

ЦЕНТР «БИОИНЖЕНЕРИЯ»  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Челнокова Ольга Викторовна

КОНФОРМАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ  
РАСТИТЕЛЬНЫХ ТОКСИНОВ  
В ХОДЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ТРАНСПОРТА.

03.00.04. - биохимия

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук,  
Тоневицкий Александр Григорьевич.

Москва-2002

## Оглавление.

Список сокращений: .....	4
Введение. ....	6
Глава 1. Обзор литературы. ....	8
1.1. Риксин и вискумин – представители растительных РИБ II типа.....	8
1.1.1. Структура каталитических субъединиц риксина и вискумина. ....	8
1.1.2. Структура связывающих субъединиц риксина и вискумина.....	10
1.1.3. Взаимодействие между субъединицами риксина и вискумина.....	14
1.2. Внутриклеточный транспорт белковых токсинов. ....	17
1.2.1. Связывание с мембраной: рецепторы для риксина и вискумина. ....	19
1.2.2. Интернализация токсинов внутрь клетки.....	20
1.2.3. Везикулярный транспорт белков в клетке.....	25
1.2.4. Прохождение токсинов через эндосомальные компартменты клетки. ....	29
1.2.5. Транспорт токсинов в аппарат Гольджи.....	32
1.2.6. Ретроградный транспорт токсинов в эндоплазматический ретикулум. ....	36
1.2.7. Транслокация токсинов. ....	40
Заключение .....	43
Глава 2. Материалы и методы. ....	45
2.1. Клетки. ....	45
2.2. Животные.....	45
2.3. Выделение риксина и его субъединиц из растения <i>Ricinus communis</i> .....	45
2.4. Выделение токсинов и их субъединиц из растения <i>Viscum album</i> . ....	46
2.5. Получение гибридом, продуцирующих антитела против А-субъединицы риксина. ....	48
2.6. Получение гибридом, продуцирующих антитела против В-субъединицы вискумина. ....	49
2.7. Получение и очистка антител. ....	49
2.8. Определение изотипа антител. ....	50

2.9. Биотинилирование белков. ....	50
2.10. Изучение взаимодействия антител с антигеном с помощью твердофазного иммуноферментного анализа.....	51
2.11. Конкурентный иммуноферментный анализ. ....	53
2.12. Сэндвич-ТИФА на основе полученных монАт.....	53
2.13. Оценка галактозо-связывающей активности токсинов.....	54
2.14. Диссоциация субъединиц рицина и вискумина под действием дитиотреитола. ....	54
2.15. Влияние монАт против MLB на взаимодействие вискумина и его В-цепи с асиалофетуином. ....	55
2.16. Клеточный ИФА. ....	55
2.17. Изучение рециклинга вискумина клетками TA71. ....	57
2.18. Влияние гуанидингидрохлорида на экспонирование эпитопа, узнаваемого антителами TA71. ....	58
2.19. Пептидный ТИФА. ....	58
2.20. Оценка цитотоксической активности токсинов.....	59
2.21. Бесклеточная система трансляции. ....	60
2.22. Электрофорез в системе Лэммли. ....	61
2.23. Иммуноблоттинг. ....	61
Глава 3. Результаты и обсуждение.....	63
3.1. Изучение механизма действия рицина и вискумина на стадии внутриклеточной диссоциации.....	63
3.2. Ингибирующее действие вискумина на гибридомы, синтезирующие антитела против его связывающей субъединицы. ....	74
3.3. Конформационные изменения А-субъединицы вискумина при внутриклеточной транслокации. ....	89
Выводы.....	107
Список литературы.....	108

## Список сокращений:

Arf - фактор ADP-рибозилирования (ADP-ribosylation factor)

ASF – асиалофетуин

CD-MPR - катион-зависимый М6Ф рецептор

CI-MPR - катион-независимый М6Ф рецептор

EGFR - рецептор эпидермального фактора роста

ERC - эндосомальный рециклинговый компартмент

GAP - GTPаза-активирующий белок

LDLR - рецепторы липопротеинов низкой плотности

MLA – А-субъединица вискумина

MLB – В-субъединица вискумина

MLI – вискумин, mistletoe lectin I токсин из омелы I

NSF - NEM sensitive protein

R60 - рицин

Rab-белки - ras-родственные GTP-азы

RTA – А-субъединица рицина

RTB - В-субъединица рицина

SNAP - soluble NSF attachment protein

SNARE - SNAP receptor, интегральные белки

TGN - сеть транс-Гольджи (trans-golgi network)

