



# Получение и характеристика рекомбинантного белка тиоредоксин пероксидазы *Opisthorchis felineus*

Петренко Василий Антонович

Научный руководитель: к.б.н., с.н.с. Катохин А. В.

Новосибирский Государственный Университет

Факультет естественных наук

ИЦиГ СО РАН Лаборатория молекулярных механизмов патологических  
процессов

# Объект исследования

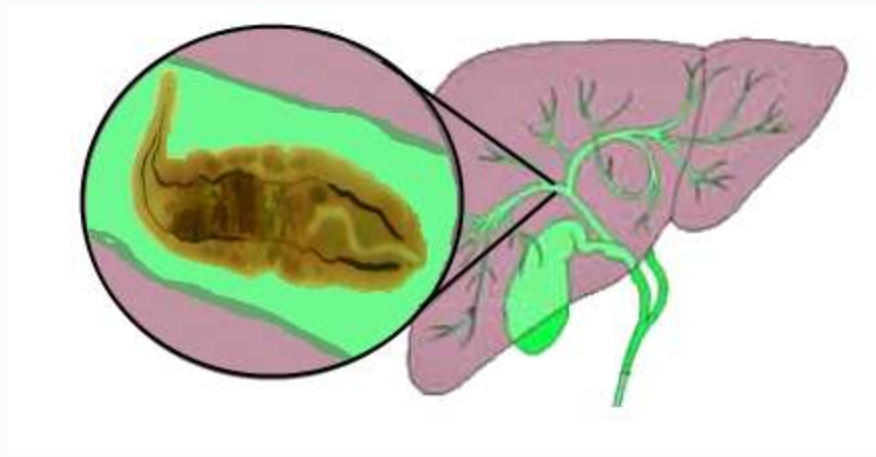


тип Platyhelminthes, класс Trematoda, подкласс Digenea, отряд Plagiorchiida,  
семейство Opisthorchiidae - *Opisthorchis felineus*

# Постановка проблемы

Молекулярные и клеточные механизмы взаимоотношений *O.felineus* с окончательным хозяином:

- Механическое воздействие на эпителий печеночных протоков;
- Выделение паразитом экскреторно-секреторного продукта (ЭСП):
  - Протеолитическое разрушение клеток хозяина (пищеварительная функция)
  - Выделение продуктов жизнедеятельности
  - Обеспечение иммуномодуляторных эффектов
  - Нейтрализация защитных реакций со стороны хозяина, в том числе со стороны иммунных эффекторных клеток



# Ферменты антиоксидантной системы

- Каталазы
- Супероксиддисмутазы
- Пероксиредоксины

## Функции пероксиредоксинов у трематод

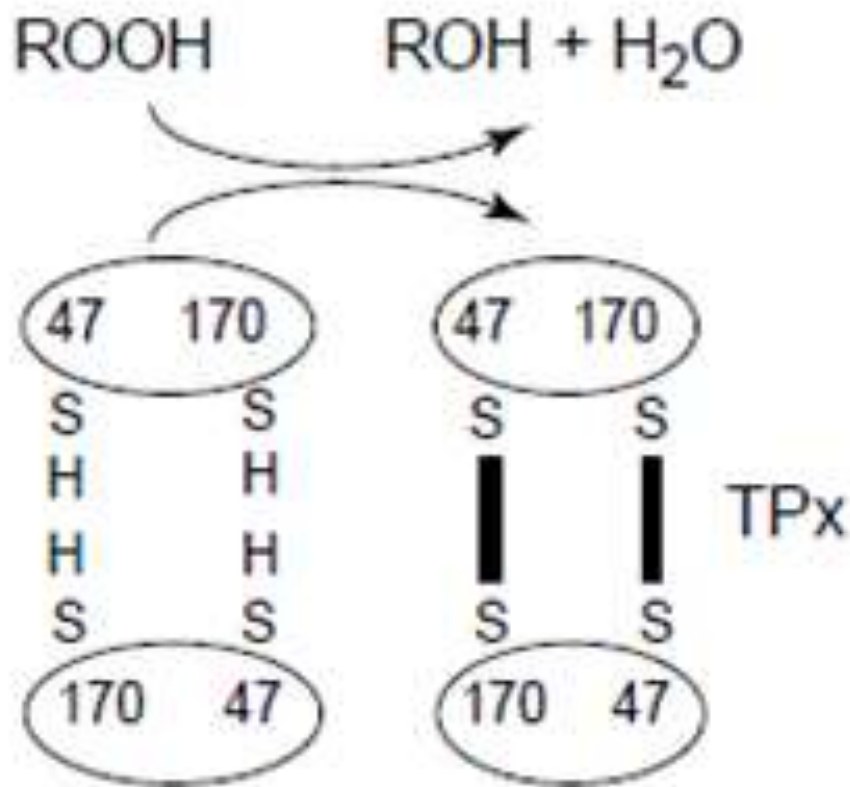


защита от активных форм кислорода, продуцирующихся в результате собственного метаболизма паразита



защита от активных форм кислорода, выделяемых иммунными эффекторными клетками хозяина

