

УДК 57.023

Механизм блокирования активности летального токсина *Bacillus anthracis* моноклональными антителами

Я. О. Романенко, А. К. Рябко*, М. А. Марьин, А. С. Карцева, М. В. Силкина, И. Г. Шемякин, В. В. Фирстова

Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии
Роспотребнадзора, Оболенск, Московская обл., 142279 Россия

*E-mail: ryabko_alena@mail.ru

Поступила в редакцию 19.03.2021

Принята к печати 22.03.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11387

РЕФЕРАТ Нейтрализация летального токсина *Bacillus anthracis* представляет важную проблему как фундаментальной медицины, так и практического здравоохранения в разрезе борьбы с особо опасными инфекциями. Нами получено нейтрализующее моноклональное антитело 1E10 против летального токсина *B. anthracis*. Описаны этапы рецепторного взаимодействия протективного антигена с поверхностью эукариотических клеток, образования олигомеров протективного антигена, сборки летального токсина и его транслокации с помощью эндоцитоза в эукариотическую клетку с последующим образованием истинной поры и выходом летального токсина в цитозоль. Показано селективное действие антитела на стадии взаимодействия *B. anthracis* с эукариотической клеткой, выявлен механизм токсиннейтрализующей активности антитела 1E10. Обнаружено, что взаимодействие моноклонального антитела 1E10 с протективным антигеном приводит к ингибированию ферментативной активности летального фактора, по всей видимости, за счет нарушения формирования истинной поры протективного антигена, что блокирует выход летального фактора в цитозоль.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА сибирская язва, моноклональные антитела, токсиннейтрализующая активность, цитометрический анализ, протективный антиген, летальный фактор.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ЛТ – летальный токсин; ЛФ – летальный фактор; рЛФ – рекомбинантный летальный фактор *B. anthracis*; ОФ – отечный фактор; ПА – протективный антиген; рПА – рекомбинантный протективный антиген *B. anthracis*; МАРКК – киназа митоген-активируемой протеинкиназы; МЕК – митоген-активируемая киназа; МКАТ – моноклональное антитело; ТНА – токсиннейтрализующая активность; ФСБ – фосфатно-солевой буфер; MES – морфолино-2-этансульфоновая кислота; ПААГ – полиакриламидный гель; ФСБ-Т – фосфатно-солевой буфер с добавлением 0.05% Твин-20.

ВВЕДЕНИЕ

Сибирская язва – антропозоонозная инфекция, возбудителем которой является грамположительная, аэробная, спорообразующая, палочковидная бактерия *Bacillus anthracis*. В зависимости от пути проникновения бактерии в организм выделяют три первичные формы заболевания: желудочно-кишечную (алиментарный путь проникновения), кожную (контактный путь) и легочную (ингаляционный). Все эти формы могут привести к летальному исходу, однако наиболее опасным для жизни человека считается воздушно-капельный путь [1, 2]. Размер спор *B. anthracis* колеблется от 1 до 5 мкм, что позволяет им легко проникнуть в альвеолы легких

при вдыхании. Попавшие в легкие споры не прорастают, а быстро и эффективно фагоцитируются альвеолярными макрофагами и дендритными клетками, которые затем переносятся по лимфатическим протокам к грудным лимфатическим узлам, где споры переходят в вегетативную форму и, разрушая клетки, распространяются по всему организму [3].

Патогенез сибирской язвы определяется двумя бинарными токсинами и капсулой, которые кодируются плазмидами рХ01 и рХ02. Плазмида рХ01 кодирует три компонента сибиреязвенного токсина: летальный фактор с молекулярной массой 83 кДа (ЛФ), отечный фактор 89 кДа (ОФ) и протективный антиген 85 кДа (ПА). Вторая плазмида,

pX02, кодирует гены, участвующие в синтезе поли-D-глутамила капсулы. Удаление любой плазмиды ослабляет вирулентность бактерий [4].

Субъединицы А (эффекторная) бинарных токсинов возбудителя сибирской язвы представлены ЛФ и ОФ, субъединица В – ПА. Субъединицы А и В образуют летальный токсин (ЛТ), состоящий из ПА и ЛФ, и отечный токсин (ОТ), состоящий из ПА и ОФ. Свое название бинарные токсины получили в соответствии с их биологическими эффектами, наблюдаемыми в животных моделях. Внутривенная инъекция ОТ (ПА + ОФ) вызывает отек, а инъекция ЛТ (ПА + ЛФ) в высокой концентрации приводит к тяжелой гипотензии с летальным исходом [5, 6].

