

Д. В. Каменек, О. Н. Ильинская, Е. В. Никитина,  
Л. К. Каменек

## ДЕЙСТВИЕ ДЕЛЬТА-ЭНДОТОКСИНА *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR. *SOTTO* НА ИОННЫЙ ТРАНСПОРТ В КЛЕТКАХ КУЛЬТУРЫ *HeLa*

*Ключевые слова:* дельта-эндотоксин *Bacillus thuringiensis*,  $Mg^{2+}$ -зависимая  $K^+$ ,  $Na^+$ -АТФазы, транспорт ионов в клетке.

Показано нарушение активного транспорта ионов  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$  через цитоплазматическую мембрану клеток культуры *HeLa* после 15 мин их инкубации с дельта-эндотоксином *Bacillus thuringiensis* var. *sotto* 617. Изменению концентрации ионов предшествует активирование  $Mg^{2+}$ -зависимой  $K^+$ ,  $Na^+$ -АТФазы (до 6 – 7 раз), начиная с 1 мин после добавления токсина. Такие эффекты характерны для действия разобщителей процессов окислительного фосфорилирования и дыхания.

*Keywords:* delta-endotoxin *Bacillus thuringiensis*,  $Mg^{2+}$ -dependent  $K^+$ ,  $Na^+$ -ATPase, transport of ions in the cell.

It is shown violation of ion active transport  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  through the cytoplasmic membrane cell culture *HeLa* after 15 min of incubation with delta-endotoxin *Bacillus thuringiensis* var. *sotto* 617. Changes in ion concentration precedes activation  $Mg^{2+}$ -dependent  $K^+$ ,  $Na^+$ -ATPase (up to 6 - 7 times), from 1 min after the addition of toxin. Such effects are characteristic to the uncouplers of oxidative phosphorylation and respiration.

### Введение

Известно, что основными токсическими компонентами *B. thuringiensis* являются белковые дельта-эндотоксины [1,2]. Многочисленные подвиды *B. thuringiensis* продуцируют дельта-эндотоксины, гомологичные по составу, но различные по специфичности действия на насекомых. Так, синтез дельта-эндотоксинов генетически детерминирован [3] и токсины *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* являются продуктами генов *CryIIa10* и *CryIa1* и патогенны для чешуекрылых [4]. Дельта-эндотоксины организованы в виде параспоральных кристаллов. Показано, что эндотоксины формируют в мембране ион-специфические поры, нарушают ионный транспорт через мембрану [5]. В последние годы значительный интерес в мировой науке уделяется спорообразующей кристаллоформной бактерии *Bacillus thuringiensis*, поражающей многие виды насекомых и используемой при получении инсектицидных препаратов для защиты растений. До недавнего времени *B. thuringiensis* рассматривали исключительно как энтомопатогенный микроорганизм. Однако в последние годы установлено, что помимо инсектицидного действия он проявляет цитотоксическую активность в отношении некоторых бактерий, фитопатогенных грибов и раковых клеток [1].

Известно, что *B. thuringiensis* продуцирует дельта-эндотоксин с молекулярной массой от 60 до 150 кДа, при этом наиболее представлены полипептиды около 70-90 кДа, до которых диссоциируют кристаллы в слабощелочной среде кишечника насекомого в присутствии специфических протеиназ (в том числе протеолитических ферментов бактерии-продуцента). Именно данные токсические компоненты обуславливают комплекс патологических проявлений, возникающих под его воздействием в различных клеточных культурах. Установлено, что строение и химические свойства токсинов, продуцируемых разными подвидами бактерии, имеют значительное сходство [2]. Токсины способны оказывать цитостатическое воз-

действие на мембраны клеток кишечного эпителия восприимчивых насекомых. Показано так же, что дельта-эндотоксин способен связываться с чувствительными рецепторами на цитоплазматических мембранах клеток кишечного эпителия насекомых, а затем проникать в них, формируя каналы-поры, приводящие к нарушению активного транспорта ионов через мембрану [3, 4]. Под влиянием дельта-эндотоксинов отмечали также активирование АТФаз клеток насекомых, уплотнение митохондриального матрикса, разрушение ядерного хроматина и, наконец, лизис клеток. Считают, что перечисленные нарушения метаболизма и последующий лизис клеток-мишеней могут являться следствием протонофорной активности белкового токсина [5]. Имеются данные, показывающие, что первичным действием дельта-эндотоксина является разобщение окислительного фосфорилирования и дыхания в митохондриях чувствительных к нему клеток, обусловленное его протонофорными свойствами. Способность разобщать при этом не зависит от источника происхождения токсина (в пределах патотипа), но прямо пропорциональна его концентрации [6].