# Схема реакции нейтрализации пероксидов пероксиредоксином (ТРх)

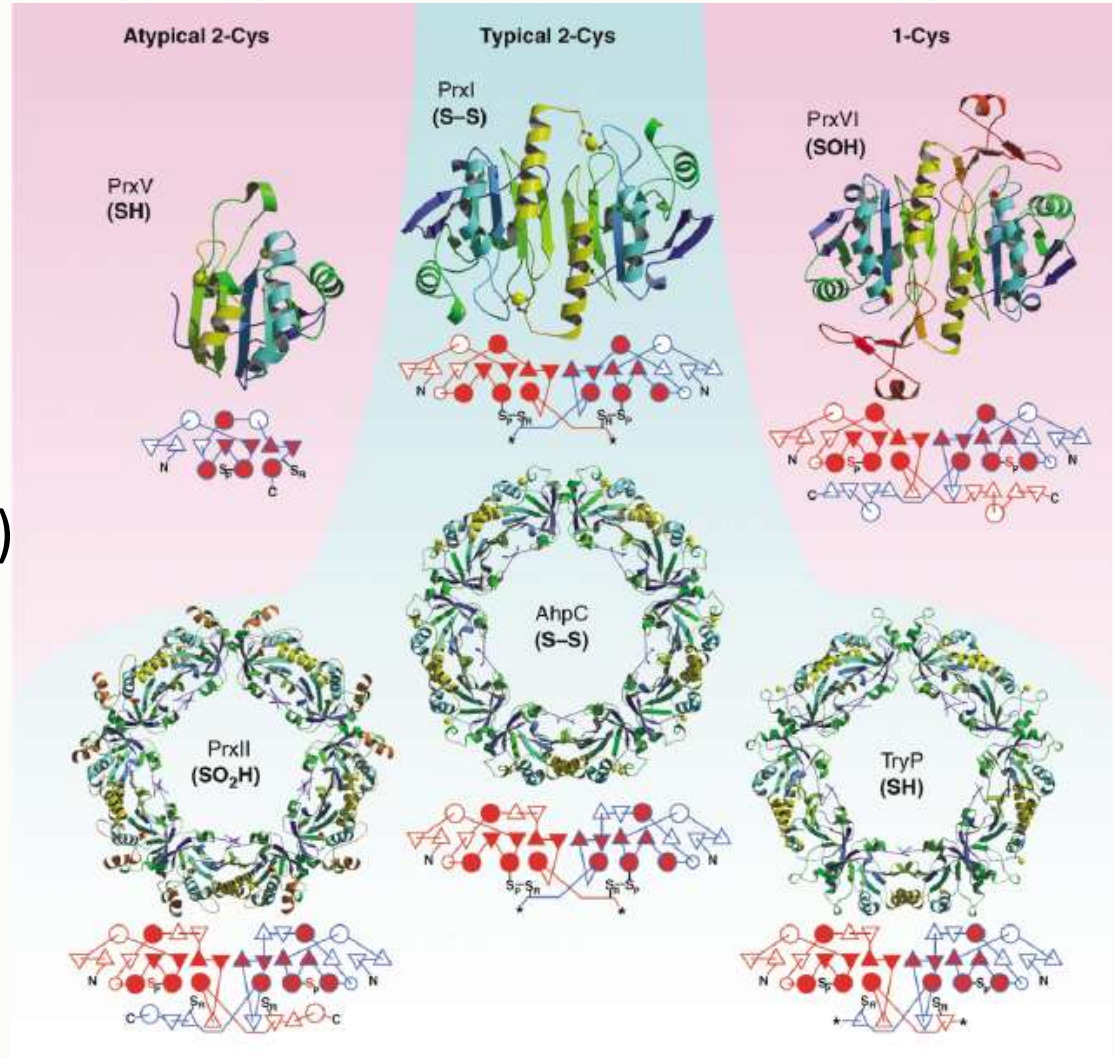


# Классификация пероксиредоксинов

## Семейства:

- Prx1/AhpC (typ 2-Cys)
- PrxQ/BSP (typ 2-Cys)
- Trx (typ 2-Cys)
- AhpE (typ 2-Cys)
- Prx5 (atyp 2-Cys)
- Prx6 (1-Cys)

(Nelson, K. J et al. 2011)



# Классификация внутри семейства Prx1/AhpC

- **Prx1/AhpC**
  - a, b..
  - m (митохондриальный)



(Wood Z.A. et al. 2003)



# Цель

Получение рекомбинантного белка тиоредоксин пероксидазы *O. felineus* и описание его структурных и иммуногенных характеристик.

## Задачи

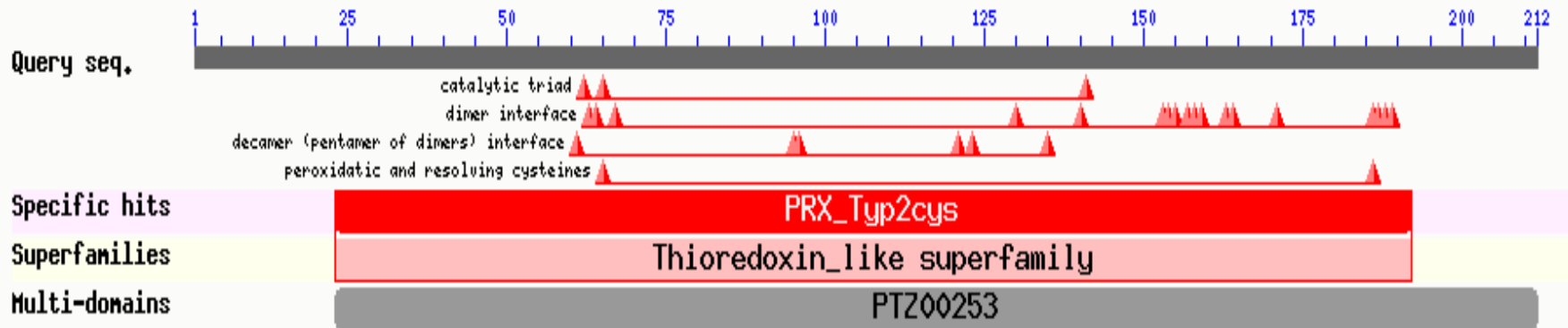
1. Проведение сравнительного анализа структуры белка тиоредоксин пероксидазы *O. felineus*;
2. создание генно-инженерной конструкции тиоредоксин пероксидазы *O. felineus* и наработка рекомбинантного белка тиоредоксин пероксидазы *O. felineus*;
3. получение поликлональных антител на рекомбинантный белок тиоредоксин пероксидазу *O. felineus* и анализ их реактивности с различными антигенами для определения специфичности;
4. проведение иммуногистохимического анализа тканевой локализации белка.



# Структурная характеристика тиоредоксин пероксидазы *O. felineus*

MGFAITVIVCTISLVSAMALLPNQPAPEFSGMAVVNGEFKNISLKDYRGKYVILLFYPLDFTF  
VCPT**ELIA**FSDAAEEFKSKNCVIGCSTDSVYAHLQWTKMDRKAGGLGKMNIPLSDKNMKIS  
RAYHVLDEEEGHAFRGQFLIDPKGILRQITVNDRPVGRSVEEAIRLLEAFHFHEQHGD**VCPAN**  
WKPKGKTMKADPVAAQEYFSSVN

Подчеркнута последовательность сигнального пептида (с 1 по 17 аа). **Красным** - отмечены пероксидазный и «разрешающий» цистеины - Cys 65 и Cys 186.



При помощи BLASTp-анализа против базы данных CDD (NCBI) TPx *O. felineus* однозначно классифицируется как типичный 2-цис пероксиредоксин