TR -трансферриновый рецептор

АГ - аппарат Гольджи

АР - адаптерные белки (adaptor proteins), адаптины

БСА - бычий сывороточный альбумин

БФА - брефелдин А

М6ФР - рецептор маннозо 6-фосфата

монАт - моноклональные антитела

МТТ – (3-[4,5,-диметилтиозолил-2-ил]-2,5-дифенил)-тетразолиум бромид

ПААГ - полиакриламидный гель

ПАФ – полный адъювант Фрейнда

ПЭГ - полиэтиленгликоль

РИБ II – рибосом-инактивирующие белки II типа

РСА – рентгено-структурный анализ

СОР-белки - белки коатомерного комплекса

ТИФА - твердофазный иммуно-ферментный анализ

ФСБ - фосфатно-солевой буфер

ЭР – эндоплазматический ретикулум

## Введение.

Белковые токсины растительного происхождения, относящиеся к группе рибосом-инактивирующих белков II типа (РИБ II), состоят из двух субъединиц: каталитической (А) и лектиновой (В). А-субъединица (active) обеспечивает цитотоксический эффект, а В-субъединица (binding) – связывание токсинов с рецепторами на поверхности клеток. Механизм действия РИБ II заключается в избирательном выщеплении остатка аденина из 28S-рРНК эукариот, результатом чего является остановка белкового синтеза. Токсины обладают высокой цитотоксической активностью для клеток млекопитающих - попадания одной молекулы в цитозоль достаточно, чтобы вызвать гибель клетки.

Процесс проникновения в клетку начинается со взаимодействия связывающей В-субъединицы с галактозосодержащими рецепторами, после чего происходит интернализация токсина внутрь клетки путем рецептор-опосредованного эндоцитоза. Затем токсин в составе везикул проходит эндосомальные компартменты клетки, аппарат Гольджи и достигает эндоплазматического ретикулума, где происходит его диссоциация на отдельные субъединицы. Конечной стадией транспорта является трансмембранный переход каталитической А-субъединицы токсина в цитозоль.

Интерес к токсинам вызван возможностью их практического применения. Высокое цитотоксическое действие РИБ II позволяет создавать на их основе цитостатики направленного действия для терапии, например, аутоиммунных и онкологических заболеваний. Повысить эффективность действия таких конъюгатов можно с помощью препаратов, изменяющих их внутриклеточный транспорт. При конструировании рекомбинантных иммунотоксинов необходимо учитывать данные о конформационных изменениях токсинов, в частности, во время трансмембранного перехода в цитозоль. Для А-субъединицы рицина было показано существование состояния «расплавленная глобула», которое предшествует транслокации токсина через мембрану внутриклеточных везикул [Argent et al., 2000]. Это состояние характеризуется частичным разворачиванием белка с последующим восстановлением нативной структуры в присутствии эукариотических рибосом *in vitro*. При разворачивании токсина экспонируются гидрофобные области, скрытые в нативной молекуле. Это может быть важным для выхода токсина из внутриклеточных компартментов в цитоплазму.

Способность каталитических субъединиц токсинов к трансмембранному переносу позволяет использовать их при создании противовирусных вакцин нового поколения в качестве вектора для доставки в цитоплазму различных пептидов. В результате необходимый пептид презентруется на поверхности клеток с помощью молекул главного комплекса гистосовместимости I класса. Это позволяет специфически активировать клеточный иммунный ответ организма, что важно для профилактики и лечения вирусных инфекций. Активированные цитотоксические Т-клетки способны взаимодействовать с любой клеткой, зараженной вирусом, и убивать ее.

Таким образом, изучение конформационных изменений каталитической субъединицы в ходе внутриклеточного транспорта и, в частности, перед трансмембранным переносом представляется важным аспектом изучения механизма действия токсинов на клетки.

Целью данной работы является изучение конформационных изменений вискумина и рицина в ходе внутриклеточного транспорта в клетках гибридом, продуцирующих антитела против этих токсинов. Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Получить гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела против А-субъединицы рицина. Охарактеризовать специфичность полученных антител. Изучить особенности внутриклеточного транспорта рицина и вискумина на стадии внутриклеточной диссоциации.
2. Получить гибридомы, синтезирующие моноклональные антитела против связывающей В-субъединицы вискумина. Изучить устойчивость данных гибридом к цитотоксическому действию вискумина.
3. Охарактеризовать конформационные изменения MLA в ходе внутриклеточной транслокации с помощью моноклональных антител против ненативной А-субъединицы вискумина (TA7 и TA71). С помощью синтетических фрагментов MLA картировать эпитопы, узнаваемые данными антителами.