Однако имеющиеся в литературе данные касаются только механизма действия дельта-эндотоксина на клетки насекомых. В доступной литературе имеется очень мало сведений, освещающих механизм действия дельта-эндотоксина на раковые клетки. Вместе с тем есть основания полагать, что оба механизма имеют общие черты.

Целью настоящей работы являлось изучение действия дельта-эндотоксина *B. thuringiensis* var. *sotto* 617 на активный транспорт ионов в клетках культуры *HeLa* (рака шейки матки человека).

### Материалы и методы исследования

В работе использовали штамм 617 подвида *B. thuringiensis* subsp. *sotto*, полученный из ФГУП ГосНИИ Генетики и селекции промышленных микроорганизмов. Данный подвид продуцирует дельта-эндотоксин, токсичный для чешуекрылых (патотип А) и кодируемый генами *Cry I* - класса [7]. Поверхност-

ное культивирование осуществляли в термостатах при 27°C в чашках Петри на агаризованной питательной среде РПА, pH = 7,2–7,5. Биомассу *B. thuringiensis*, содержащую кристаллы эндотоксинов и споры продуцента, отмывали дистиллированной водой от компонентов питательной среды и водорастворимых токсинов. Кристаллы предварительно выделяли в чистом виде, используя двухфазную систему: 1% водный раствор сульфата натрия – четыреххлористый углерод [8]. При этом кристаллы переходили в водную фазу, из которой их осаждали центрифугированием. Щелочную экстракцию дельта-эндотоксина выполняли по методу Кукси [9]. Затем раствор подвергали диализу и доводили водой до необходимой концентрации. pH раствора снижали до 7,8 осторожным титрованием 0,1 н. HCl. Разделение токсичных полипептидов проводили методом хроматографии на колонке Lephadex-G-200 размером 2,54×10 см. Поскольку компоненты низкомолекулярных фракций могут являться гидролизатами кристаллов, продуцирующих низкомолекулярные эндотоксины, для проведения экспериментов их исключали, подвергая исходные щелочные гидролизаты разделению методом колоночной хроматографии и собирая только фракции с Mg выше 60 кДа. Их масса составляла не менее 90% от общей массы белка. Соответствие полученных экстрактов эндотоксинам подтверждали электрофоретически с использованием следующих маркерных белков: бычий сывороточный иммуноглобулин G (Mg 150 кДа), трансферрин (Mg 80-90 кДа), альбумин (Mg 67 кДа), цитохром с (Mg 13,37 кДа). Очистку дельта-эндотоксинов завершали микрофильтрацией через бактериальные фильтры (диаметр пор 0,4 мкм), которая являлась одновременно и стерилизацией. В экспериментах использовали свежеприготовленные растворы дельта-эндотоксина [10]. Уровень белка определяли по методике Лоури [11].

Культуру перевиваемой линии клеток HeLa (рак шейки матки женщины) выращивали на питательной среде Грейса с добавлением телячьей сыворотки при pH=7.2. Титр культуры составлял 1 млн клеток на 1 мл суспензии [12].

Определение концентрации ионов проводили следующим образом. Для изучения действия дельта-эндотоксина на уровни концентрации ионов 0,1 мл клеточной суспензии инкубировали в течение различных промежутков времени с раствором эндотоксина и отделяли центрифугированием в течение 5 мин при 5000 об/мин. Затем клетки растворяли в концентрированной HNO<sub>3</sub>. Концентрацию ионов K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup> измеряли с помощью атомно-адсорбционного спектрофотометра марки C-115 или Perkin-Elmer-360, Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup> в буфере 0,5% Cs<sub>2</sub>Cl<sup>+</sup>, а Mg<sup>2+</sup> и Ca<sup>2+</sup> – 0,5% LnCl<sub>2</sub>. Натрий, калий и кальций определяли в режиме эмиссии, магний — в режиме абсорбции. Результаты выражали в мкмоль/л [13].

