

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

ДЕЙСТВИЕ ДЕЛЬТА-ЭНДОТОКСИНА *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR. *SOTTO* НА ДЫХАТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ И СИНТЕЗ АТФ В КЛЕТКАХ КУЛЬТУРЫ *HeLa*

Ключевые слова: дельта-эндотоксин, *Bacillus thuringiensis*, культура раковых клеток, окислительный синтез АТФ, дыхание клеток.

Изучено действие дельта-эндотоксина *B. thuringiensis* var. *sotto* 617 на дыхательную активность и синтез АТФ (окислительное фосфорилирование) в клетках культуры *HeLa* (рака шейки матки человека). Установлена зависимость величины вызываемого дельта-эндотоксином эффекта от его концентрации и времени воздействия на респираторную активность клеток. При этом, чем большей была концентрация токсина, тем раньше наблюдали начальное стимулирование и последующее угнетение потребления клетками кислорода. Показано, что наряду с первоначальным стимулированием поглощения кислорода наблюдается значительное снижение синтеза АТФ. Наиболее полно этот эффект выражается в изменении коэффициента фосфорилирования P/O , значение которого снижалось в зависимости от времени воздействия дельта-эндотоксина в концентрации 100 мкг/мл в 10,5-38 раза.

Keywords: delta-endotoxin, *Bacillus thuringiensis*, culture of cancer cells, the oxidative ATP synthesis, cell respiration.

The effect of delta-endotoxin of *B. thuringiensis* var. *sotto* 617 on the respiratory activity and the synthesis of ATP (oxidative phosphorylation) in cell culture *HeLa* (human cervical cancer) has been studied. The dependence of size of the caused delta-endotoxin effect on the concentration and time of exposure on the respiratory activity of the cells. In this case, the greater the concentration of the toxin, the earlier observed the initial stimulation and subsequent inhibition of oxygen consumption by cells. It is shown that, together with the initial stimulation of oxygen uptake, there has been a significant decrease in ATP synthesis. This effect is most fully expressed in the coefficient of phosphorylation of the P/O , the value of which is reduced by the time of action of delta-endotoxin concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 10,5-38 times.

Введение

Спорообразующая кристаллофорная бактерия *Bacillus thuringiensis*, поражающая многие виды насекомых, используется 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, который обуславливает комплекс патологических проявлений, возникающих под его воздействием в различных клеточных культурах. Установлено, что строение и химические свойства токсинов разного происхождения имеют значительное сходство [2]. 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]. Однако известно, что такие каналы обладают сродством к самим токсичным полипептидам или их фрагментам в 20-30 раз более высоким, чем к электролитам [4]. 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 [5].

В доступной литературе имеется очень сведений, касающихся механизма действия дельта-эндотоксина на раковые клетки. Вместе с тем есть основания полагать, что механизмы действия на клетки насекомых и раковые клетки имеют общие черты.

Целью настоящей работы являлось изучение действия дельта-эндотоксина *B. thuringiensis* var. *sotto* 617 на дыхательную активность и синтез АТФ (окислительное фосфорилирование) в клетках культуры *HeLa* (рака шейки матки человека).

Постановка задачи

В работе использовали штамм 617 подвида *B. thuringiensis* subsp. *sotto*, полученный из ФГУП ГосНИИ Генетики и селекции промышленных микроорганизмов. Данный подвида продуцирует дельта-эндотоксин, токсичный для чешуекрылых (патотип А) и кодируемый генами *Cry I* - класса [6]. Поверхностное 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 [7].

При этом кристаллы переходили в водную фазу, из которой их осаждали центрифугированием. Щелочную экстракцию дельта-эндотоксина выполняли по методу Кукси [8]. 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 M_r 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 (M_r 150 кДа), трансферрин (M_r 80-90 кДа), альбумин (M_r 67 кДа), цитохром с (M_r 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 [9]. Уровень белка определяли по методике Лоури [10].

