

БИОХИМИЯ

УДК 576.32/.36

**КОНЦЕНТРАЦИЯ ТОКСИНОВ
В ЭНДОСОМАЛЬНОМ КОМПАРТМЕНТЕ КЛЕТОК,
ПРЕДОБРАБОТАННЫХ РИЦИНОМ И ВИСКУМИНОМ**

Ш.Ю. Хапчаев, С.С. Гутор*, И.П. Каминский*, Е.Э. Кремер*,
С.В. Кривощёков*, И.В. Мильто*, А.Г. Першина*, И.В. Петрова*,
И.В. Салтыкова*, Н.С. Субботина*, К.В. Хворилова*

(кафедра иммунологии; e-mail: shamikosha@mail.ru)

Получены данные об объеме внутриклеточного компартмента, в котором находится интернализированный токсин, и концентрации токсина в нем. Сделаны предположения о роли агрегатов из молекул токсинов в транслокации А-цепи в цитозоль, приводящей к гибели клеток.

Ключевые слова: *рицин, вискумин, конфокальная микроскопия, моноклональные антитела.*

Растительные токсины рицин (R60) и вискумин (MLI) имеют сходное строение и состоят из двух субъединиц, одна из которых обладает лектиновой активностью и играет ключевую роль в связывании токсина с клеткой, а вторая обладает токсической активностью. Большая часть интернализированного токсина через ранние эндосомы возвращается к клеточной поверхности [1]. Минорная же часть интернализовавшихся молекул через аппарат Гольджи (АГ) транспортируется в эндоплазматический ретикулум (ЭР) и далее попадает в цитозоль, где инактивирует рибосомы [2]. Показана необходимость разделения субъединиц токсинов для транслокации в цитозоль [3]. Наличие рицина в раннеэндосомальном компартменте позволяет предположить, что там же может происходить и восстановление дисульфидной связи, приводящее к транслокации свободной А-субъединицы в цитоплазму. Самопроизвольное восстановление возможно только при высокой концентрации токсина в данном компартменте. Для вычисления концентрации необходимо знать объем, который занимает известное количество токсина. В данной работе мы посчитали объем компартмента, в котором детектируются молекулы токсинов. Анализ компартментов, в которых выявляются молекулы токсинов, может внести существенные изменения в современные представления о транспорте токсинов и может быть использован при синтезе иммунотоксинов.

Материалы и методы**Токсины**

Рицин (R60) выделяли из семян клещевины (*Ricinus communis*), а вискумин (MLI) — из листьев

омелы белой (*Viscum album*). Токсины очищали в соответствии с описанной методикой [4, 5].

**Получение моноклональных
антител против рицина**

Мышей линии Balb/c (НИИ биомоделей РАМН, Россия) иммунизировали RTA и R60 по различным схемам [6]. Титр антител в сыворотках контролировали при помощи твердофазного иммуноферментного анализа (ТИФА). Слияние спленоцитов с миеломой линии sp2/0 проводили на третий день после бустерной иммунизации. Миелому выращивали на среде RPMI 1640 (Sigma, США), первичные гибридомы — на среде NAT (Sigma, США). Супернатанты скринировали при помощи ТИФА с биотинилированными R60, RTA и RTB в растворе. Отобранные гибридомы многократно клонировали методом лимитирующих разведений. Моноклональные антитела накапливали в асцитной жидкости и выделяли методом аффинной хроматографии на протеин А-сепарозе (Pharmacia, Sweden).

Получение флуоресцентных конъюгатов

Очищенные токсины конъюгировали с флуорохромами для их визуализации методами конфокальной микроскопии. Для этого сухой флуоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ) разводили в ДМСО до концентрации 100 мг/мл. Белки переводили в карбонатный буфер (pH 9,0), содержащий 1 М NaHCO₃, 20 mM лактозу, и концентрировали до содержания 2 мг/мл. Затем смешивали растворы белка в карбонатном буфере и ФИТЦ в ДМСО так, чтобы избыток ФИТЦ составлял для рицина 25-кратный молярный избы-

* ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России.