Активность Mg<sup>2+</sup>-зависимой АТФазы устанавливали по выделению неорганического фосфата (Ф<sub>n</sub>) из АТФ в результате реакции ферментативного гидролиза [14]. Реакционная смесь содержала в конечном объеме 2 мл (в мМ): 5 MgCl<sub>2</sub>; 20 KCl; 100

NaCl; 5 АТФNa<sub>2</sub>; 40 трис-HCl, pH 7,4 и препарат клеток, содержащий 0,2-0,3 мг белка. Препарат фермента получали в результате размораживания клеток и последующей их гомогенизации. При изучении действия дельта-эндотоксина на АТФазу in vitro в реакционную смесь добавляли необходимое в опыте количество раствора токсина. В качестве контроля использовали смесь, содержащую все компоненты кроме препарата фермента, или содержащую его, но в этом случае трихлоруксусную кислоту приливали до введения в смесь ферментного препарата. После 20 мин инкубации при 37°C реакцию прекращали, приливая холодную трихлоруксусную кислоту до конечной концентрации 5%. Для определения содержания неорганического фосфата к исследуемому раствору приливали дистиллированную воду до 3,6 мл, добавляли 0,5 мл 6,6%-ного раствора молибдата аммония, 0,5 мл 7,5 н H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и 0,4 мл раствора сульфата железа (II). Раствор сульфата железа готовят, растворяя 1г FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O в 10 мл H<sub>2</sub>O, затем добавляют 0,2 мл 7,5 н раствора H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. После добавления указанного раствора пробы перемешивали, оставляли при комнатной температуре на 40 мин.

Концентрацию Ф<sub>n</sub> регистрировали на спектрофотометре марки СФ-26 ЛОМО отечественного производства в кюветках кварцевого стекла с толщиной слоя 1 см при 625 нм по изменению интенсивности окраски раствора, вызванной образованием фосфорномолибденового комплекса. Делали поправку на спонтанный гидролиз АТФ и концентрацию начально присутствовавшего в растворе Ф<sub>n</sub>. Активность фермента выражали в мг неорганического фосфата, выделенного в течение 1 ч при действии на АТФ ферментного препарата, содержащего 1 мг белка (мг Ф<sub>n</sub>:мг -1 белка·ч -1). Количество неорганического фосфата определяли по калибровочному графику. Каждое определение проводили не менее, чем в трех повторностях. Содержание белка устанавливали по методу Лоури, как описано ниже.

Во всех случаях оценивали достоверность полученных различий признаков в опыте по сравнению с контролем или пар признаков с использованием соответствующих алгоритмов. В лабораторных исследованиях использовали критерий достоверности Стьюдента [15].

### **Влияние хлорированных фуранонов на жизнеспособность бацилл**

Для разрешения получения более полной картины действия дельта-эндотоксина на систему ионного транспорта через цитоплазматическую мембрану, было проведено измерение уровней концентрации ионов в различные моменты времени после начала действия токсина. Данные, представленные в таблицах 1 и 2, показывают, что, начиная с 15 минут после добавления токсина, значительно изменялась концентрация всех определяемых ионов в клетках HeLa. Наибольшие отклонения от нормы наблюдали в концентрации ионов Na<sup>+</sup>, причем степень повышения уровня зависела от количества добавляемого токсина. Максимальное увеличение составляло 203% через 30 мин для 100 мкг/мл токсина и 182% через 1 ч для 50

мкг/мл. Существенно снижалась концентрация ионов  $K^+$ , достигая 61% от исходного значения через 30 мин для 100 мкг/мл и 60% через 1 ч для 50 мкг/мл. Для  $Mg^{2+}$  отмечено снижение до 78% через 30 мин для 100 мкг/мл и 71% через 1 ч для 50 мкг/мл, соответственно. Концентрация ионов  $Ca^{2+}$ , наоборот, повышалась через тот же период времени до 130 и 136%, соответственно.