## **Глава 1. Обзор литературы.**

### **1.1. Рицин и вискумин – представители растительных РИБ II типа.**

Многие растения содержат токсины, ингибирующие биосинтез белка в эукариотических клетках. Вискумин и рицин (молекулярная масса ~ 60 кДа) относятся к группе рибосом-инактивирующих белков II типа (РИБ II), которая включает другие родственные растительные белки, такие как абрин, модецин, mistletoe lectin II и III и другие, каждый из которых обладает сильной цитотоксической активностью в отношении клеток млекопитающих [Roberts and Lord, 1991]. Эти токсические белки состоят из двух полипептидных субъединиц, соединенных между собой дисульфидной связью. Каталитическая А-субъединица является N-гликозидазой, выщепляющей A<sub>4324</sub> из GAGA-последовательности в петле 28S-РНК большой (60S) субъединицы рибосомы эукариот [Endo et al., 1988]. Результатом ее действия является инактивация белок-синтезирующей системы клетки за счет неспособности модифицированной рибосомы связываться с фактором элонгации 2 [Barbieri L. et al., 1993]. В-субъединица обладает лектиновой активностью. Она связывается с рецепторами на клеточной поверхности и обеспечивает интернализацию токсина внутрь клетки.

#### **1.1.1. Строение каталитических субъединиц рицина и вискумина.**

Рицин является наиболее изученным представителем РИБ II типа. Это - 60 кДа гликопротеин, выделенный из семян растения Клещевина обыкновенной (*Ricinus communis*). Изолированная А-субъединица рицина (RTA) состоит из 267 аминокислот и содержит два сайта N-гликозилирования. Структура RTA была изучена в деталях с помощью рентгено-структурного анализа (РСА) с разрешением 2,3 Å. Анализ показал, что RTA является глобулой, по форме напоминающей удлиненный диск [Montfort et al., 1987; Weston et al., 1994]. В составе А-



субъединицы рицина можно выделить три домена. Домен I включает 117 N-концевых аминокислот и состоит в основном из  $\alpha$ -спиралей, домен II (118-210 аминокислотные остатки) содержит пять  $\beta$ -структур, домен III (211-267 аминокислотные остатки) содержит в основном  $\alpha$ -спираль и взаимодействует как с двумя другими доменами, так и с В-субъединицей.

Данные РСА свидетельствуют, что в построении активного центра RТА участвуют все три домена. Мутантные RТА, лишенные аминокислотных остатков 45-70 с COOH-конца или 19-40 остатков с NH<sub>2</sub>-конца, одинаково ферментативно не активны [Bradley et al., 1989]. Активный центр RТА содержит ряд консервативных аминокислотных остатков (Tyr<sup>80</sup>, Tyr<sup>123</sup>, Glu<sup>177</sup>, Arg<sup>180</sup>, Trp<sup>211</sup>), точечный мутагенез которых приводит к значительной или полной потере каталитической активности.

Аминокислотная последовательность А-субъединицы вискумина (MLA) включает 254 остатка [Soler et al., 1996]. MLA состоит из  $\alpha$ - и  $\beta$ -элементов вторичной структуры. Подобно А-цепи рицина, в составе А-субъединицы MLI можно выделить три домена. Домен I состоит из одного  $\alpha$ -спирального участка и семи  $\beta$ -тяжей. Второй домен содержит пять  $\alpha$ -спиральных участков. Третий домен содержит один  $\alpha$ -спиральный участок и два антипараллельных  $\beta$ -тяжа. Интересно, что, как описано выше, в А-субъединице рицина, имеющей также трехдоменное строение, в третьем домене отсутствуют  $\beta$ -тяжи [Верносова Е.А. и др., 1998]. MLA содержит один Cys<sup>247</sup>, участвующий в образовании дисульфидной связи с В-субъединицей. Внутренние дисульфидные связи в MLA отсутствуют. Данные РСА свидетельствуют, что в построении активного центра MLA, также как и RТА, участвуют все три домена. В активный центр входят аминокислоты: Tyr<sup>76</sup>, Tyr<sup>115</sup>, Glu<sup>165</sup>, Arg<sup>168</sup>, Trp<sup>199</sup>. Кроме того аминокислоты Asn<sup>74</sup>, Arg<sup>125</sup>, Gln<sup>161</sup>, Glu<sup>196</sup> участвуют в поддержании структуры активного центра [Soler et al., 1996]. Показано, что аминокислотные остатки, входящие в активный центр А-субъединицы вискумина, идентичны таковым у рицина [Sweeney et al., 1993].