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 [11].

Для определения скорости фосфорилирования (образования АТФ) устанавливали снижение количества неорганического фосфата в инкубационной среде. Для этого через определенные промежутки времени, равные тем, через которые регистрировали интенсивность дыхания, к инкубационной среде состава, описанного выше, добавляли 1 мл 10% ТХУ [12]. Концентрацию Рн регистрировали на спектрофотометре марки СФ-26 ЛОМО отечественного производства в кюветах 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 Рн.

Поглощение кислорода изучали микроанометрическим методом в аппарате Баркрофта по изменению давления газа в замкнутом пространстве [13]. Среда для изучения интенсивности дыхания содержала в конечном объеме 3 мл: 1 мл суспензии клеток; 0,1 мл раствора гексокиназы (20 Е/мл) в 2% глюкозе; 0,1 мл 1 М глюкозы и 0,1 мл раствора, содержащего 0,3 мМ MgCl₂; 0,3 мМ ЭДТА; 1 мМ сукцината; 10 мкМ Na-ортофосфат-HCl-буфера, pH 7,4 [14]. Выражали в

процентах от нормального уровня. Контролем служила суспензия клеток без добавления токсина.

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].

Результаты и обсуждение

Известно, что для веществ, проявляющих способность разобщать процессы клеточного дыхания и окислительного синтеза АТФ, характерно начальное (в первые минуты действия разобщителя) стимулирование дыхания наряду со снижением интенсивности синтеза АТФ с последующим угнетением обеих функций [16].

Нами было выполнено изучение влияния дельта-эндотоксина на дыхание и окислительное фосфорилирование в клетках чувствительной к дельта-эндотоксину культуры HeLa. Для установления факта начального стимулирования дыхания было предпринято измерение параметров в период между 1 и 5 мин инкубации. Результаты представлены на рисунке 1.

Полученные данные демонстрируют, что из использованных концентраций дельта-эндотоксина максимальное стимулирование поглощения кислорода клетками в течение первой минуты действия отмечено для 150 и 100 мкг/мл. Концентрация 150 мкг/мл вызывала стимулирование на 74% через. Далее в течение 5 мин следовало быстрое снижение дыхательной активности до величины ниже контрольной (67%). При концентрации токсина 100 мкг/мл начальное стимулирование дыхания на 51% далее снижалось, достигая к 5 мин 38%. Очевидно, что при концентрациях, превышающих 150 мкг/мл, поглощение O₂ усиливается в периоды времени намного меньше 1 мин и не можем быть зарегистрировано с использованием имеющиеся в распоряжении методики.

При концентрации токсина 50 мкг/мл нами зарегистрирован незначительно нарастающий во времени эффект 4 и 15 % через 1 и 5 мин, соответственно. В случае 20 мкг/мл вообще не удалось зарегистрировать эффекта. Вероятно, это связано с разрешающей способностью метода определения, ввиду малой величины изменения параметра.

Полученные данные указывают на зависимость действия дельта-эндотоксина от его концентрации и времени воздействия на респираторную активность клеток. При этом, чем больше концентрация токсина, тем раньше наблюдается начальное стимулирование и последующее угнетение потребления клетками кислорода.

С целью дальнейшей конкретизации механизма была изучена временная последовательность описанных выше явлений. Для этого были выбраны две концентрации эндотоксина (100 и 50 мкг/мл), которые вызывают умеренный

разобщающий эффект, а следовательно позволяют охватить более значительный промежуток времени. Параллельно измеряли уровень продукции АТФ и рассчитывали коэффициент фосфорилирования (Р/О). Известно, что в дышащих митохондриях скорость переноса электронов в дыхательной цепи, а следовательно, и скорость синтеза АТФ, определяется в первую очередь относительными концентрациями АДФ, АТФ и Φ_n (неорганического фосфата) в окружающей среде, а не концентрациями субстратов дыхания, например, пирувата. В условиях избытка субстрата дыхания скорость этого процесса тем выше, чем выше концентрация АДФ и Φ_n и ниже – АТФ. Это явление носит название дыхательного (акцепторного) контроля. Математически это выражается отношением Р/О, где Р представляет концентрацию АДФ.