ток, для вискумина — 20-кратный молярный избыток. Инкубировали с перемешиванием 24 ч при комнатной температуре. С помощью гель-фильтрации на колонке PD10 с сорбентом Sephadex G25 очищали пробы от несвязавшегося с белком ФИТЦ. Переводили белок в ФСБ (рН 7,4). Количество групп ФИТЦ, внесенных в одну молекулу белка, было оценено по следующей формуле: $\text{Моль ФИТЦ} / \text{Моль белка} = 2,87 \cdot \text{ОП495} / [\text{ОП280} - \text{ОП495} \cdot 0,35]$, где ОП — оптическая плотность при соответствующей длине волны. Соотношение количества красителя к количеству белка составило для рибина — 4,2; для вискумина — 3,3.

Биотинилирование белков

Белки конъюгировали с биотинамид-N-гидросукцинимидным эфиром в соответствии с рекомендациями производителя (Sigma, США). Биотинамид-N-гидросукцинимидный эфир растворяли в ДМСО (10 мг/мл) и добавляли к моноклональным антителам, растворенным в ФСБ. Инкубировали в течение 1 ч при +37°C и в течение 15 ч при +4°C. Концентрация белков составляла не менее 0,3 мг/мл, молярное соотношение белок/биотин — 1/20. Реакцию останавливали 0,01% NaN_3 . От несвязавшегося с белком биотинамид-N-гидросукцинимидного эфира избавлялись с помощью гель-фильтрации на Sephadex G25. Белок элюировали с колонки ФСБ. Качество биотинилирования оценивали с помощью твердофазного иммуноферментного анализа.

Определение концентрации R60 в лизатах клеток, преобработанных R60

Клетки линий С6 и 3Т3 выращивали на чашках Петри 3 сут, после чего добавляли 1 мкг/мл R60 и инкубировали при 37°C и 6% CO_2 в течение различных временных интервалов. Затем клетки отмывали от несвязавшегося токсина холодным раствором лактозы и механически снимали с пластика. Полученную взвесь центрифугировали (7 мин, 1500 об/мин). Супернатанты отбирали в новые пробирки, а осадок ресуспендировали в 350 мкл лизирующего раствора (0,1 М NaCl, 10 мМ Na_2HPO_4 , 1% Triton X-100 и 1 мМ PMSF, рН 7,4), инкубировали при 4°C 20 мин и центрифугировали 10 мин при 5000 об/мин [7].

Тест-систему 1RK2/2RK1bi [6, 8] использовали для определения концентрации R60. В качестве контроля использовали лизаты клеток соответствующих линий, не обработанных токсинами. При построении калибровочных кривых использовали данные для R60, разведенного на среде культивирования соответствующих линий клеток.

Получение и дальнейший анализ изображений

Изображения были получены на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе (Axiovert 200M

510 Meta, Zeiss, Германия). Серии оптических срезов получали либо с одного из каналов, либо синхронно с двух. Установку размеров pinhole для получения изображений с высоким разрешением проводили согласно рекомендациям производителей системы. Дальнейшую обработку выполняли с помощью программного обеспечения. Для получения изображений использовали объективы Plan-Neofluar 40x/1,3 Oil Dic, Plan-Apochromat 63x/1,4 Oil Dic и Plan-Apochromat 100x/1,4 Oil. Настройки лазеров и анализирующих фильтров, рекомендованные производителем, подбирались индивидуально для каждого красителя. Диаметр пинхола (pinhole) — 1 диск Эйри (Airy unit), дающий оптимальное соотношение сигнала к шуму. Анализ проводили, используя программное обеспечение Zeiss LSM 510Meta Software release 3.2, ImageJ 1.39q, AutoQuant 9.3 и Adobe Photoshop CS2.