Ключевой для патогенеза сибирской язвы субъединицей токсинов является ПА, который способен связываться с рецепторами на поверхности иммунокомпетентных клеток и обеспечивает проникновение ЛФ и ОФ в клетку. Рецепторное взаимодействие ПА массой 83 кДа с клеточной мембраной сопровождается отщеплением фрагмента 20 кДа фуриноподобными протеазами клеток хозяина, в результате чего образуется ПА с молекулярной массой 63 кДа (ПА63). Мономерный ПА63 начинает олигомеризоваться, образуя гептамерные или октамерные структуры, называемые препорами. С одним гептамером связываются три молекулы ЛФ или ОФ, а с октамером четыре [7, 8]. Комплекс, образующийся после сборки ПА и ЛФ/ОФ, поглощается клеткой путем клатринзависимого эндоцитоза. Образовавшаяся эндосома постепенно закисляется. В результате изменения уровня pH в окружающей среде ПА меняет свою конформацию и, внедряясь в эндосому, формирует истинную пору для транслокации ЛФ/ОФ в цитозоль [9]. ЛФ – это цинк-зависимая металлопротеаза, которая расщепляет киназу митоген-активируемой киназы (МАРКК) в цитозоле, что в конечном итоге приводит к апоптозу клетки [10, 11]. На рис. 1 показаны все этапы сборки и токсического действия ЛТ и ОТ *B. anthracis*, а также ключевые этапы, на которых возможно проявление антитоксического действия моноклональных антител, специфически взаимодействующих с доменом IV протективного антигена *B. anthracis*.

Одним из перспективных путей защиты организма от *B. anthracis* считается создание протективных терапевтических антител. Терапевтические антитела стали в последние годы мощным инструментом в борьбе с целым рядом патологий [12, 13]. Они используются в качестве агента, направленного на элиминацию патологических клеток [14, 15]. Весьма активно антитела используются в качестве

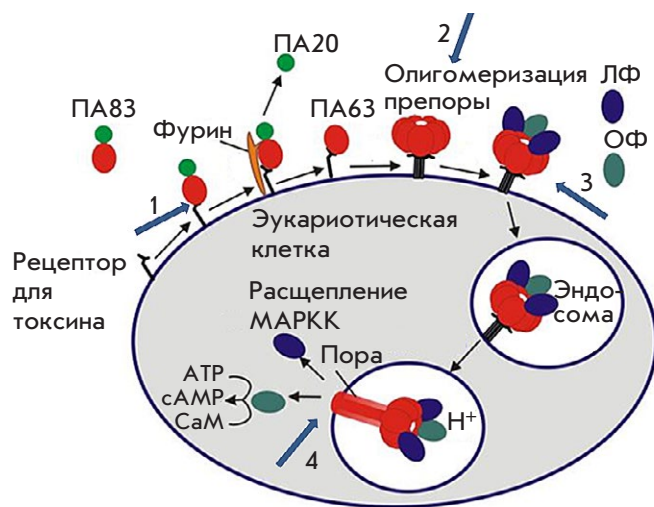


Рис. 1. Схематическая модель сборки и проявления активности токсинов *B. anthracis*.

Нумерованными стрелками указаны ключевые этапы, на которых возможно проявление антитоксического действия моноклонального антитела 1E10, специфически взаимодействующего с доменом IV протективного антигена *B. anthracis*: 1 – связывание МКАТ с ПА-рецептором; 2 – предотвращение сборки олигомерной ПА63-препоры; 3 – ингибирование связывания ЛФ и ОФ с ПА и предотвращение эндоцитоза эффекторных субъединиц токсинов; 4 – ингибирование превращения олигомерной формы препоры ПА63 в истинную пору

протективных агентов при токсикоинфекциях [11, 16, 17].

На рис. 1 представлено несколько возможных путей нарушения взаимодействия токсина с эукариотической клеткой. В частности, можно блокировать связывание ПА с клеточным рецептором или нарушить образование гептамерного комплекса. Также можно подавить связывание эффекторных субъединиц токсинов с препорой или ингибировать превращение препоры в истинную пору, следствием чего будет ингибирование киназного каскада.

К настоящему времени получено несколько моноклональных антител (МКАТ), нейтрализующих ЛТ, преимущественно мышинных, хотя имеются и токсиннейтрализующие МКАТ человека (Raxibacumab, GlaxoSmithKline). Тем не менее, продолжается поиск новых более эффективных антител, способных нейтрализовать ЛТ [18].