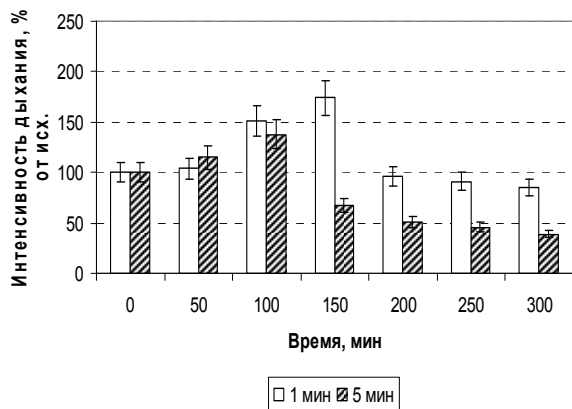


Рис. 1 – Влияние дельта-эндотоксина на потребление кислорода клетками HeLa

В условиях эксперимента на интактных митохондриях при постоянстве начальных концентраций АДФ и Φ_n в окружающей среде убыль концентрации АДФ пропорциональна приросту Φ_n , что и будет являться мерой скорости синтеза АТФ в митохондрии [17]. На графиках, представленных на рис. 2 и 3 и таблице 1 представлены данные о влиянии дельта-эндотоксина в концентрациях 50 и 100 мкг/мл на потребление кислорода, синтез АТФ (через изменение концентрации Φ_n в среде инкубации) и отношение Р/О в различные моменты времени после начала инкубации с токсином в течение 30 мин. Из графика, представленного на рисунке 2, видно, что эффект начального стимулирования поглощения кислорода в течение первых 10 мин воздействия дельта-эндотоксина утрачивается к 15 мин его воздействия. При этом как стимулирование, так и угнетение потребления кислорода митохондриями пропорциональны концентрации токсина. Начальное стимулирование под действием концентрации 100 мкг/мл через 1 мин воздействия составляло около 51 % от исходной величины, тогда как концентрация 50 мкг/мл стимулирования не вызвала. Скорость же снижения поглощения кислорода более значительна в случае концентрации 100 мкг/мл по сравнению с 50. Так, уже через 10

мин воздействия она практически возвращалась к норме, тогда как для 50 мкг/мл оставалась на 6 % выше нормы. В конечный момент эксперимента (60 мин) эти значения составили 4 и 48 % от контроля, соответственно. Уровень поглощения O_2 митохондриями в норме, при этом составлял $15-16 \text{ мкМ}/10^5$ клеток в 1 мин.

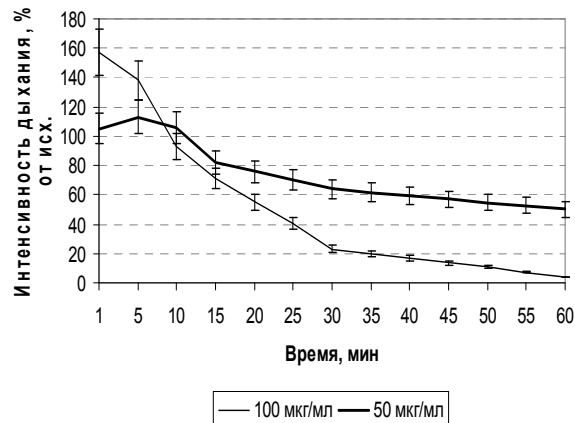


Рис. 2 – Изменение потребления кислорода клетками HeLa под действием дельта-эндотоксина