Результаты

Активность каталитической субъединицы РИБ2 очень высока, поэтому для гибели клетки может быть достаточно одной молекулы токсина, попавшего в цитозоль [9]. Столь малое содержание токсина, необходимое для остановки синтеза белка, приводит к еще одному результату: в момент остановки белкового синтеза большая часть внутриклеточного токсина все еще находится в ранних эндосомах [10]. На фоне этого количества токсина, непосредственно не участвующего в дегликозилировании рибосом, выявить фракцию, вовлеченную в остановку синтеза белка, чрезвычайно тяжело.

В то же время исследование этой минорной фракции важно для выявления как клеточных компартментов, в которых восстанавливается дисульфидная связь, так и молекулярных механизмов, задействованных в ее восстановлении. Определение места, где происходит высвобождение свободной А-субъединицы, позволит показать компартменты, из которых происходит ее транслокация в цитозоль, и определить внутриклеточные пути транспорта токсинов, приводящие к гибели клеток.

Анализ объема везикул, содержащих рибин

Для определения объема везикул, содержащих рибин, были получены наборы оптических срезов. Клетки инкубировали с токсином, конъюгированным с ФИТЦ, и анализировали на конфокальном микроскопе, после чего создавали трехмерную реконструкцию.

Анализ общего объема везикул не может быть выполнен микроскопическими методами. Ограничения, налагаемые оптическим разрешением прибора, позволяют установить только объем, больше которого объект быть не может, при этом минимальные размеры могут сильно варьироваться. Этот факт объясняется тем, что объекты, реальные размеры которых

меньше разрешения прибора, будут регистрироваться оптической системой как равные разрешению.

Более точная картина создается при программной обработке полученных изображений, называемой деконволюцией [11]. Общий принцип деконволюции — математический анализ функции распределения точки, позволяющий добиться более четких изображений и частично исправить ошибки, возникающие при получении изображений. Таким образом деконволюция дает более корректные размеры анализируемого объекта. При этом данный метод не дает возможности корректировать все погрешности изображения, хотя и приводит к более точным результатам.

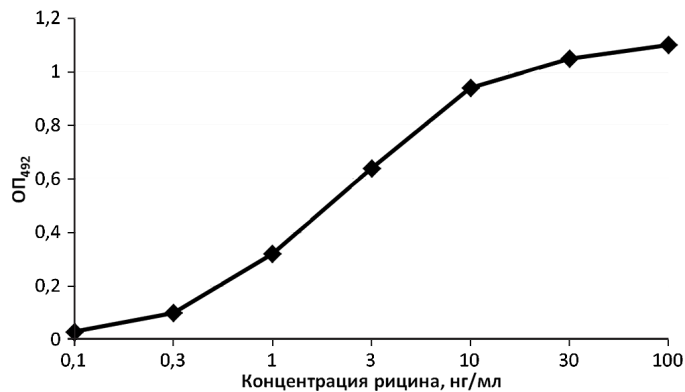
Изображения для анализа были получены с разрешением, при котором реальные размеры пикселя составляют 60 нм. Расстояние между двумя соседними оптическими слоями составило 100 нм. Данные цифры подобраны специально, чтобы размеры полученных вокселей (псевдообъемных единиц изображения) были меньше разрешения оптического микроскопа. Такое избыточное разрешение необходимо для корректного анализа при деконволюции.

Необработанные данные имели реальное разрешение около 220 нм, однако апертура использованного объектива (1,4) после деконволюции позволяет получить виртуальное разрешение ≈ 140 нм. После обработки в программе AutoQuant 9.3 был проанализирован общий объем флуоресцирующих везикул.

Анализируемый объем после деконволюции составляет 215 ± 40 мкм³, что почти в 3 раза меньше, чем объем везикул, полученный с необработанных изображений. Объем компартмента с исходных изображений составил 540 ± 120 мкм³.