### 1.1.2. Строение связывающих субъединиц рицина и вискумина.

Связывающая В-субъединица рицина (RTB) состоит из 262 аминокислотных остатков, которые образуют два отдельно свернутых домена сферической формы с диаметром 30 Å [Montfort et al., 1987]. В каждом домене В-субъединицы имеется галактозо-связывающий участок. RTB является гликопротеином с молекулярной массой около 31 кДа, содержащей два сайта N-гликозилирования. Определены критически важные для взаимодействия с галактозой аминокислоты в двух сайтах связывания сахара [Wales et al., 1991]. Между доменами В-субъединицы рицина наблюдается выраженная гомология (32%) аминокислотных остатков [Villifranca et al., 1981].

Каждый домен В-субъединицы рицина состоит из четырех субдоменов:  $\lambda$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ . Субдомены  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$  содержат примерно 40 аминокислотных остатков и образуют структуру так называемого трилистника. Субдомены  $\lambda$  отличаются от остальных субдоменов и составляют первые 16 аминокислотных остатков каждого домена. Субдомен 1 $\lambda$ , состоящий из 1-16 аминокислотных остатков, соединяет А- и В-субъединицы, тогда как субдомен 2 $\lambda$  (135-150 аминокислотные остатки) соединяет между собой два домена В-субъединицы [Rutenber et al., 1987]. В каждом домене  $\alpha$ - и  $\beta$ -субдомены связаны двумя дисульфидными связями. Девять остатков цистеина В-субъединицы рицина образуют четыре внутримолекулярные дисульфидные связи и одну с А-субъединицей.

Рицин имеет два углевод-связывающих центра. Первый локализован в субдомене 1 $\lambda$ , второй - в субдомене 2 $\gamma$ . Каждый галактозосвязывающий центр представляет собой неглубокий карман на поверхности белка, в образовании которого участвуют с одной стороны остаток ароматической аминокислоты, а с противоположной - пептид из трех аминокислотных остатков. Ароматическая аминокислота Trp<sup>37</sup> и пептид, состоящий из Asp<sup>24</sup>, Val<sup>125</sup>, Arg<sup>26</sup>, образуют первый галактозсвязывающий участок. Tyr<sup>248</sup> и пептид Asp<sup>236</sup>-Val<sup>237</sup>-Arg<sup>238</sup> формируют второй галактозсвязывающий участок [Rutenber et al., 1991].

Положение молекулы галактозы кроме гидрофобных взаимодействий с ароматическими кольцами соответствующих аминокислот фиксировано

водородными связями с боковыми группами некоторых полярных аминокислотных остатков. Остатки, формирующие водородные связи с галактозой, являются структурно сходными в каждом углевод-связывающем сайте рицина. Консервативные остатки аспарагиновой кислоты – Asp<sup>22</sup> в первом сайте и Asp<sup>234</sup> во втором – являются ключевыми для первичного взаимодействия со связываемыми сахарами. Атом O<sub>D1</sub> этих остатков образует водородную связь с C<sub>3</sub>-гидроксилом связываемого сахара, а атом O<sub>D2</sub> – с N<sub>E2</sub> консервативного амида Gln<sup>47</sup> в первом углевод-связывающем сайте и Gln<sup>256</sup> во втором. Каждый C<sub>3</sub>-гидроксил галактозы также формирует сильные водородные связи с атомами N<sub>D2</sub> Asp<sup>46</sup> в первом сайте и Asp<sup>255</sup> во втором. Сеть водородных связей в первом углевод-связывающем сайте более сложная, чем в сайте 2, в котором N<sub>E2</sub> Gln<sup>35</sup> образует раздвоенную водородную связь с C<sub>4</sub>- и C<sub>6</sub>-гидроксилами. В сайте 2 аналогом Gln<sup>35</sup> является Ile<sup>246</sup> и вместо водородной связи образуется гидрофобный контакт с атомом C<sub>6</sub> сахара.