Ранее мы получили МКАТ 1E10, проявляющее специфическую активность в отношении домена IV ПА [19]. Результаты исследований, проведенных на клеточной линии J774A.1 и на мышах, по-

казали выраженную способность МКАТ 1Е10 нейтрализовать ЛТ сибирской язвы (часть данных не опубликована). Цель настоящего исследования заключалась в изучении механизма ингибирования моноклональным антителом 1Е10 цитотоксического действия ЛТ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали рекомбинантные белки: протективный антиген (рПА) [19] и летальный фактор (рЛФ) [20]. Эти белки имеют такие же аминокислотные последовательности, как и нативные ПА и ЛФ *B. anthracis*, но без сигнальных пептидов (UniProtKB – P13423 (PAG_BACAN) и UniProtKB – P15917 (LEF_BACAN) соответственно), слитые с N-концевым 6×His-tag и с-мус-эпитопом. Экспрессированные в *E. coli* BL21(DE3) рПА и рЛФ очищали из клеточного лизата хроматографией на металл-хелатном сорбенте сOmplete His-Tag Purification Resin (Roche, Германия). Биотинилированные варианты рекомбинантных белков получали конъюгированием с сульфосукцинимидным (sulfo-NHS) эфиром биотина (Sigma, США). Меченные флуорофором варианты рекомбинантных белков (рПА-FITC и рЛФ-Cy5) получали конъюгированием с FITC (Thermo Fisher, США) и Cy5 Mono-reactive dye (Amersham, Великобритания).

Оценка адгезии ПА на поверхности клеточной линии макрофагов J774A.1 в присутствии МКАТ 1Е10 методом проточной цитофлуориметрии

Для оценки связывания ПА с поверхностными рецепторами макрофаги линии J774A.1 (АТСС® TIB-67™) инкубировали (1×10^6 клеток на одну пробу) с меченым флуорохромом рПА-FITC или с рПА-FITC, заранее инкубированным с МКАТ 1Е10 в эквимольном соотношении в течение 1 ч при 37°C. Клетки линии J774A.1 инкубировали с пробами рПА-FITC или рПА-FITC+МКАТ в течение 1 ч при 37°C в CO₂-инкубаторе с плавным перемешиванием на орбитальном шейкере. После инкубации все пробы отмывали 3 раза нагретым до 37°C фосфатно-солевым буфером (ФСБ; 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na₂HPO₄, 1,76 мМ KH₂PO₄, pH 7.4) и фиксировали 1% формалином. Образцы анализировали на проточном цитофлуориметре FACSAria III (Becton Dickinson, США) с использованием программного обеспечения BD FACSDiva (версия 8.0). Сначала клетки гейтировали по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию, что позволяло определить размер и гранулярность соответственно. Способность МКАТ 1Е10 ингибировать адгезию рПА-FITC на поверхности клеток оцени-

вали с использованием гейтирования по каналам SSC-A/FITC-A.

Влияние МКАТ 1Е10 на олигомеризацию ПА

Полноразмерный рПА массой 83 кДа (ПА83) расщепляли трипсином (Roche) в концентрации 1 мкг/мл при комнатной температуре в течение 45 мин и получали ПА63 и ПА20. Реакцию прекращали, добавляя соевый ингибитор трипсина (Roche) до конечной концентрации 10 мкг/мл, и выдерживали при тех же условиях. Для стимулирования олигомеризации в растворе ко всем пробам добавляли рЛФ в молярном соотношении рПА : рЛФ = 2 : 1. На следующем этапе к расщепленному рПА добавляли МКАТ 1Е10 в молярных соотношениях 1:1, 1:2 или 1:3. Контрольные пробы содержали нерасщепленный рПА83, а также ПА63+ПА20 без добавления антитела. Все пробы инкубировали при температуре 37°C в течение 60 мин. Затем во все пробы вносили раствор морфолино-2-этансульфоновой кислоты (MES) pH 5.5 до конечной концентрации 50 мМ и инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Для дальнейшего разделения в градиентном (4–20%) ПААГ в неденатурирующих и нередуцирующих условиях к пробам добавляли буфер для нанесения (по Лэммли) без меркаптоэтанола. После электрофоретического разделения пробы переносили на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C Extra (GE Healthcare, Великобритания) при помощи системы автоматического полусухого блотинга (Trans-Blot® Turbo™ Transfer System, Bio-Rad, США). После завершения переноса мембрану блокировали, погружая в обезжиренное молоко с массовой долей жира не более 0.5%, инкубировали в течение 1 ч на орбитальном термостатируемом шейкере при 300 об/мин и 37°C. Мембраны промывали фосфатно-солевым буфером с добавлением 0.05% Твин-20 (ФСБ-Т; 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na₂HPO₄, 1,76 мМ KH₂PO₄, 0.05% Твин-20, pH 7.4). Затем мембрану инкубировали с биотинилированными моноклональными антителами мыши против ПА (клон 4F5 со специфической активностью в отношении домена III ПА, получены во ФБУН ГНЦ ПМБ) в разведении 5 мкг/мл (1 ч, 37°C). После инкубации мембрану трехкратно отмывали ФСБ-Т и инкубировали со стрептавидином, конъюгированным с пероксидазой хрена (Streptavidin–Peroxidase Polymer, Ultrasensitive, Sigma, США), в разведении 1 : 5000, затем шестикратно отмывали ФСБ-Т. Визуализацию проводили раствором субстратной смеси на основе диаминобензидина (0.05% диаминобензидина (Sigma, США), 0.015% H₂O₂ в ФСБ, pH 7.4). Реакцию останавливали промывкой дистиллированной водой, затем мембрану высушивали на воздухе.