На рис. 3 представлены данные, демонстрирующие изменение прироста Φ_n в инкубационной среде под действием изучаемых концентраций дельта-эндотоксина во времени. Уже в первую минуту воздействия эндотоксина происходит резкое снижение потребления АДФ и неорганического фосфата, а следовательно и синтеза АТФ. Так концентрация 100 мкг/мл снижает этот показатель почти в 5,4, а 50 мкг/мл - в 2,9 раз. В течение первых 10 мин синтез АТФ постепенно снижается до 7,2 и 4 раза, соответственно, а затем резко падает через 15 мин в 22 и 11,4 раза, соответственно. Через 60 мин инкубации при концентрации токсина 100 мкг/мл потребление АДФ практически полностью прекращается (составляет 0 %). А при концентрации токсина 50 мкг/мл составляет всего 0,4 % от нормы, что также соответствует практически полному прекращению потребления АДФ клетками.

Результаты показывают, что наряду с первоначальным стимулированием поглощения кислорода (рис.2) наблюдается значительное снижение синтеза АТФ. Наиболее полно этот эффект выражается в изменении коэффициента фосфорилирования Р/О (табл. 1).

Как показывают данные таблицы 1, значение Р/О заметно снижается в 10,5-38 раза в случае использования дельта-эндотоксина в концентрации 100 мкг/мл и в 2 -9,5 раза – 50 мкг/мл. С учетом того, что дыхание в течение первых 10 мин остается даже более интенсивным, чем в норме, следует констатировать, что произошло разобщение процессов окислительного фосфорилирования и дыхания. Причем наиболее вероятно его действие как переносчика протонов.

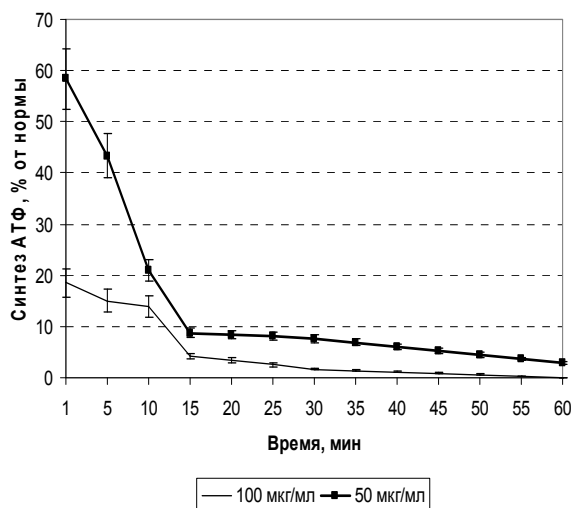


Рис. 3 – Изменение концентрации Фн в инкубационной среде под действием дельта-эндотоксина на клетки HeLa

В свете современных представлений [16] H^+ -АТФаза рассматривается как ферментная система, ответственная и за гидролиз АТФ и за его синтез. Гидролиз АТФ осуществляется с внешней стороны внутренней «сопрягающей» мембраны митохондрии, затем происходит активный транспорт протона из матрикса наружу, через протонный канал H^+ -АТФазы. Это является движущей силой для синтеза на внутренней поверхности мембраны молекулы АТФ. Одновременно происходит перенос (антипорт) АТФ из матрикса и АДФ и F_n в матрикс, при этом роль антипортера выполняет сама H^+ -АТФаза и сопряженные с нею белковые каналы и переносчики.

С точки зрения этих представлений ясно, что блокирование работы H^+ -АТФазы приводит в конечном итоге к утрате способности транспортировать АДФ в матрикс и АТФ из него. Очевидно, этот процесс заканчивается уже в первые 10 мин воздействия токсина, что в дальнейшем вызывает деэнергизацию митохондрий, а следовательно и клетки, и всю последующую цепь событий, важнейшим из которых является нарушение транспорта ионов и неэлектролитов в клетке.