Углевод-связывающие сайты RTB обладают разной аффинностью в отношении связывания лактозы: первый сайт является низкоаффинным, аффинность второго сайта, напротив, очень высока [Villifranca J.E., 1980; Yamasaki et al., 1985; Hatakeyama et al., 1986].

В-цепь вискумина (MLB) имеет молекулярную массу 34 кДа и состоит из 264 аминокислот, включающих семь остатков цистеина. Остаток цистеина Cys<sup>5</sup> образует межмолекулярную дисульфидную связь с Cys<sup>260</sup> А-субъединицы, а шесть остальных остатков образуют три внутримолекулярные дисульфидные связи [Soler et al., 1998]. В MLB содержится одной S-S связью меньше, чем в RTB. Установлено, что в первичной последовательности MLB существует 3 сайта гликозилирования: Asn<sup>61</sup>-Gly<sup>62</sup>-Ser<sup>63</sup>, Asn<sup>96</sup>-Gly<sup>97</sup>-Thr<sup>98</sup>, Asn<sup>136</sup>-Asp<sup>137</sup>-Thr<sup>138</sup>.

Подобно В-цепи рицина, MLV состоит из двух идентичных глобулярных доменов. В свою очередь, каждый из доменов составлен тремя равными по длине  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -субдоменами. Субдомены MLV расположены симметрично относительно локальной оси квазитретьего порядка, образуя структуру "трилистника" [Mursin et al., 1992] или  $\omega$ -петли [Hazes et al., 1996] аналогично субдоменам В-цепи рицина.

При концентрациях выше 1 мг/мл вискумин существует в виде димеров, при 0,3 и 0,03 мг/мл MLI-димеры составляют 80 и 20 % соответственно. В отличие от MLI, ричин, имеющий 52% гомологии с вискумином, не способен к димеризации и может существовать только в виде мономеров [Sweeney et al., 1998]. Более детальные исследования структуры димеров вискумина показали, что взаимодействие двух молекул MLI происходит за счет нековалентной ассоциации В-субъединиц, результатом чего является образование тетрамеров типа АВ-ВА. Тетрамерное образование формируется, в основном, за счет сильных гидрофобных и полярных взаимодействий между первыми доменами В-субъединиц молекулы вискумина. [Vernoslova et al., 1999]. Константа ассоциации мономеров  $K_a = 10^6 \text{ M}^{-1}$  [Sweeney et al., 1998]. Значение тетрамеризации молекул вискумина остается невыясненным. Существует предположение, что ассоциация мономеров обеспечивает взаимодействие (bridge) между клетками [Sweeney et al., 1998].

В каждом домене В-субъединицы вискумина имеется галактозо-связывающий участок. Хотя все субдомены произошли от одного предкового пептида, галактозо-связывающая способность сохранилась только у двух из 6 субдоменов:  $1\alpha$  и  $2\gamma$  [Soler et al., 1998]. Существует предположение, что данное свойство субдоменов обеспечивается трипептидным мотивом Asp-Val-Arg/Ala, который отсутствует в остальных субдоменах [Rutenber et al., 1987]. Ключевые остатки, входящие в галактозосвязывающие карманы и участвующие в

образовании водородных связей с сахарами, консервативны во многих токсинах.

В первом кармане 1 $\alpha$  находятся: Asp<sup>22</sup>, Glu<sup>35</sup>, Trp<sup>37</sup>, Asn<sup>46</sup>, Glu<sup>47</sup>, во втором 2 $\gamma$ :

Asp<sup>236</sup>, Ile<sup>246</sup>, Tyr<sup>248</sup>, Asn<sup>253</sup>, Glu<sup>256</sup> [Soler et al., 1998].

Участки связывания галактозы в структуре вискумина имеют различную аффинность по отношению к субстрату. Низкоаффинный участок 1 $\alpha$  субдомена идентичен связывающему центру в RTB [Rutenber et al., 1991]. Во втором участке связывания 2 $\gamma$  домена MLB благодаря двум аминокислотным заменам появляются две дополнительные водородные связи к галактозе [Eschenburg et al., 1998]. Одновременно с этим происходит снижение активности к N-ацетилгалактозамину за счет замены Arg<sup>237</sup>→Ala<sup>237</sup> у MLB в галактоз-связывающем кармане второго субдомена 2 $\gamma$  [Sweeney et al., 1998]. Как говорилось выше, вискумин при концентрациях, превышающих 1 мг/мл существует в виде димеров АВ-ВА. При образовании таких димеров низкоаффинные галактозосвязывающие домены 1 $\alpha$  каждой молекулы вискумина оказываются в зоне контакта. При этом доступные для субстрата галактозосвязывающие карманы в 2 $\gamma$  субдоменах каждого мономера оказываются разделенными расстоянием в 80 Å.