# Структурная характеристика тиоредоксин пероксидазы *O. felineus*

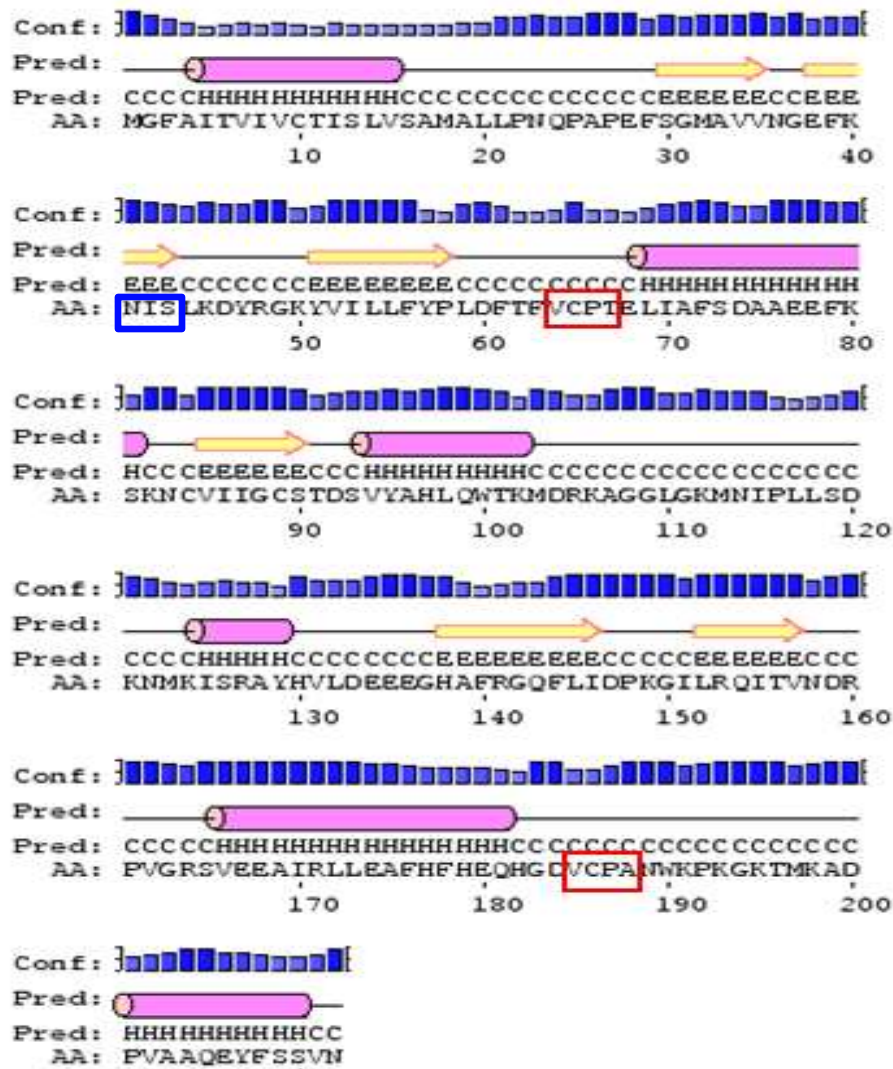
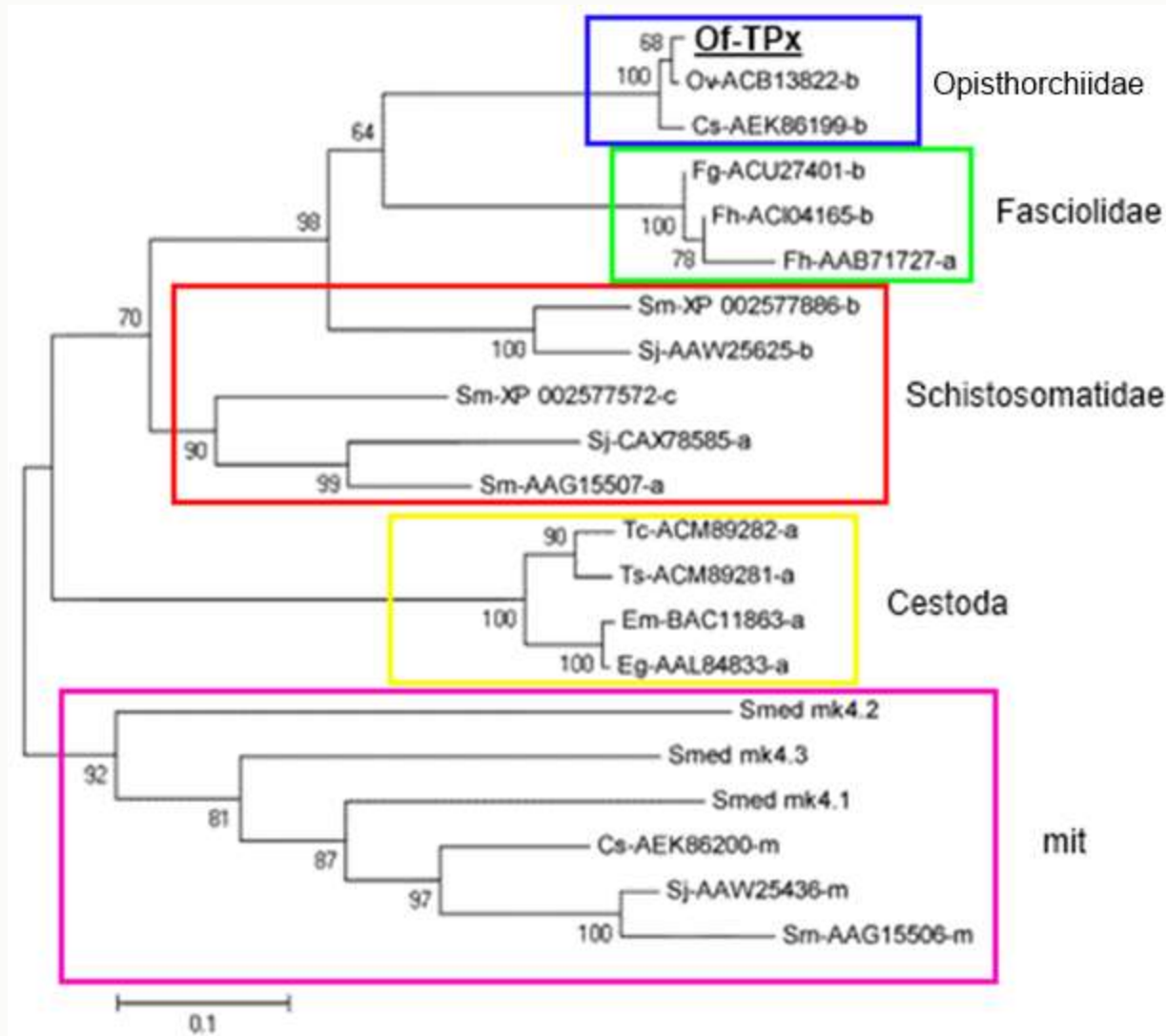


Схема вторичной структуры TPx *O. felineus*, предсказанной с помощью сервера PSIPRED

**Красными прямоугольниками** отмечены консервативные цистеиновые участки;  
**синим** – обозначена консенсусная последовательность NXS/T, необходимая для N- гликозилирования