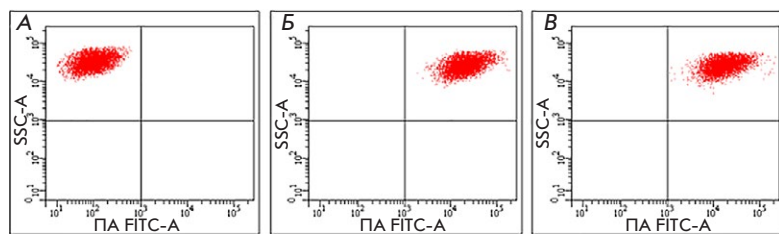


Рис. 2. Влияние антител 1E10 на адгезию рПА на поверхности клеточной линии J774A.1. А – образцы клеток, проинкубированные в среде в отсутствие рПА-FITC и МКАТ 1E10. Б – образцы клеток, проинкубированные с рПА-FITC. В – образцы клеток, проинкубированные с рПА-FITC, предварительно обработанным МКАТ 1E10

Исследование влияния МКАТ 1E10 на эндоцитоз ЛТ методом проточной цитофлуориметрии

Взаимодействие рПА с рЛФ с последующим эндоцитозом ЛТ подтверждали методом проточной цитофлуориметрии. С этой целью макрофаги линии J774A.1 (1×10^6 клеток на одну пробу) одновременно инкубировали с рПА-FITC и рЛФ-Су5 с добавлением МКАТ 1E10 или в отсутствие МКАТ. Растворы, содержащие рПА-FITC и/или рЛФ-Су5, в присутствии МКАТ или без антитела, предварительно инкубировали в течение 1 ч при 37°C, затем добавляли к клеткам. В качестве контроля использовали макрофаги J774A.1 (1×10^6 клеток), отдельно инкубированные с рПА-FITC+рЛФ и рЛФ-Су5+рПА, а также интактные неокрашенные клетки линии J774A.1. Все пробы инкубировали (30 мин, 37°C) в CO₂-инкубаторе при плавном перемешивании на орбитальном шейкере. Затем все пробы трижды отмывали ФСБ, нагретым до 37°C. Белки с поверхности клеток слущивали, добавляя 0.01% раствора трипсина, инкубировали в течение 5 мин при 37°C, затем трижды отмывали теплым ФСБ. Клетки фиксировали 1% формалином. Образцы анализировали на проточном цитофлуориметре FACSaria III. Гейтирование проводили по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию, для оценки влияния МКАТ 1E10 на взаимодействие ЛФ с ПА и эндоцитоз ЛТ проводили гейтирование по каналам флуоресценции FITC-A и Су5-A.

Влияние МКАТ 1E10 на проявление специфической активности ЛТ

Специфическую активность интернализированного ЛТ определяли по присутствию нативного либо расщепленного МЕК. Готовили следующие пробы: макрофаги линии J774A.1 мыши (1×10^7 клеток) инкубировали в присутствии ЛТ в молярном соотношении рПА : рЛФ = 5 : 1 с добавлением МКАТ 1E10 и без него. ЛТ предварительно инкубировали с МКАТ или без них в течение 1 ч при 37°C, затем добавляли растворы к клеткам и инкубировали в течение 30, 60, 120 и 240 мин при 37°C в CO₂-инкубаторе при плавном перемешивании на орбитальном шейкере. В качестве интактного контроля использовали макрофаги J774A.1 (1×10^7