Наблюдения с помощью светового микроскопа показали. Что в этот период (от 15 мин и далее) происходит нарастание процесса вакуолизации клеток, связанной с нарушением транспорта ионов через цитоплазматическую мембрану. Нарушение транспорта ионов, и в первую очередь нерегулируемый приток в клетки  $Na^+$ , приводит к увеличению скорости пассивного транспорта воды в нее, что и является непосредственной причиной вакуолизации.

Получены достоверные данные, показывающие значительное изменение концентрации ионов  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$ . Поддержание постоянства концентрации этих ионов чрезвычайно важно из-за высокой их биологической активности. Оба эти иона присутствуют в клетке не в свободном виде, а находятся в комплексе с другими веществами.  $Ca^{2+}$ , вероятнее всего, связан с цитратом [16], а  $Mg^{2+}$  с АТФ.  $Ca^{2+}$  в основном находится в органеллах – митохондриях, эндоплазматическом ретикулуме, кальцисомах, а не в цитозоле.

**Таблица 1 – Влияние дельта-эндотоксина (50 мкг/мл) на концентрацию ионов в клетках *HeLa***

Время после обработки, мин	Концентрация ионов (мкмоль $\times 10^5$ клеток)							
	$K^+$	%	$Na^+$	%	$Ca^{2+}$	%	$Mg^{2+}$	%
исходная	127,7 $\pm$ 4,9	100	32,8 $\pm$ 3,2	100	14,1 $\pm$ 1,2	100	25,7 $\pm$ 2,6	100
5	139,2 $\pm$ 16,5	109	32,9 $\pm$ 6,1	100	13,7 $\pm$ 1,7	97	25,6 $\pm$ 1,8	100
10	128,3 $\pm$ 3,9	101	35,8 $\pm$ 2,1	109	14,9 $\pm$ 2,4	106	23,6 $\pm$ 2,1	92
15	104,7 $\pm$ 12,6	82	41,7 $\pm$ 4,8	127	16,2 $\pm$ 1,3	115	21,6 $\pm$ 2,2	84
30	99,7 $\pm$ 4,6** *	78	50,2 $\pm$ 3,6***	153	17,3 $\pm$ 1,0*	123	18,2 $\pm$ 1,7*	71
60	76,6 $\pm$ 10,4** **	60	59,7 $\pm$ 5,2***	182	19,2 $\pm$ 0,9**	136	18,4 $\pm$ 1,1*	71
180	80,7 $\pm$ 6,0** *	63	53,1 $\pm$ 4,1***	162	18,1 $\pm$ 1,8	128	19,5 $\pm$ 1,6*	76

Примечание: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$  при  $n = 20$  ( $n$  – число пар измерений).

Результаты, представленные в таблице 3, показывают значительное активирование  $K^+, Na^+$  - АТФазы культур клеток *HeLa*. Активирование началось уже через 1 мин после добавления токсина и составляло 59%. Максимальных значений активность фермента достигала через 15 мин и составляла 213%. Полученные данные показывают, что изменение активности фермента предшествует изменению концентраций

ионов в клетках и, следовательно, является первичным по отношению к ним. Такой эффект характерен для действия веществ, разобщающих процессы дыхания и окислительного фосфорилирования.