# Филогенетическое дерево белков семейства пероксиредоксинов у плоских червей

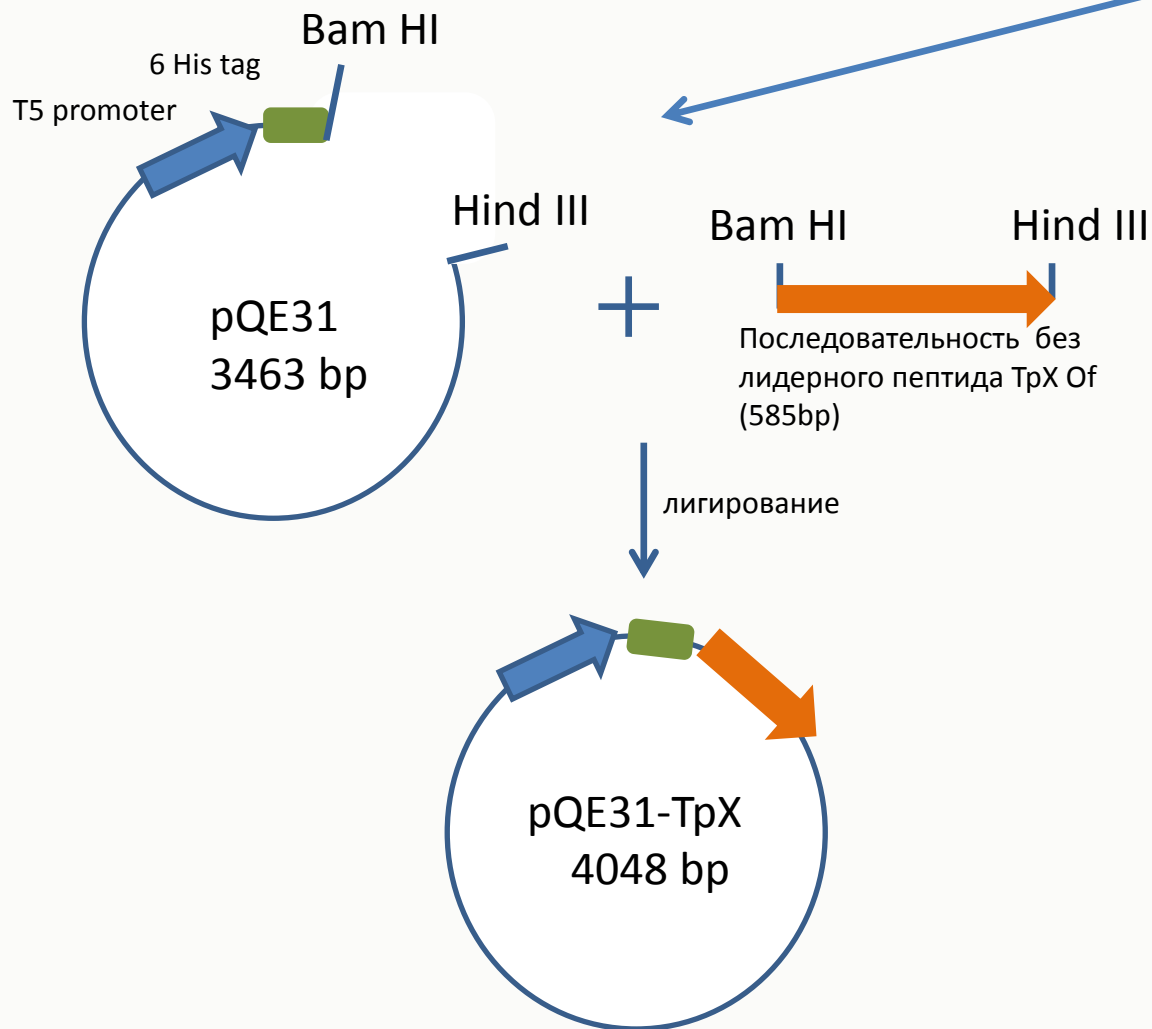


Исследуемый белок был отнесен к подсемейству Prx1b

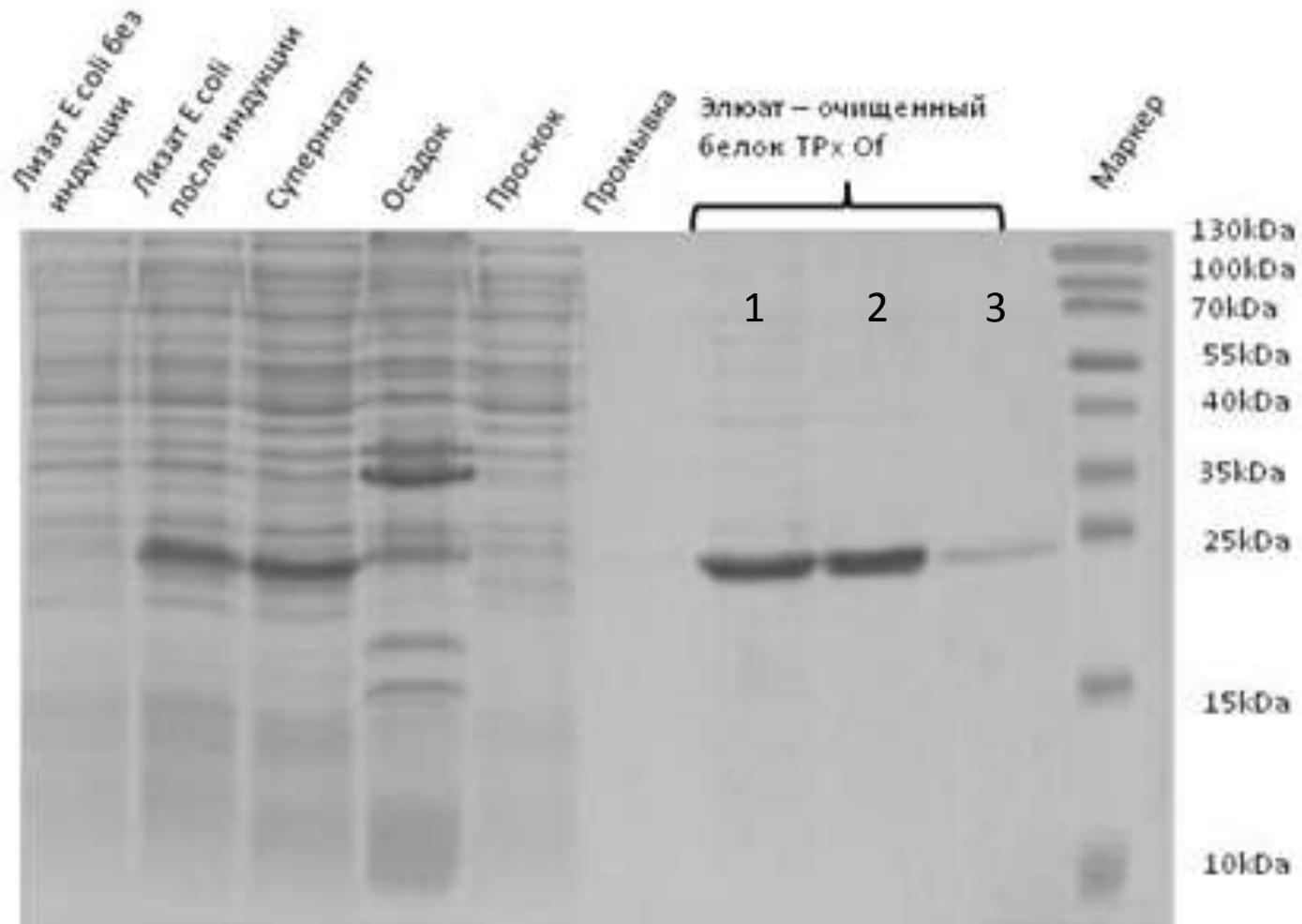
# Создание генно-инженерной конструкции для получения белка Трх *O. felineus*



мРНК → кДНК → кДНК Трх-Of



# Экспрессия, анализ растворимости и очистка Ni-NTA хроматографией recTRx *O. felineus*





# Получение поликлональных антител

Иммунизация кролика белком гесТРх-Of



**1 день** – иммунизация с полным адьювантом Фрейнда; забор крови в качестве контроля;

**14 день** - иммунизация с неполным адьювантом Фрейнда;

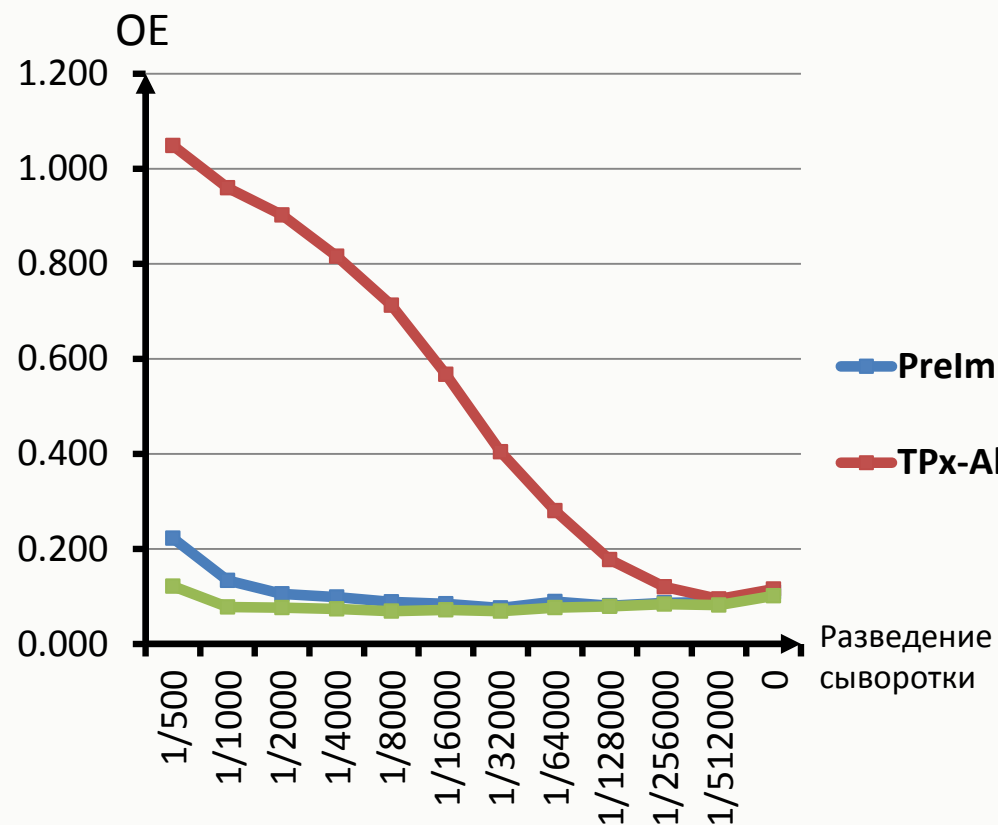
**28 день** - иммунизация с неполным адьювантом Фрейнда;