клеток) без добавления ЛТ или МКАТ. После инкубации клетки осаждали центрифугированием, затем осадок лизировали в 0.5% Тритон X-100, после чего добавляли буфер для нанесения (по Лэммли) с добавлением меркаптоэтанола. Готовые пробы наносили на градиентный (4–20%) ПААГ. После электрофоретического разделения выполняли вестерн-блот-анализ с использованием стандартной методики, которая описана выше. Мембрану инкубировали с моноклональными антителами кролика против МЕК1 + МЕК2 (Abcam, Великобритания, ab200179) в разведении 1 : 10 000. По окончании инкубации со специфическими моноклональными антителами против МЕК мембрану отмывали ФСБ-Т и инкубировали с антивидовыми антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (Goat Anti-Rabbit IgG Antibody, (H+L) HRP conjugate, Merck, Германия) в разведении 1 : 1000 в ФСБ. Взаимодействие визуализировали цветной реакцией с использованием диаминобензидина.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценка способности МКАТ 1E10 ингибировать адгезию рПА на поверхности макрофагоподобной клеточной линии J774A.1

На рис. 2 показано распределение клеток J774A.1, инкубированных в среде (А), с FITC-меченым ПА (Б) и с FITC-меченым ПА, предварительно обработанным МКАТ 1E10 (В). Сравнительный анализ цитофлуорограмм свидетельствует об идентичности распределения клеток линии J774A.1 на рис. 2Б и 2В. В обоих случаях после инкубации с рПА-FITC, обработанным МКАТ 1E10 или нет, наблюдали одинаково высокий уровень флуоресценции клеток, что свидетельствовало об адгезии к их поверхности рПА-FITC. На основании полученных результатов можно сделать вывод, что МКАТ 1E10 не блокирует связывание рПА с поверхностью эукариотических клеток.

Оценка способности МКАТ 1E10 блокировать образование олигомеров ПА

Влияние моноклональных антител 1E10 на олигомеризацию ПА изучали с применением вестерн-

блотинга. Добавление МКАТ 1Е10 к расщепленному ПА63 в молярных соотношениях антиген : МКАТ = 1:1, 1:2, 1:3 не влияло на формирование олигомера (рис. 3). Таким образом, МКАТ 1Е10 не препятствует олигомеризации ПА и формированию препоры.

Влияние МКАТ 1Е10 на взаимодействие рЛФ с рПА и эндоцитоз ЛТ

На рис. 4 представлены цитофлуорограммы клеток линии J774А.1. Видно, что все клетки линии J774А.1, к которым были добавлены меченные флуорохромом рПА и рЛФ, обработанные МКАТ 1Е10, имели высокий уровень внутриклеточной флуоресценции FITС и Су5 (рис. 4Г), что свидетельствует об отсутствии способности МКАТ 1Е10 блокировать взаимодействие рПА и рЛФ и эндоцитоз ЛТ.

Влияние МКАТ 1Е10 на проявление специфической активности ЛТ

ЛФ – это цинк-зависимая эндопептидаза, которая расщепляет МАРКК, в том числе МЕК1 и МЕК2, с отщеплением пептида с молекулярной массой около 1.2 кДа. На рис. 5А и 5Б (дорожки 3, 5, 7, 9) показано, что под влиянием ЛТ происходит расщепление МЕК1 и МЕК2, тогда как при предварительной обработке ЛТ моноклональным антителом 1Е10 МЕК1 и МЕК2 остаются целыми. При длительной инкубации (240 мин) пробы, приготовленные из клеточной культуры, которую инкубировали с ЛТ без добавления МКАТ, содержали очевидно меньшее количество МЕК1 и МЕК 2 (рис. 5А и 5Б, дорожка 9), что, вероятно, свидетельствует о прохождении рЛФ через истинную пору в цитозоль клетки и проявлении ферментативной активности рЛФ в отношении МЕК1 и МЕК2, приводящей клетки к апоптозу. Таким образом, установлено, что взаимодействие МКАТ 1Е10 с рПА приводит к ингибированию ферментативной активности ЛТ в отношении МЕК1 и МЕК2.