**Таблица 2 – Влияние дельта-эндотоксина (100 мкг/мл) на концентрацию ионов в клетках культуры *HeLa***

Время после обработки, мин	Концентрация ионов (мкмоль $\times 10^5$ клеток)							
	$K^+$	%	$Na^+$	%	$Ca^{2+}$	%	$Mg^{2+}$	%
исходная	127,6 $\pm$ 4,9	100	32,8 $\pm$ 3,2	100	14,1 $\pm$ 1,2	100	25,7 $\pm$ 2,6	100
5	128,2 $\pm$ 5,2	101	31,5 $\pm$ 1,6	96	13,6 $\pm$ 2,0	96	28,4 $\pm$ 4,1	111
10	123,8 $\pm$ 6,3	97	33,2 $\pm$ 3,8	101	14,5 $\pm$ 1,9	103	26,3 $\pm$ 2,5	102
15	89,3 $\pm$ 4,8***	70	59,7 $\pm$ 4,0** *	165	17,6 $\pm$ 0,9**	125	24,2 $\pm$ 2,8	94
30	77,8 $\pm$ 5,2***	61	77,5 $\pm$ 2,4** *	203	18,3 $\pm$ 1,3** *	130	20,0 $\pm$ 2,1** *	78

Примечание: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$  при  $n = 20$  ( $n$  – число пар измерений)

Известно, что  $K^+, Na^+$  – АТФазы ответственны за активный перенос ионов через цитоплазматическую мембрану и мембраны внутриклеточных структур [17, 18]. В описанных выше экспериментах показано, что наряду с изменением концентрации неорганических катионов в клетках, происходит существенное активирование  $Mg^{2+}$ -зависимой  $K^+, Na^+$ -АТФазы, локализованной в различных мембранных структурах клетки, включая цитоплазматическую мембрану. Активирование фермента происходило раньше (1 мин), чем изменение концентрации неорганических катионов (15 мин). К моменту начала изменения концентрации ионов активность фермента достигала существенного значения (638% от исходного в клетках *HeLa*). Такое существенное увеличение активности фермента противоречит концепции прямого нарушения концентрации ионов за счет их пассивного транспорта по градиенту концентрации через образованные токсином водные поры. В этом случае следовало бы ожидать угнетение ферментативной активности из-за нарушения активного транспорта. Поскольку активность фермента характеризовала его способность к гидролизу субстрата (АТФ), и известно, что эта способность резко повышается в условиях разобщения окислительного фосфорилирования и дыхания, активирование данной ферментной системы фактически отражает степень деэнергизации клетки. Следствием деэнергизации является связанная с нарушением ионного транспорта и притоком в клетку воды вакуолизация, приводящая в конечном итоге к разрушению клетки.

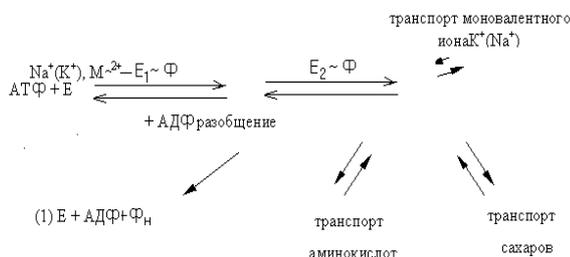
**Таблица 3 – Влияние дельта-эндотоксина *B. thuringiensis* (50 мкг/мл) на  $Mg^{2+}$ -зависимую  $K^+, Na^+$  - АТФазу в клетках культуры *HeLa***

Время после обработки, мин	<i>HeLa</i>	
	A (мг Р <sub>n</sub> × 10 <sup>5</sup> белка)	% от исходной A
исходная	0,058±0,007	100
1	0,085±0,013	147
5	0,285±0,018***	491
10	0,305±0,019***	526
15	0,370±0,032***	638
30	0,355±0,026***	612
60	0,299±0,028***	516
120	0,250±0,048***	431

Примечание: \* –  $p \leq 0,05$ ; \*\* –  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* –  $p \leq 0,001$  при  $n = 20$  ( $n$  – число пар измерений).

Для того чтобы выяснить, не является ли способность к гидролизу АТФ свойством самого дельта-эндотоксина, были проведены опыты по изучению его действия на этот субстрат в условиях, в которых обычно проводили ферментативную реакцию, но в отсутствие фермента. Было обнаружено, что эндотоксин не способен катализировать гидролиз АТФ с высвобождением фосфата. Исследование же дельта-эндотоксина в отсутствие, как фермента, так и субстрата (АТФ) показало, что он не может являться поставщиком свободного (неорганического) фосфата в реакционную среду.