Ориентация и прочность связи достигается за счет водородных взаимодействий между гидроксильными группами сахаридов и полярными аминокислотными остатками, а также с помощью Ван-дер-Ваальсовых сил и гидрофобных взаимодействий между сахарами и ароматическим кольцом аминокислоты, входящей в галактозо-связывающий центр [Sharon et al., 1993]. Контактирующие с лигандом аминокислоты не обязательно являются главными детерминантами специфичности лектина, которая определяется, главным образом, точной формой связывающего центра и определенным

пространственным расположением окружающих аминокислот [Sharon et al., 1993]. Для вискумина было показано, что все гидроксильные группы галактозы в той или иной степени участвуют в связывании, но наиболее важной является 4-ОН группа [Lee et al., 1992]. В отличие от рицина, который имеет небольшой карман для связывания с моносахаридами, вискумин обладает более расширенным участком связывания с сахарами и обнаруживает способность связываться не только с моносахаридами, но и с ди-, три-сахаридами [Lee et al., 1992]. Было показано, что вискумин обладает высокой аффинностью к терминальной галактозе, связанной по  $\alpha$ - или  $\beta$ -положению, и низкой аффинностью к N-ацетилгалактозамину [Franz et al., 1986].

В-субъединица обуславливает связывание токсина с клеточной поверхностью за счет своей лектиновой активности. Кроме того, было показано, что В-субъединица рицина способна защищать А-субъединицу от деградации под воздействием эндосомальных и лизосомальных ферментов, тем самым, повышая цитотоксичность токсина [Bilge et al., 1994].

### **1.1.3. Взаимодействие между субъединицами рицина и вискумина.**

В образовании нативных гетеродимеров рицина и вискумина участвует дисульфидная связь. S-S связь в молекулах токсинов образуется между 259-ым в А-субъединице и 4-ым в В-субъединице остатками цистеина. 8-10  $\text{NH}_2$ -концевых аминокислотных остатков В-субъединицы взаимодействуют с  $\text{COOH}$ -концевым участком А-субъединицы, формируя удлиненную структуру, содержащую дисульфидную связь. В результате дисульфидная связь экспонирована на поверхности молекулы токсина [Montfort et al., 1987; Weston et al., 1994]. С помощью рентгеноструктурного анализа с разрешением 2,5 Å показано, что область контакта между А- и В-субъединицами рицина равна 1600 Å<sup>2</sup>, что

составляет примерно 14% от общей поверхности каждой субъединицы [Katzin et al., 1991].

Кроме ковалентной дисульфидной связи, субъединицы удерживаются вместе за счет нековалентных гидрофобных и полярных взаимодействий. Очевидно, что существуют группы взаимодействий по всей поверхности контакта, и эта структурная особенность, по всей вероятности, имеет определенное значение при разделении цепей, необходимого для выполнения А-субъединицей токсической функции. Предполагают, что после разделения цепей в водную фазу экспонируются гидрофобные участки, что, в свою очередь, может запускать перестройки в структуре А-субъединицы. Гидрофобные участки встраиваются в мембрану, инициируется процесс транслокации, за которым следует перегруппировка в субстрат-связывающем сайте, приводящая к активации фермента.

Во взаимодействии субъединиц рицина со стороны В-субъединицы в основном участвуют аминокислотные остатки С-концевого участка. Phe<sup>262</sup> В-субъединицы взаимодействует с боковыми группами Phe<sup>140</sup> В-субъединицы и Phe<sup>240</sup> А-субъединицы. Кроме гидрофобного взаимодействия в ассоциации субъединиц участвуют несколько полярных контактов, например, между ионной парой Glu<sup>41</sup> А-субъединицы и Lys<sup>219</sup> В-субъединицы. Но, несмотря на сходства в способах укладки А- и В-цепей в молекулах рицина и вискумина, существуют отличия во взаимодействиях между субъединицами данных токсинов. В таблице 1 перечислены все аминокислотные остатки, участвующие в ассоциации А- и В-субъединиц рицина и вискумина. Разное расположение и набор гидрофобных и заряженных аминокислотных остатков может быть одной из причин более низкой цитотоксической активности вискумина по сравнению с рицином.