ОБСУЖДЕНИЕ

В России для лечения больных сибирской язвой применяют антибиотики и противосибирезвенный лошадиный иммуноглобулин (ЗЗ ЦНИИ Минобороны РФ ФБУ, Россия), который содержит поликлональные антитела к антигенам вакцинного штамма *B. anthracis* СТИ-1 и сибирезвенным токсинам. При генерализованной форме заболевания антибиотики не эффективны, а применение противосибирезвенного лошадиного иммуноглобулина может вызвать побочные эффекты, включая анафилактический шок и сывороточную болезнь [20, 21]. Применение моноклональных антител позволяет обеспечить предсказуемую эффективность

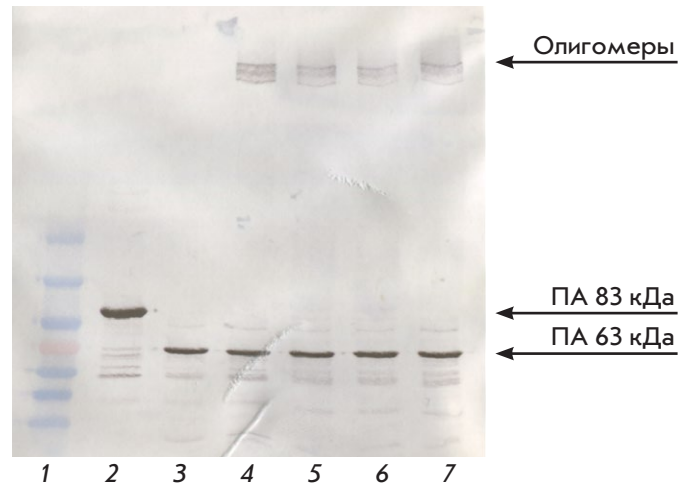


Рис. 3. Оценка способности МКАТ 1Е10 блокировать образование олигомеров ПА63. 1 – маркеры молекулярных масс SM0671 (Fermentas, США); 2 – контроль рПА (83 кДа); 3 – ПА63; 4 – ПА63 + рЛФ; 5 – ПА63 + МКАТ 1Е10 (1:1) + рЛФ; 6 – ПА63 + МКАТ 1Е10 (1:2) + рЛФ; 7 – ПА63 + МКАТ 1Е10 (1:3) + рЛФ

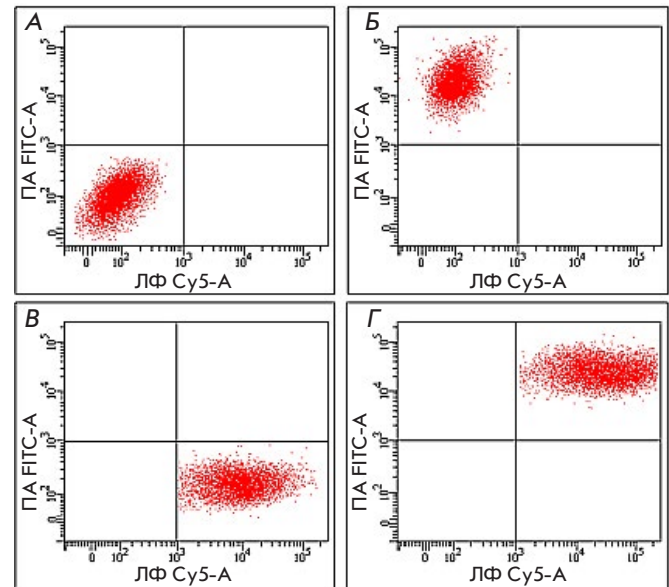


Рис. 4. Оценка влияния МКАТ 1Е10 на взаимодействие рЛФ с рПА и эндоцитоз ЛТ. Гистограмма А – образцы клеток, проинкубированные в среде без добавления ЛТ или МКАТ. Гистограмма Б – образцы клеток, проинкубированные с рПА-FITC и немеченым рЛФ. Гистограмма В – образцы клеток, проинкубированные с немеченым ПА и рЛФ-Су5. Гистограмма Г – образцы клеток, проинкубированные с рПА-FITC и рЛФ-Су5, предварительно обработанные МКАТ 1Е10