Транспортные АТФазы выполняют две сопряженные функции: транспорт ионов и гидролиз АТФ, энергетически обеспечивающий транспорт. Согласно современным представлениям [19] процесс осуществляется согласно следующей схеме:



Где Е - транспортная АТФаза,  $E_1 \sim P$  и  $E_2 \sim P$  – ее активированные фосфатом переходные комплексы.

Как видно из схемы, торможение транспортной функции приводит к накоплению промежуточных продуктов реакции: АДФ и  $P_n$  (стадия (1)), что и регистрируется в наших экспериментах, как усиление гидролитической активности АТФазы.

Повышение концентрации ионов  $Na^+$  в клетке приводит к задержке в ней воды, которая вызывает значительную вакуолизацию. Положение усугубляет-

ся тем, что нарушение активного транспорта ионов приводит к нарушению зависимого от первого вторичного активного транспорта сахаров и аминокислот, согласно приведенной схемы. В результате происходит “набухание” клеток, цитоплазматические мембраны лопаются, клетки разрушаются. Для транспортных АТФаз очень характерны антипортные системы, в которых транспорт моновалентного иона в одну сторону сопровождается не транспортом другого иона металла в противоположную, а переносом протона [20].

## Литература

1. Т.Г. Юдина, Л.И. Бурцева // Микробиология. 66, 1, 25-31. (1997).
2. G.G.Chestukhina, L.I.Kostina, A.L.Mikhailova, S.A.Yurin, F.S.Klepikova, V.M.Stepanov. Arch. Microbiol, 132, 159-162 (1982).
3. J.Carroll, D.J. Ellar, Eur. J. Biochem, 214, 771-778 (1993).
4. L.B.Tran, V.Vachon, J.L.Schwartz, R.Laprade Appl. Environ. Microbiol, 67, 4488 – 4494 (2001).
5. Каменёк, Л.К. Дельта-эндотоксин *Bacillus thuringiensis*: строение, свойства и использование для защиты растений. Автореф. дисс. д.б.н. – М., 1998. – 40 с.
6. Д.В.Каменек, О.Н.Ильинская, Л.М.Цофина, Л.К. Каменек, Ученые записки Казанского государственного университета, Сер. Естественные науки. 150, 1, 69-76 (2008).
7. H.Höfte, H.Whiteley J. DNA Sequens. Mapp. 1, 97 -106 (1990).
8. I.R.Pendleton, R.V.Morrison, Nature. 212, 228-229 (1966).
9. К.Е. Cooksey // Biochem.J. 106, 445 – 454 (1968).
10. Бакеева, Л.Е. Средства защиты растений. – Новосибирск, 1986. – С. 19-22. Изменение структуры митохондрий в ответ на функциональные воздействия / Л.Е.Бакеева, А.А.Ясайтис // В сб.: Митохондрии. Молекулярные механизмы ферментативных реакций. – М.: Наука. – 1972. – С. 56-64.
11. М. А.Дроница, Л. П.Ревина, Л. И.Костина, Л. А.Ганушкина, И. А.Залуниин, Г. Г.Честухина Биохимия, 71, 2, 173 – 181 (2006).
12. О.Н.Lowry, N.J.Rosenbrough, A.L.Farr, R.T.Randall, J. Biol. Chem, 193, 265 – 275 (1951).
13. Методические указания по определению микроэлементов в почвах, кормах и растениях методом атомно-абсорбционной спектроскопии. – М.: ЦИНАО, 1985. – 96 с.
14. Писарева Л.Н. Цитология. 10. 988-994 (1968).
15. Н.А. Плохинский Математические методы в биологии // - М.: МГУ, 1978. - 265 с.
16. Ю.В.Наточин, Р.Г.Парнова // Ж.. эвол. биохим. Физиол, 22, 594 – 595 (1886).
17. J.C. Skou, Physiol. Rev. 45, 596 – 617 (1965).
18. R.W. Albers, Ann. Rev. Biochem. 36, 727–756 (1967).
19. G.A. Kimmich, Biochem. 9, – P. 3669-3677 (1970)
20. R.O. Turbeck, S. Nedergaard, H. Kruse, Biochim. Biophys. Acta. 163, 354–361 (1968).