Полученные нами результаты подтверждаются данными ряда других авторов, которые в случае клеток кишечного эпителия насекомых не только отмечали стимулирование поглощения кислорода митохондриями с одновременным снижением синтеза АТФ и Р/О в результате действия дельта-эндотоксина, но и проводили аналогию между его действием и влиянием 2,6-динитрофенола, для которого однозначно установлена роль разобщителя типа протонного ионофора [10]. Эффект начального стимулирования дыхания является компенсаторной реакцией, связанной с разобщением. Ингибирование синтеза АТФ клетки кишечного эпителия насекомых под влиянием дельта-эндотоксина *B. thuringiensis*

отмечался так же в ряде других работ [18-20].

Таблица 1 – Влияние дельта-эндотоксина на интенсивность дыхания и синтез АТФ клетками HeLa

Концентрация токсина, мкг/мл	Эффект	1 мин	5 мин	10 мин	15 мин	30 мин	60 мин	Норма (в отсутствие токсина)
100	потребление O_2	$2,28 \pm 0,26$ ***	$1,88 \pm 0,25$	$1,60 \pm 0,08$	$1,20 \pm 0,16$ ***	$0,40 \pm 0,09$ ***	$0,06 \pm 0,02$ ***	$1,70 \pm 0,27$
	синтез АТФ	$0,53 \pm 0,07$ ***	$0,43 \pm 0,06$ ***	$0,40 \pm 0,08$ ***	$0,13 \pm 0,03$ ***	$0,05 \pm 0,02$ ***	0	$2,86 \pm 0,08$
	Р/О	$0,23 \pm 0,03$ ***	$0,23 \pm 0,03$ ***	$0,25 \pm 0,03$ ***	$0,11 \pm 0,01$ ***	$0,13 \pm 0,02$ ***	0	1,68
50	потребление O_2	$1,69 \pm 0,08$	$1,88 \pm 0,19$	$1,80 \pm 0,21$	$1,40 \pm 0,15$	$1,10 \pm 0,26$	$0,82 \pm 0,12$ **	$1,70 \pm 0,27$
	синтез АТФ	$1,67 \pm 0,17$ ***	$1,29 \pm 0,06$ ***	$0,77 \pm 0,08$ ***	$0,25 \pm 0,09$ ***	$0,22 \pm 0,03$ ***	$0,08 \pm 0,03$ ***	$2,86 \pm 0,08$
	Р/О	$0,99 \pm 0,06$ ***	$0,66 \pm 0,04$ ***	$0,43 \pm 0,03$ ***	$0,18 \pm 0,01$ ***	$0,20 \pm 0,01$ ***	$0,10 \pm 0,01$ ***	1,68

Примечание: Р/О – величина безразмерная

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ N 12-04-01226а.

Литература

1. Юдина, Т.Г. Действие дельта-эндотоксинов четырех подвидов *B. thuringiensis* на различных прокариот / Т.Г.