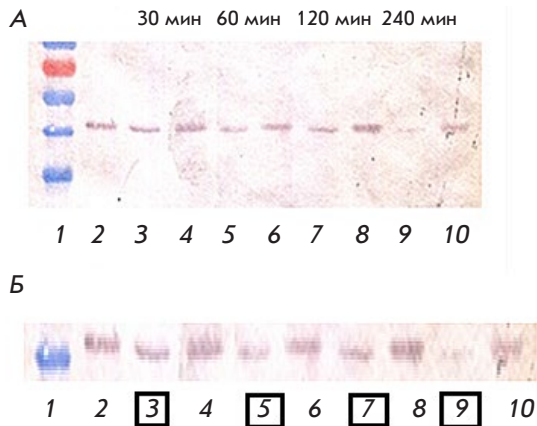


Рис. 5. Влияние МКАТ 1Е10 на проявление ферментативной активности рЛФ в отношении МЕК1 и МЕК2. А – результаты вестерн-блотинга, соотнесенные с маркерами молекулярных масс. Б – увеличенное изображение результатов вестерн-блотинга. 1 – маркеры молекулярных масс SM0671 (Fermentas, США); 2 – контроль – интактные клетки J774A.1; 3 – клетки J774A.1 + ЛТ, инкубация 30 мин; 4 – клетки J774A.1 + (ЛТ + МКАТ 1Е10), инкубация 30 мин; 5 – клетки J774A.1 + ЛТ, инкубация 60 мин; 6 – клетки J774A.1 + (ЛТ + 1Е10), инкубация 60 мин; 7 – клетки J774A.1 + ЛТ, инкубация 120 мин; 8 – клетки J774A.1 + (ЛТ + 1Е10), инкубация 120 мин; 9 – клетки J774A.1 + ЛТ, инкубация 240 мин; 10 – клетки J774A.1 + (ЛТ + 1Е10), инкубация 240 мин

нейтрализации сибиреязвенного токсина, а использование химерных антител снизит аллергизацию организма. Использование МКАТ против ПА считается наиболее перспективным направлением для терапии сибирской язвы, обеспечивающим ингибирование токсического действия сибиреязвенных токсинов. Это обусловлено тем, что ПА необходим для проявления токсичности субъединицей ЛТ, обеспечивающей проникновение ЛФ и ОФ в цитозоль клетки. Полученное нами ранее МКАТ 1Е10 к домену IV ПА показало свою токсиннейтрализующую эффективность в отношении ЛТ, что позволяет рассматривать его в качестве основы для получения химерного терапевтического МКАТ. В представленной работе проанализированы стадии, на которых возможно проявление нейтрализующей активности МКАТ 1Е10 в отношении ЛТ.

Анализ взаимодействия рПА с поверхностной мембраной макрофагоподобной клеточной линии J774A.1, формирования олигомерных структур рПА с образованием препоры, взаимодействия рЛФ и рПА и эндоцитоза ЛТ в присутствии МКАТ 1Е10 показал отсутствие ингибирующей активности МКАТ 1Е10 в отношении перечисленных процессов.

Мы предположили, что МКАТ 1Е10, связываясь с ПА, могло нарушать конформационные перестройки ПА в процессе формирования истинной поры для проникновения ЛФ в цитозоль, где и проявляется ферментативная активность ЛФ. Как известно, ЛФ гидролизует МЕК1 и МЕК2 в N-концевой области с отщеплением пептида массой около 1.2 кДа. МЕК1 и МЕК2 относятся к митоген-активируемым протеинкиназам (МАРКК), которые участвуют во множестве клеточных процессов. Используя специфическое к МЕК1 + МЕК2 антитело, мы показали, что опсонизация ПА моноклональным антителом 1Е10 приводит к ингибированию ферментативной активности ЛТ в отношении МЕК1 и МЕК2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, механизм ингибирования ЛТ моноклональным антителом 1Е10 заключается в подавлении ферментативной активности ЛФ в отношении МЕК1 и МЕК2, что, по всей видимости, связано с нарушением формирования истинной поры и невозможностью выхода ЛФ в цитозоль.

Данное исследование, на наш взгляд, с очевидностью показало потенциал использования терапевтических антител в борьбе с инфекциями. Необходимо отметить, что пандемия, вызванная COVID 19, подтвердила этот вывод. Наряду с большими успехами в создании вакцин, оправданным признано использование вируснейтрализующих антител для некоторых категорий пациентов [22]. Получение человеческих нейтрализующих антител основано на селекции отдельных В-клеток с использованием цитометрических микрофлюидных технологий [23, 24]. С помощью этих технологий осуществлен реальный прорыв в создании SARS-CoV-2-нейтрализующих терапевтических антител [25, 26]. Полученное нами мышинное моноклональное антитело против летального токсина *B. anthracis* может быть преобразовано в химерное моноклональное антитело или гуманизированное, что позволит использовать его в качестве терапевтического препарата. ●

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Конфликт интересов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Соблюдение этических норм.