**42 день** – иммунизация с раствором чистого антигена;

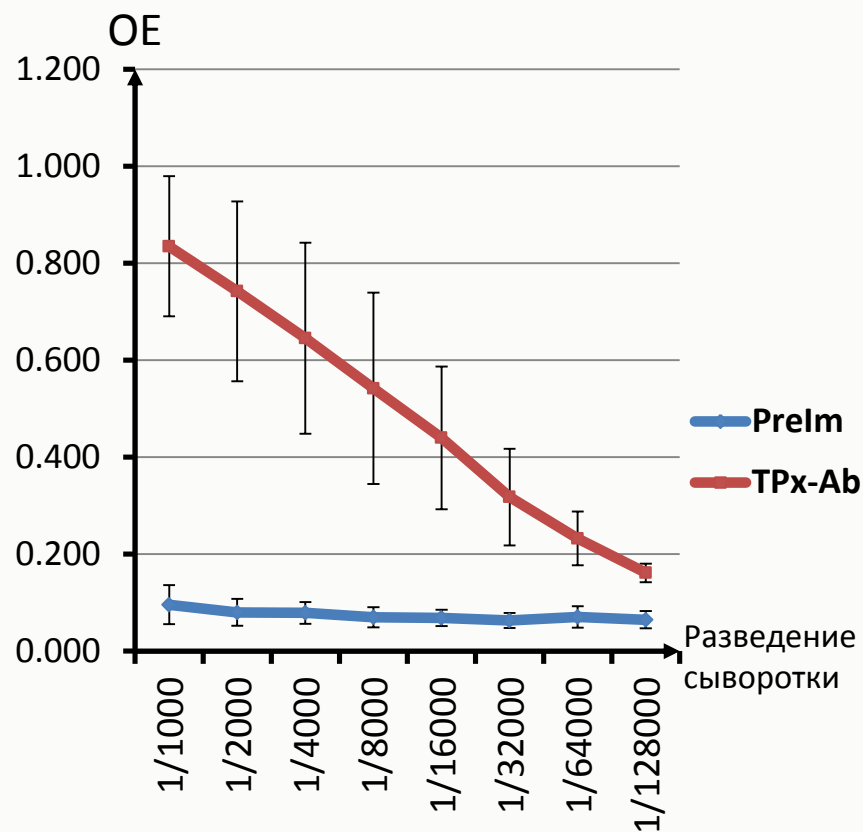
**61 день** – первый забор крови



# Проверка специфичности полученной сыворотки

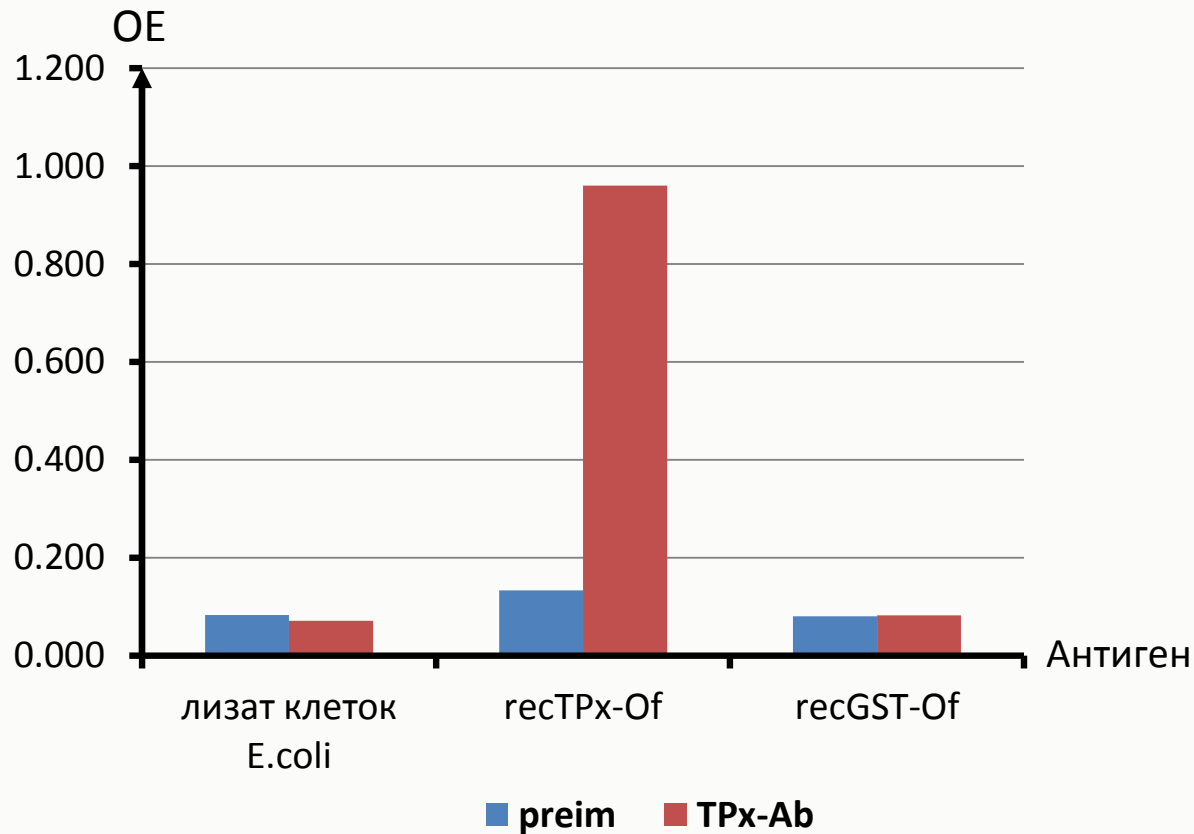


Проверка реактивности  
различных сывороток recTPx-Of



Оценка реактивности антител  
TPx-Ab с recTPx-Of

# Проверка специфичности полученной сыворотки

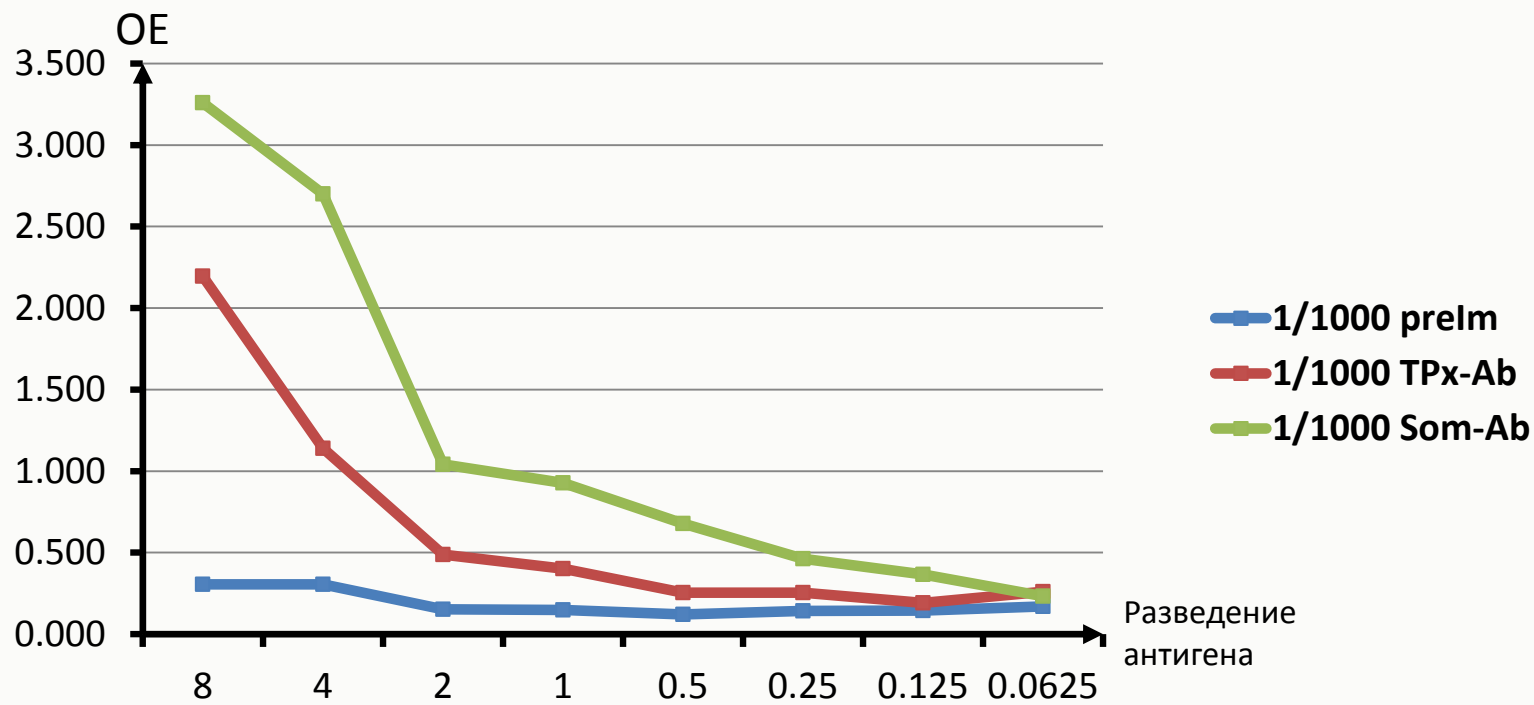