- Юдина, Л.И. Бурцева // Микробиология.- 1997.-Т.66.- №1.-С.25-31.
2. *Chestukhina, G.G.* The main features of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin structure / G.G.Chestukhina, L.I.Kostina, A.L.Mikhailova, S.A.Yurin, F.S.Klepikova, V.M.Stepanov // Arch. Microbiol.-1982.-V.132. - P.159-162.
3. *Carroll, J.* An analysis of *Bacillus thuringiensis* endotoxin action on insect midgut membrane permeability using a light scattering assay / J.Carroll, D.J. Ellar // Eur. J. Biochem.- 1993.- V.214.- P.771-778.
4. *Кагава, Я.* Биомембраны / Я Кагава // М.: Высшая школа, 1985.- 303 с.
5. *Каменек, Д.В.* Дельта-эндотоксин *Bacillus thuringiensis* как природный ионофор: анализ методами ИК- и ЯМР-спектроскопии / Д.В. Каменек, О.Н. Ильинская, Л.М. Цофина, Л.К. Каменек // Ученые записки Казанского государственного университета, Сер. Естественные науки. – 2008.- Т. 150.- Кн. 1.- С. 69-76.
6. *Höfte, H.* Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* delta - endotoxins determined by compilation analysis / H.Höfte, H.Whiteley // J. DNA Sequens. Mapp. - 1990. - V. 1. - P. 97 -106.
7. *Pendleton, I.R.* Separation of the spores and crystals of *Bacillus thuringiensis* / I.R.Pendleton, R.B.Morrison // Nature. -1966. -V.212. - P.228-229.
8. *Cooksey, K.E.* Purification of a protein from *Bacillus thuringiensis* toxic to a larvae of Lepidoptera / K.E. Cooksey // Biochem.J. - 1968. - V.106. - P. 445 - 454.
9. *Дронина, М.А.* Токсинсвязывающие белки из мембран кишечного эпителия личинок *Anopheles stephensi* / М. А.Дронина, Л. П.Ревина, Л. И.Костина, Л. А.Ганушкина, И. А.Залунин, Г. Г.Честухина //Биохимия.-2006.-Т.71.- В. 2.-С. 173 – 181.
10. *Lowry, O.H.* Protein measurement with Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, R.T. Randall // J. Biol. Chem. – 1951. –V.193.-P. 265 – 275.
11. *Фрешни, Р.* Культура животных клеток. Методы / Р. Фрешни // М.: Мир, 1989.- 318 с.
12. *Travers, R.* Effects of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* δ -endotoxin on isolated lepidopteran mitochondria / R. Travers, R. Faust, C.F. Reichelderfer // J. Invertebr. Pathol. – 1976 b. – V.28. – P. 351-356.
13. *Умбрейт, В.В.* Манометрические методы изучения тканевого обмена / В.В. Умбрейт, Р.Х. Буррис, Дж.Ф. Штауффер // – М.: Изд-во ИЛ., 1951. – 359 с.
14. *Каменёк, Л.К.* Антибактериальное действие дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis* как потенциального агента защиты растений / Л.К. Каменёк, Т.А. Левина, Д.А. Терехин, Л.Д. Миначева // Биотехнология. – 2005. – №1. – С. 59–67.
15. *Плохинский, Н.А.* Математические методы в биологии / Н.А. Плохинский // - М.: МГУ, 1978. - 265 с.
16. *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.
17. *Скулачев, В.П.* Механизм окислительного фосфорилирования и некоторые общие принципы биоэнергетики / В.П. Скулачев // Успехи соврем. биологии. – 1974. – Т. 77. – В.2. – С. 125-154.
18. *Каменек, Д.В.* Действие дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis* var. *sotto* на ионный транспорт в клетках культуры *HeLa* / Д.В. Каменек, О.Н. Ильинская, Е.В. Никитина, Л.К. Каменек // Вестник Казанского технологического университета.- 2013.- Т.16, № 4.- С.195-198.
19. *Faust, R.* Preliminary investigations on the molecular mode of action of the δ -endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* var. *alesti* / R. Faust, R. Travers, G. Hallam // J. Invertebr. Pathol. – 1974 b. – V.23. – P. 259-26
20. *Prasad, S.S.* Biochemistry and biological activities of the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis* / S.S. Prasad, Y.I. Shethna // J. Sci. Ind. Res. – 1976. – V.35. – P. 626-632.

© **Д. В. Каменек** - к.б.н., ст. препод. каф. общей и биологической химии Ульяновского госуд. ун-та, KamenekVM@ulsu.ru; **О. Н. Ильинская** - д.б.н., проф., зав. каф. микробиологии К(П)ФУ, olga.ilinskaya@ksu.ru, **Е. В. Никитина** - к.б.н., доц. каф. технологии пищевых КНИТУ, ev-nikitina@inbox.ru; **Л. К. Каменек** - д.б.н., профессор, зав. каф. общей и биологической химии Ульяновского госуд. ун-та.