Количество рицина в клетках после обработки рицином

Для определения количества рицина в клетках использовали тест-систему на основе моноклональных антител 1RK2/2RK1-bi. Данная тест-система позволяет детектировать концентрацию рицина менее 1 нг/мл (рисунок). Клетки инкубировали с токсинами, конъюгированными с флуоресцентными красителями, как описано в методах. Через час инкубации среду культивирования забирали и определяли количество несвязавшегося в ней токсина, а клетки фиксировали для дальнейшего микроскопирования.



Концентрация рицина в клетках линий С6 и 3Т3 после 1 ч инкубации 1 мкг/мл

Количество токсина внутри клеток определяли как разницу между исходным количеством рицина и количеством в среде инкубирования.

Результаты, полученные в ТИФА, позволили определить среднее количество белка в клетке. Для этого общий объем флуоресцирующих везикул в одной клетке был разделен на среднее количество белка в пересчете на 1 клетку, полученное в ТИФА. Показано, что средняя концентрация токсина в везикулярном компартменте, содержащем токсин, составляет не менее $1,31 \cdot 10^{-7}$ М после деконволюции и не менее $5,25 \cdot 10^{-8}$ М в случае необработанных данных.

Для анализа вискумина использовали тест-систему на основе моноклональных антител MNA4 и MNA9, описанную ранее [12]. Результаты для вискумина оказались аналогичными результатам для рицина. Концентрация MLI в клеточном компартменте составляет примерно 10^{-7} М (данные не представлены).

Столь высокая концентрация токсинов в данном компартменте позволяет предположить возможность самопроизвольного восстановления дисульфидной связи в некоторых молекулах токсинов, а так же возможность приводить к образованию агрегатов, способных нарушить целостность мембраны, что в свою очередь может привести к транслокации А-субъединицы в цитозоль и вызвать остановку синтеза белка. Знание точных механизмов и путей транспорта РИБ2 может быть использовано при создании оптимального иммунотоксина, который можно будет использовать в терапии опухолевых заболеваний.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Moisenovich M., Tonevitsky A., Maljuchenko N., Kozlovskaya N., Agapov I., Volkmandt W., Bereiter-Hahn J. Endosomal ricin transport: involvement of Rab4- and Rab5-positive compartments // *Histochem. Cell Biol.* 2004. Vol. 121. P. 429—439.
2. Wesche J., Rapak A., Olsnes S. Dependence of ricin toxicity on translocation of the toxin A-chain from the endoplasmic reticulum to the cytosol // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. P. 34443—34449.
3. Венедиктова О.А., Попова Е.Н., Егорова С.Г., Демина И.А., Мойсенович М.М. Выявление свободной А-цепи рицина в супернатантах клеток, предобработанных нативным токсином // *Биотехнология*. 2005. Т. 6. С. 83—89.
4. Tonevitsky A., Agapov I., Chelnokova O., Moisenovich M., Marx U. Comparison between the mechanisms of action of plant toxins ricin and viscumin on the stage of intracellular dissociation // *Arzneimittelforschung. Drug Research*. 2002. Vol. 52. P. 500—505.

5. Franz H., Ziska P., Kindt A. Isolation and properties of three lectins from mistletoe (*Viscum album* L.) // Biochem. J. 1981. Vol. 195. P. 481–484.

6. Попова Е.Н., Ханчаев Ш.Ю., Егорова С.Г., Демина И.А., Венедиктова О.А., Агапов И.И., Мойсенович М.М. Мышиные моноклональные антитела против рицина не реагируют с агглютинином рицина // Рос. иммунол. журн. 2007. Т. 1(10). № 3–4. С. 59–65.

7. Iversen T.G., Skretting G., Llorente A., Nicoziani P., van Deurs B., Sandvig K. Endosome to Golgi transport of ricin is independent of clathrin and of the Rab9- and Rab11-GTPases // Mol. Biol. Cell. 2001. Vol. 12. P. 2099–2107.

8. Ханчаев Ш.Ю. Особенности внутриклеточного транспорта и биологическая активность рицина: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.25. М., 2009.

