

ЭКСПРЕССИЯ И СЕКРЕЦИЯ ЭФФЕКТОРОВ СИСТЕМЫ СЕКРЕЦИИ III ТИПА SipB И SopE САЛЬМОНЕЛЛ

М. А. Яроцкая¹, А. В. Качан², А. Н. Мелешко¹

¹РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минск, Беларусь

²Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Отличительная черта *Salmonella enterica* Typhimurium заключается во внутриклеточном паразитизме данных бактерий и наличии у них сразу двух разновидностей системы секреции III типа, которые обеспечивают вирулентность бактерий на разных этапах жизненного цикла. Обе эти системы секреции предлагались ранее [1] для конструирования живых вакцин, экспрессирующих белки-химеры эффекторов системы секреции III типа и антигенов.

Целью данной работы была оценка возможности экспрессии и секреции белка-эффектора для конструирования пероральной противоопухолевой вакцины на основе штамма *Salmonella enterica* Typhimurium ATCC 14028 в различных условиях. Экспрессионная кассета включала 160- и 100-аминокислотные фрагменты N-концевых домена эффекторов сальмонелл SipB и SopE, соответственно, для которых ранее [2, 3] была продемонстрирована возможность доставки антигена. В качестве репортера экспрессии был выбран флуоресцентный белок sfGFP (англ. superfolded green fluorescent protein), который отличается от других флуоресцентных белков своей способностью транспортироваться в периплазму клеток бактерий, не теряя своих флуоресцентных свойств [4]. Метка FLAG для иммуноблоттинга была включена в белок между SipB/SopE и sfGFP. Экспрессия контролировалась синтетическим промотором proD, обеспечивающим высокий уровень конститутивной экспрессии [5]. Векторами для данных экспрессионных кассет были выбраны pET20b и pACYC184. 16-часовые ночные культуры бактерий разбавляли в 30 раз и выращивали в 2-х вариантах условий индукции в питательной среде LB с повышенным содержанием NaCl с аэрацией или без. Контролем служили клетки того же штамма с плазмидой без sfGFP.

Экспрессия химерного белка SipB(160)-FLAG-sfGFP и SopE(100)-FLAG-sfGFP оценивалась по флуоресценции белка sfGFP в суспензии клеток по завершению 6 ч индукции в диапазоне 514–567 нм. Флуоресценция бактерий с конструкцией SipB составляла 7100–9274 ОЕ, что превышало контроль в 18–24 раза. Флуоресценция бактерий с SopE составляла 11401–1424 ОЕ, что превышало контроль в 30–37 раз. В обоих случаях максимум флуоресценции наблюдался в условиях индукции с 1,75% NaCl и аэрацией.

Иммуноблот с антителами к метке FLAG для химеры SipB продемонстрировал накопление в клетках полноразмерного белка массой около 45 кДа и преобладающей фракции ограниченного белка массой около 32 кДа. В культуральной среде определялась секреторная фракция белка 32 кДа в количестве около 1/5 от клеточной фракции без выраженной зависимости от условий индукции. Иммуноблот с антителами к метке FLAG для химеры SopE показал выраженную экспрессию белка около 30 кДа в клеточной фракции и секреторную фракцию примерно в равном соотношении.

Таким образом, оба эффектора SipB и SopE обеспечивают экспрессию химерного белка с sfGFP. Секреция эффектора SopE более эффективна, но связана с ограниченным протеолизом белка. Химерные конструкции эффекторов секреции III типа SipB и SopE с опухоль-ассоциированными антигенами рассматриваются перспективными для получения живых пероральных вакцин.

Библиографические ссылки

1. Application of genetically engineered *Salmonella typhimurium* for interferon-gamma-induced therapy against melanoma / W. Yoon [et al.] // Eur. J. Cancer. 2017. Vol. 70. P. 48–61.
2. Expression and delivery of tetanus toxin fragment C fused to the N-terminal domain of SipB enhances specific immune responses in mice / J. I. Jang [et al.] // Microbiol. Immunol. 2012. Vol. 56, iss. 9. P. 595–604.
3. Safety and immunogenicity of attenuated *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* delivering an HIV-1 Gag antigen via the *Salmonella* Type III secretion system / C. N. Kotton [et al.] // Vaccine. 2006. Vol. 24, iss. 37. P. 6216–6224.
4. Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein / J. D. Pédelacq [et al.] // Nat. Biotechnol. 2006. Vol. 24, iss. 1. P. 79–88.
5. Davis J. H., Rubin A. J., Sauer R. T. Design, construction and characterization of a set of insulated bacterial promoters // Nucleic Acids Res. 2011. Vol. 39, iss. 3. P. 1131–1141.