Оценка взаимодействия TPx-Ab и отрицательного контроля  
с различными антигенами

# Проверка взаимодействия сыворотки с соматическим антигеном

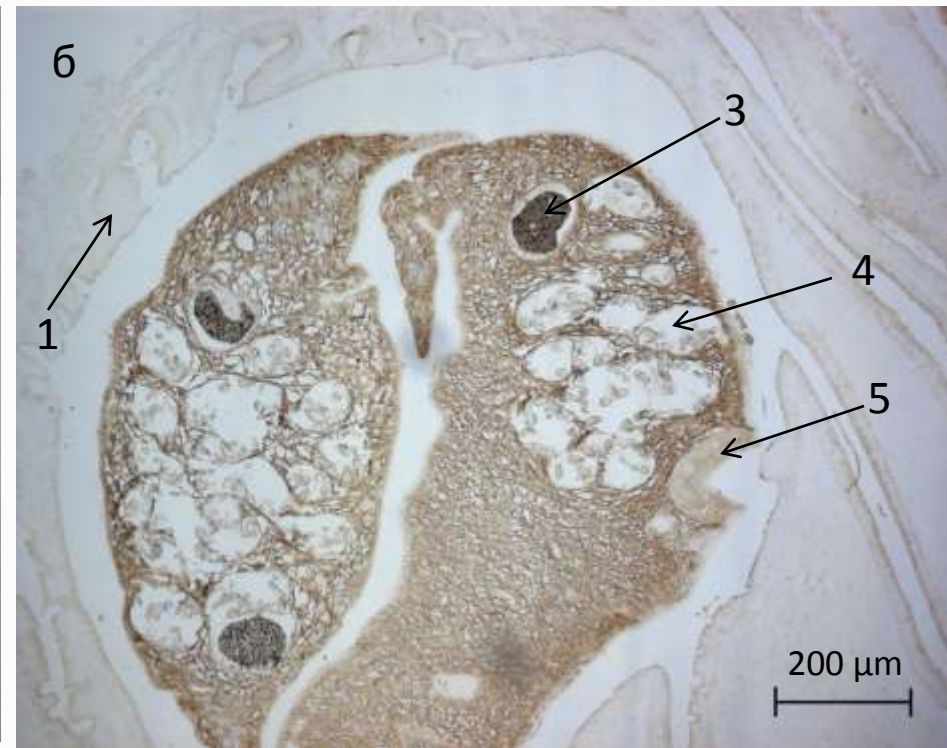
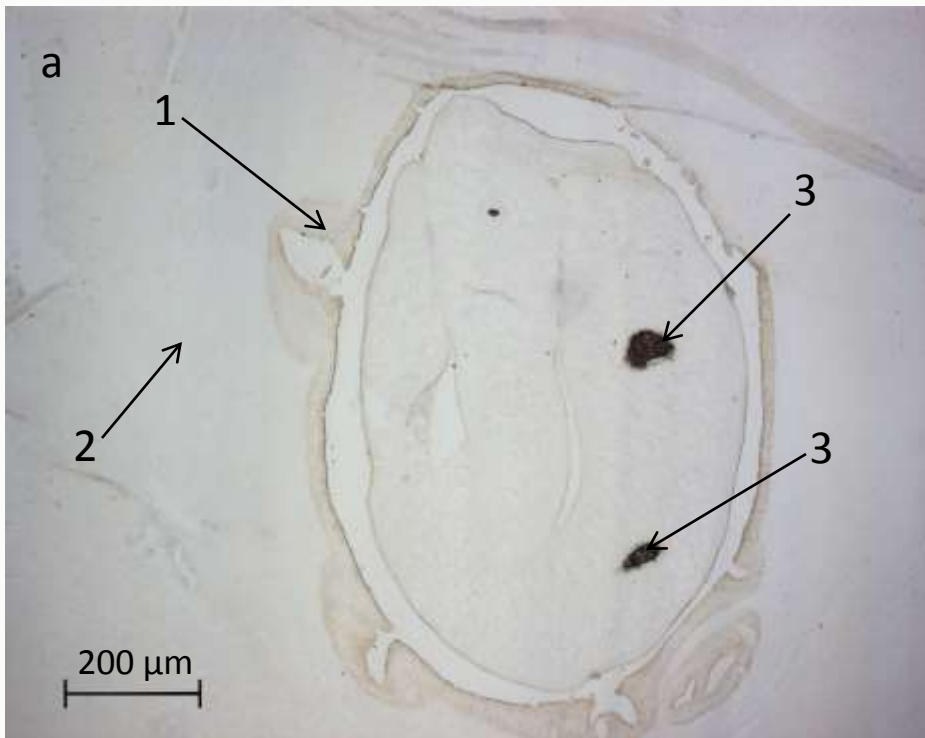


→ Som-Ag → Som-Ab



Взаимодействие различных сывороток с соматическим антигеном

# Определение тканевой локализации ТРх *O. felineus*

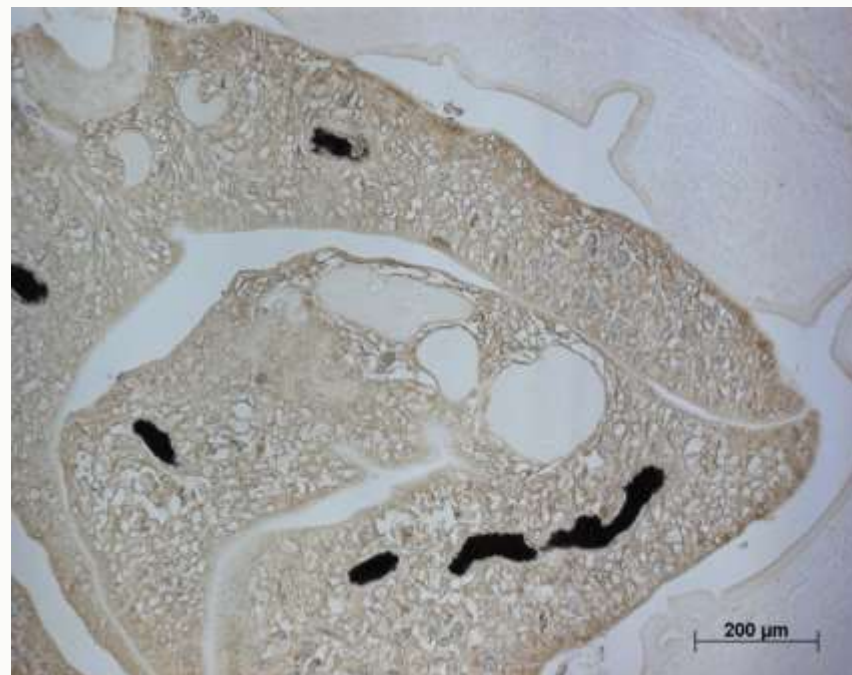
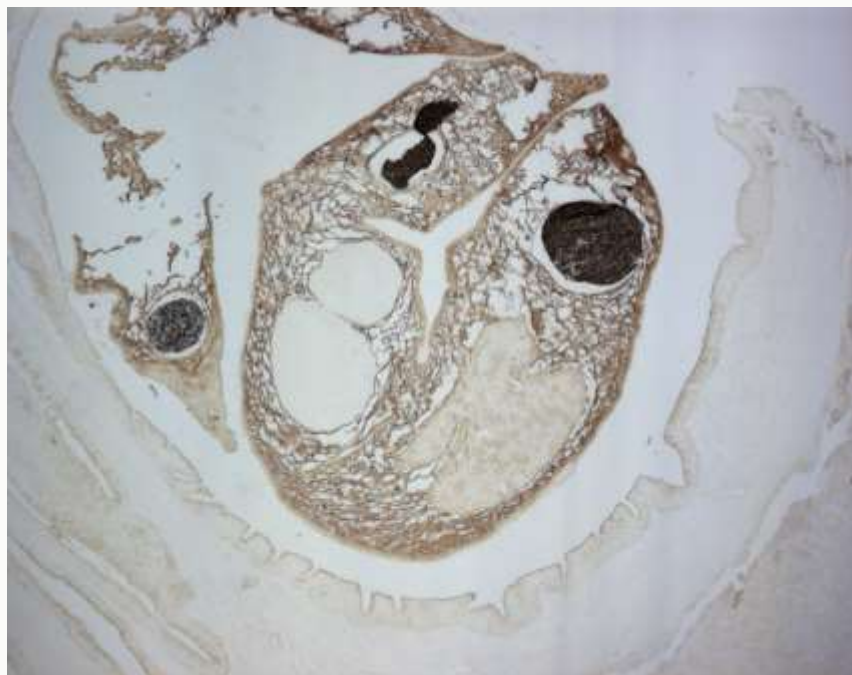


