального пептида (СП), ответственного за их поступление в ЭР (Nickel, 2003). Поскольку из пяти использованных нами программ для поиска N-концевого СП в составе гидролазы *P. locustae* (SignalP, TargetP, SIG-Pred, PrediSi и Signal-3D) лишь TargetP предсказала его наличие (Senderskiy et al., 2014), есть все основания полагать, что и изучаемый фермент микроспоридий секретируется по ЭР-независимому, еще неизученному механизму.

Интересной особенностью гидролазы микроспоридий является и присутствие в пробах зараженного жирового тела саранчи двух форм фермента, различающихся по размеру приблизительно в 1.5 раза. Сходная вариабельность размера от 100 до 160 кДа наблюдалась и в случае липазы человека, активируемой солями желчных кислот. Наблюдаемые различия были вызваны присутствием делеций и вставок в гипервариабельном участке гена, кодирующем С-концевые пролин-богатые повторы (Lindquist et al., 2002). Успешное выделение обеих форм гидролазы из зараженного жирового тела саранчи с помощью иммобилизованного на Ni-содержащей смоле scFv-фрагмента позволяет планировать новые эксперименты по их сравнительному анализу с использованием протеомных подходов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 15-04-04968).

Список литературы

- Исси И. В., Воронин В. Н. 2007. Тип Microsporidia (Микроспоридии). В кн.: Протисты (Protista): руководство по зоологии. СПб.: Наука. 994—1045. (Issi I. V., Voronin V. N. 2007. Phylum Microsporidia. In: Protista: Handbook on zoology. St. Petersburg: Nauka. 994—1045.)
- Тимофеев С. А., Токарев Ю. С., Симакова А. В., Царев А. А., Долгих В. В. 2016. Взаимоотношения микроспоридий с зараженной клеткой хозяина. Цитология. 58 (8): 594—601. (Timofeev S. A., Tokarev Yu. S., Simakova A. V., Tsarev A. A., Dolgikh V. V. 2016. Interactions of microsporidia with infected host cell. Tsitologiya. 58 (8): 594—601.)
- Bjornson S., Oi D. 2014. Microsporidia biological control agents and pathogens of beneficial insects. In: Microsporidia: pathogens of opportunity. USA: Wiley-Blackwell. 635—670.
- Canning E. U. 1962. The pathogenicity of *Nosema locustae*, Canning. J. Insect Pathol. 4: 248—256.
- Chang H. C., Samaniego F., Nair B. C., Buonaguro L., Ensofi B. 1997. HIV-1 Tat protein exits from cells via a leaderless secretory pathway and binds to extracellular matrix associated heparan sulfate proteoglycans through its basic region. Aids. 11: 1421—1431.
- Darwish A., Weidner E., Fuxa J. 1989. Vairimorpha necatrix in adipose cells of *Trichoplusia ni*. J. Protozool. 36: 308—311.
- De Groot N. S., Espargaró A., More M., Ventura S. 2008. Studies on bacterial inclusion bodies. Future Microbiol. 3: 423—435.
- Denny P. W., Gokool S., Russell D. G., Field M. C., Smith D. F. 2000. Acylation-dependent protein export in *Leishmania*. J. Biol. Chem. 275: 11 017—11 025.
- Lecellier C. H., Vermeulen W., Bachelerie F., Giron M. L., Saib A. 2002. Intra- and intercellular trafficking of the foamy virus auxiliary bet protein. J. Virol. 76: 3388—3394.
- Lindquist S., Blackberg L., Hernell O. 2002. Human bile salt-stimulated lipase has a high frequency of size variation due to a hypervariable region in exon 11. Eur. J. Biochem. 269: 759—767.
- Lindstedt R., Apodaca G., Barondes S. H., Mostov K. E., Leffler H. 1993. Apical secretion of a cytosolic protein by Madin-Darby canine kidney cells. Evidence for polarized release of an endogenous lectin by a nonclassical secretory pathway. J. Biol. Chem. 268: 11 750—11 757.
- Mignatti P., Morimoto T., Rifkin D. B. 1992. Basic fibroblast growth factor, a protein devoid of secretory signal sequence, is released by cells via a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. J. Cell. Physiol. 151: 81—93.
- Nickel W. 2003. The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes. Eur. J. Biochem. 270: 2109—2119.
- Ollis D. L., Cheah E., Cygler M., Dijkstra B., Frolow F., Franken S. M., Harel M., Remington S. J., Silman I., Schrag J., Sussman J. L., Verschuere K. H. G., Goldman A. 1992. The alpha/beta hydrolase fold. Protein Eng. 5: 197—211.
- Rubartelli A., Cozzolino F., Talio M., Sitia R. 1990. A novel secretory pathway for interleukin-1b, a protein lacking a signal sequence. EMBO J. 9: 1503—1510.
- Senderskiy I. V., Timofeev S. A., Seliverstova E. V., Pavlova O. A., Dolgikh V. V. 2014. Secretion of *Antonospora (Paranosema) locustae* proteins into infected cells suggests an active role of microsporidia in the control of host programs and metabolic processes. PLoS ONE. 9 (4): e93585.
- Wang C. S., Hartsuck J. A. 1993. Bile salt-activated lipase. A multiple function lipolytic enzyme. Biochim. biophys. acta. 1166: 1—19.
- Williams B. A. P., Dolgikh V. V., Sokolova Y. Y. 2014. Microsporidian biochemistry and physiology. In: Microsporidia: pathogens of opportunity. USA: Wiley-Blackwell. 245—260.

Поступила 18 XI 2016

PRODUCTION OF SINGLE CHAIN FRAGMENT VARIABLE (scFv) ANTIBODY AGAINST *PARANOSEMA LOCUSTAE* ALPHA/BETA-HYDROLASE AND IMMUNOLocalIZATION OF MICROSPORIDIAN ENZYME IN THE INFECTED HOST CELL

V. V. Dolgikh,¹ A. A. Tsarev, I. V. Senderskiy, S. A. Timofeev

All-Russian Institute for Plant Protection, St. Petersburg—Pushkin, 196608; ¹ e-mail: dol1slav@yahoo.com

Microsporidia is a widespread group of fungi-related intracellular parasites. Direct contact of the most microsporidia species with host cytoplasm suggests that these parasites may control physiological processes of infected cells by secretion of various proteins. In previous experiments, secretion of significant amounts of microsporidia *Paranosema locustae* alpha/beta-hydrolase into infected cells of *Locusta migratoria* fat bodies was demonstrated using polyclonal antibodies against the enzyme. However, heterologous expression of microsporidian hydrolase in yeast *Pichia pastoris* cells was not accompanied by its secretion. In this study, we have constructed library of recombinant single chain antibodies (scFv-fragments) against proteins of fat bodies of infected locusts and isolated mini-antibody specifically recognizing the studied enzyme using phage display technology. Immunoblotting and immunofluorescent microscopy with selected scFv-fragment confirmed secretion of two different in size forms of *P. locustae* alpha/beta-hydrolase into infected host cell. Prospects of scFv-fragment use to explore the role of microsporidian hydrolase in host-parasite relations and mechanism of its secretion are discussed in the paper.

Key words: microsporidia, host-parasite relationships, secreted proteins, alpha/beta-hydrolase, recombinant single chain antibody, immunolocalization.