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bradley K.A., Mogridge J., Mourez M., Collier R.J., Young J.A. // *Nature*. 2001. V. 414. № 6860. P. 225–229.
2. Mock M., Fouet A. // *Annu. Rev. Microbiol.* 2001. V. 55. № 1. P. 647–671.
3. Маринин Л.И. Сибирская язва человека: эпидемиология, профилактика, диагностика, лечение. Оболенск: Гигиена, 2008. 408 с.
4. Hu K., Olsen B.R., Besschetnova T.Y. // *Matrix Biology*. 2017. V. 62. P. 105–114.
5. Носков А.Н. // *Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2014. № 4. С. 92–101.
6. Jiang J., Pentelute B.L., Collier R.J., Zhou Z.H. // *Nature*. 2015. V. 521. № 7553. P. 545549.
7. Petosa C., Collier R.J., Klimpel K.R., Leppla S.H., Liddington R.C. // *Nature*. 1997. V. 385. № 6619. P. 833–838.
8. Wickner W., Schekman R. // *Science*. 2005. V. 310. № 5753. P. 1452–1456.
9. Hardenbrook N.J., Liu S., Zhou K., Ghosal K., Zhou Z.H., Krantz B.A. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 1–10.
10. Krantz B.A., Finkelstein A., Collier R.J. // *J. Mol. Biol.* 2006. V. 355. № 5. P. 968–979.
11. Фирстова В.В., Шемякин И.Г., Дятлов И.А. // *Инфекция и иммунитет*. 2019. Т. 9. № 5–6. С. 639–647.
12. Belogurov A., Kozyr A., Ponomarenko N., Gabibov A. // *Bioessays*. 2009. V. 31. № 11. P. 1161–1171.
13. Durova O.M., Vorobiev I.I., Smirnov I.V., Reshetnyak A.V., Telegin G.B. // *Mol. Immunol.* 2009. V. 47. № 1. P. 87–95.
14. Stepanov A.V., Belogurov A.A., Ponomarenko N.A., Stremovskiy O.A., Kozlov L.V. // *PLoS One*. 2011. V. 6. e20991.
15. Glinka E.M., Edelweiss E.F., Sapozhnikov A.M., Deyev S.M. // *Gene*. 2006. V. 366. № 1. P. 97–103.
16. Белова Е.В., Дубилей С.А., Кравченко Т.Б., Колесников А.В., Захарова М.Ю. // *Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология*. 2004. № 3. С. 21–26.
17. Колесников А.В., Рябко А.К., Шемякин И.Г., Козырь А.В. // *Вестн. Росс. акад. мед. наук*. 2015. Т. 70. № 4. С. 428–434.
18. Dixon T.C., Fadl A.A., Koehler T.M., Swanson J.A., Hanna P.C. // *Cell. Microbial.* 2000. V. 2. № 6. P. 453–463.
19. Белова Е.В., Колесников А.В., Захарова М.Ю., Дубилей С.А., Дятлов И.А., Шемякин И.Г. // *Биоорган. химия*. 2008. Т. 34. № 5. С. 639–644.
20. Zakharova M.Yu., Kuznetsov N.A., Dubiley S.A., Kozyr A.V., Fedorova O.S., Chudakov D.M., Knorre D.G., Shemyakin I.G., Gabibov A.G., Kolesnikov A.V. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. № 27. P. 17902–17913.
21. Popescu N.I., Keshari R.S., Cochran J., Coggeshall K.M., Lupu F. // *Microorganisms*. 2020. V. 8. № 7. P. 1039.
22. Weinreich D.M., Sivapalasingam S., Norton T., Ali S., Gao H., Bhowre R., Musser B. J., Soo Y., Rofail D., Im J., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2021. P. 238–251.
23. Terekhov S.S., Smirnov I.V., Malakhova M.V., Samoilov A.E., Manolov A.I., Nazarov A.S., Danilov D.V., Dubiley S.A., Osterman I.A., Rubtsova M.P., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018. V. 115. № 38. P. 9551–9556.
24. Wine Y., Horton A.P., Ippolito G.C., Georgiou G. // *Curr. Opin. Immunol.* 2015. V. 35. P. 89–97.
25. Rappazzo C.G., Longping V.T., Kaku C.I., Wrapp D., Sakharkar M., Huang D., Deveau L.M., Yockachonis T.J., Herbert A.S., Battles M.B., et al. // *Science*. 2021. V. 371. № 6531. P. 823–829.
26. Guo Y., Huang L., Zhang G., Yao Y., Zhou H., Shen S., Shen B., Li B., Li X., Zhang Q., et al. // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. № 1. P. 263. doi: 10.1038/s41467-021-22926-2.