Иммунохимическая окраска гистологических срезов печени золотистых хомячков, зараженных *O. felineus*: **а.** преиммунной сывороткой; **б.** сывороткой с ТРх-Аб (зараженность 2 месяца). Стрелками и цифрами обозначены: ткани хозяина – **1.** эпителий печеночных протоков, **2.** паренхима; органы взрослой особи *O. felineus* – **3.** кишечник, **4.** матка, **5.** брюшная присоска.

# Выводы

1. Анализ структуры белка TPx *O. felineus* выявил признаки класса типичных 2-Цис пероксиредоксинов и наличие сайта возможного N-гликозилирования, консервативного у описторхид, филогенетический анализ позволил уточнить классификацию и отнести белок тиоредоксин-пероксидазу *O. felineus* к подсемейству Prx1b.
2. Создана генно-инженерная конструкция на основе вектора pQE31 для экспрессии тиоредоксин пероксидазы (без сигнального пептида) *O. felineus* и наработан рекомбинантный белок recTPx-Of в бактериальной системе *E. coli* размером 24kDa.
3. В результате иммунизации кроликов были наработаны поликлональные антитела против recTPx-Of и при проверке на специфичность дали положительный ответ при взаимодействии с соматическим антигеном, что свидетельствует о соответствии рекомбинантного белка recTPx-Of тиоредоксин-пероксидазе *O. felineus*.
4. При помощи иммуногистохимического окрашивания показано, что белок TPx присутствует во всех тканях паразита.