9. Barbieri L., Battelli M.G., Stirpe F. Ribosome-inactivating proteins from plants // Biochim. Biophys. Acta. 1993. Vol. 1154. P. 237–282.

10. Moisenovich M., Tonevitsky A., Agapov I., Niwa H., Schewe H., Bereiter-Hahn J. Differences in endocytosis and intracellular sorting of ricin and viscumin in 3T3 cells // Eur. J. Cell Biol. 2002. Vol. 81. P. 529–538.

11. Wallace W., Schaefer L.H., Swedlow J.R. A working-person's guide to deconvolution in light microscopy // Bio-techniques. 2001. Vol. 31. P. 1076–1078, 1080, 1082.

12. Ханчаев Ш.Ю., Агапов И.И., Мойсенович М.М., Рамонова А.А., Богородский С.Э., Мусаэлян И.С., Понов В.К. Цитотоксическая активность вискумина, инкапсулированного в полилактидную матрицу с помощью сверхкритического диоксида углерода // Биотехнология. 2008. Т. 5. С. 43–49.

Поступила в редакцию
22.04.13

TOXIN CONCENTRATIONS IN THE ENDOSOMAL COMPARTMENT OF CELLS PRETREATED WITH RICIN AND VISCUMIN

Sh.Yu. Khapchaev, S.S. Gutor, Y.P. Kamynsky, E.E. Cremer,
S.V. Kryvostechov, I.V. Mylto, A.G. Perschina, I.V. Petrova,
I.V. Saltycova, N.S. Subbotina, K.V. Kchvorylova

We estimated the volume of an internalized toxin containing intracellular compartment and assessed the toxin concentration therein. We hypothesize a role for toxin aggregates in a lethal-to-cell translocation of A-chain to cytosol.

Key words: ricin, viscumin, confocal microscopy, monoclonal antibody.

Сведения об авторах

Ханчаев Шамиль Юсуфович — канд. биол. наук, мл. науч. сотр. кафедры иммунологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-46-46; e-mail: shamikosha@mail.ru

Гутор Сергей Сергеевич — зав. лабораторией кафедры морфологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России. Тел.: 8-38-22-53-04-23; e-mail: info@cnilssmu.ru

Каминский Илья Петрович — канд. фарм. наук, мл. науч. сотр. центральной научно-исследовательской лаборатории ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России. Тел.: 8-38-22-42-64-41; e-mail: medicff@sibmail.com

Кремер Елена Эдуардовна — мл. науч. сотр. центральной научно-исследовательской лаборатории ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России. Тел.: 8-38-22-53-04-23; e-mail: elenakremer@yandex.ru

Кривощёков Сергей Владимирович — лаборант-исследователь ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России. Тел.: 8-38-22-52-98-32; e-mail: medicff@sibmail.com

Мильто Иван Васильевич — канд. биол. наук, доц. кафедры морфологии и общей патологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России. Тел.: 8-38-22-53-04-23; e-mail: milto_bio@mail.ru

Першина Александра Геннадьевна — канд. биол. наук, науч. сотр. центральной научно-исследовательской лаборатории ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России. Тел.: 8-38-22-53-04-23; e-mail: allysy@mail.ru

Петрова Ирина Валерьевна — канд. мед. наук, ст. науч. сотр. центральной научно-исследовательской лаборатории ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России. Тел.: 8-38-22-53-04-23; e-mail: irinavall@mail.ru

Салтыкова Ирина Владимировна — канд. мед. наук, мл. науч. сотр. центральной научно-исследовательской лаборатории ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России. Тел.: 8-38-22-53-04-23; e-mail: info@cnilssmu.ru

Субботина Наталья Сергеевна — мл. науч. сотр. центральной научно-исследовательской лаборатории ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России. Тел.: 8-38-22-53-04-23; e-mail: trav-r@mail.ru

Хворилова Ксения Владимировна — мл. науч. сотр. центральной научно-исследовательской лаборатории ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России. Тел.: 8-3822-53-04-23; e-mail: kseniahvorilova@gmail.com