Спасибо за внимание







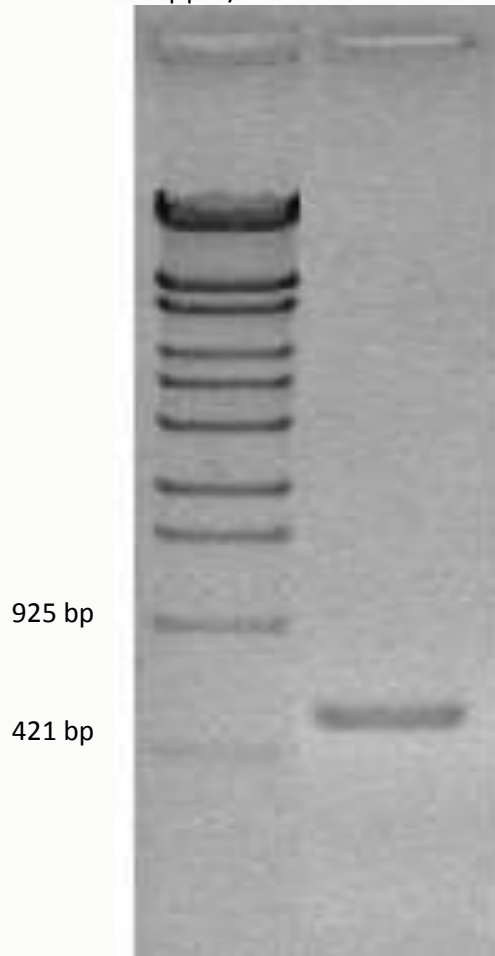


# Клонирование гена Трх *O. felineus*

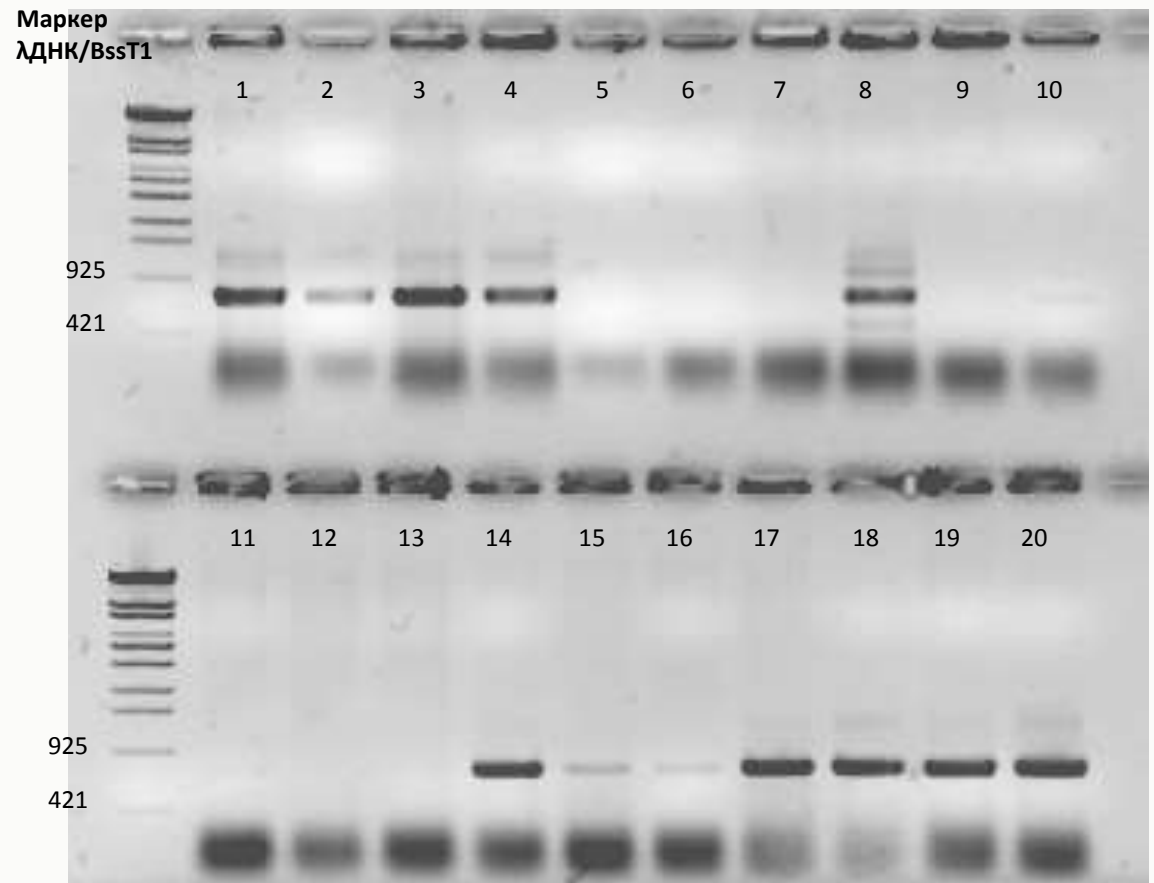
Электрофорез ПЦР-фрагмента

Маркер  
λДНК/BssT1

Трх Of

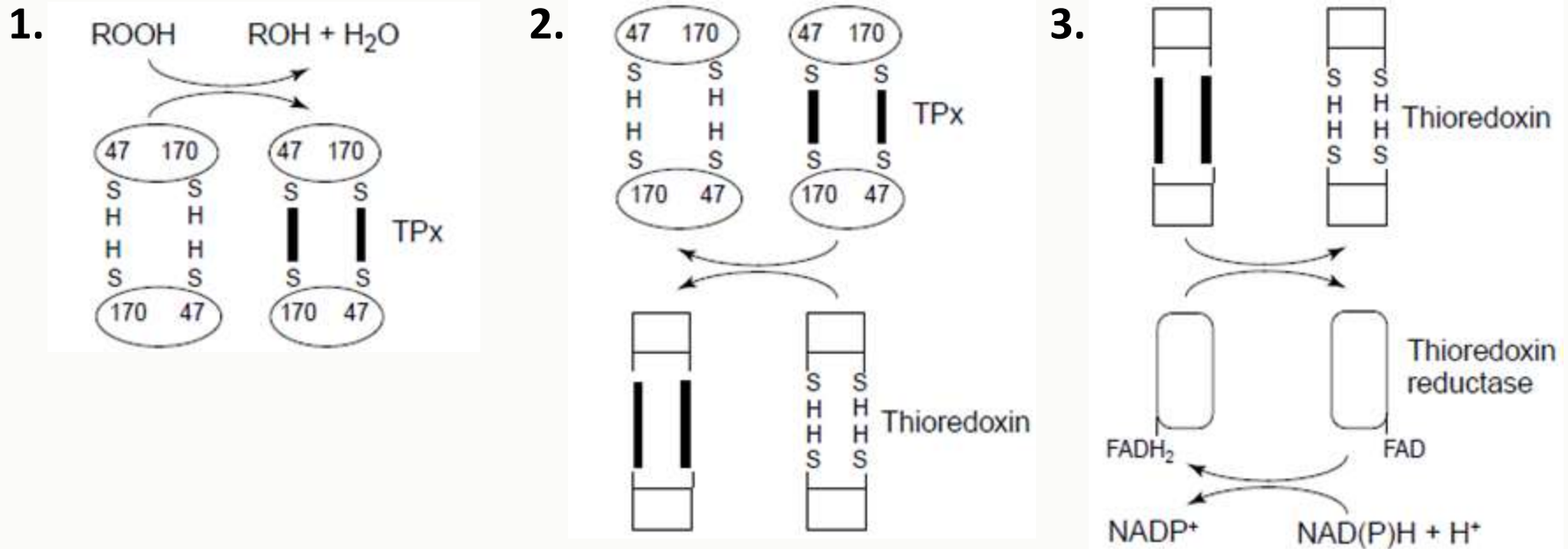


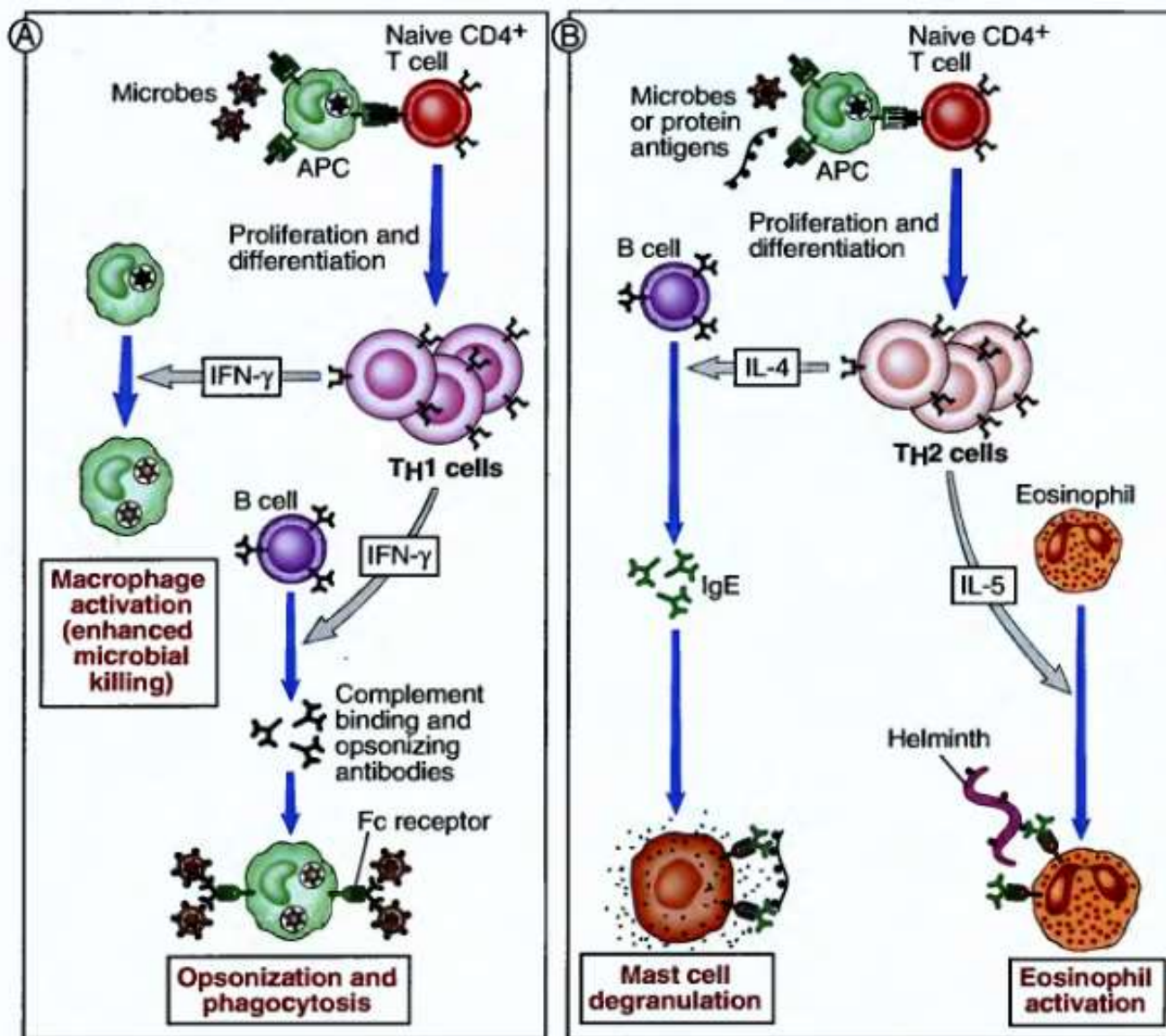
ПЦР-скрининг колоний после трансформации вектором



1-20 - номера колоний; Маркер Лямбда ДНК/BssT1

# Обобщенная схема окислительно-восстановительного цикла белка TPx (S. McGonigle et al., 1998)





**Figure 5-11** The functions of  $T_H1$  and  $T_H2$  subsets of  $CD4^+$  helper T lymphocytes. A.  $T_H1$  cells produce the cytokine IFN- $\gamma$ , which activates phagocytes to kill ingested microbes and stimulates the production of antibodies that promote the ingestion of microbes by the phagocytes. B.  $T_H2$  cells specific for microbial or nonmicrobial protein antigens produce the cytokines IL-4, which stimulates the production of IgE antibody, and IL-5, which activates eosinophils. IgE participates in the activation of mast cells by protein antigens and coats helminths for destruction by eosinophils. *Continued*

# Литература

- McGonigle S., Dalton J.P., James E.R.. Peroxidoxins: A New Antioxidant Family //Parasitology Today, 1998, vol. 14, p.139-145
- Nelson, K. J., Knutson, S. T., Soito L., Klomsiri C., Poole, L. B., and Fetrow, J. S.. Analysis of the peroxiredoxin family: using active site structure and sequence information for global classification and residue analysis// Proteins, 2011, vol. 79, 947-964
- Wood Z.A., Schroder E., Harris J.R., Poole L.B.. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins//TRENDS in Biochemical Sciences, 2003, vol.28, 32-40