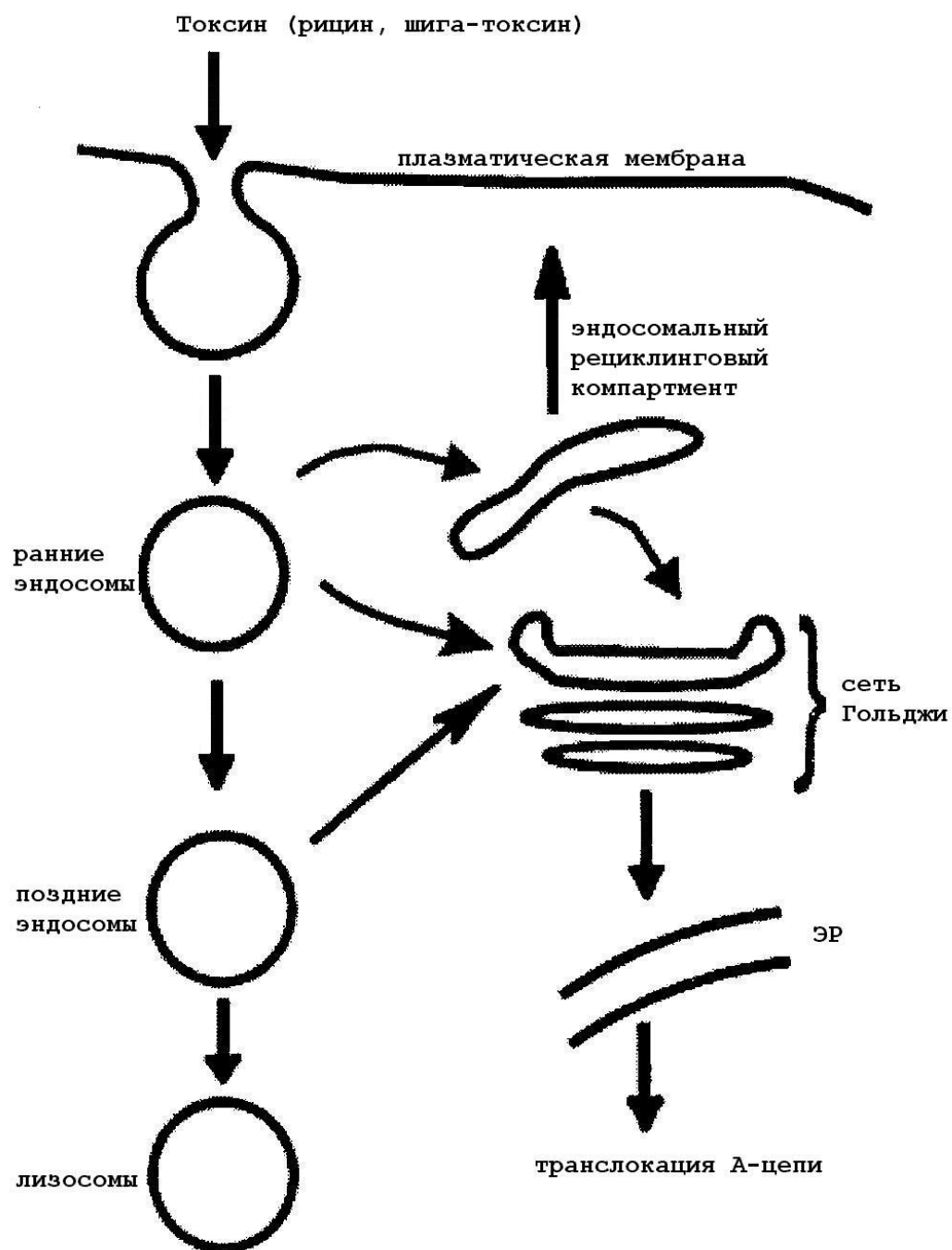
Таблица 1. Аминокислотные остатки, входящие в зону контакта субъединиц рицина и вискумина (взято из Krauspenhaar et al., 1999).

Полярные взаимодействия			
Вискумин		Рицин	
MLA	MLB	RTA	RTB
Leu 225 Asn 228 Thr 244 <b>Asn 245</b> Arg 247 Arg 248 <b>Ile 250</b> <b>Ile 253</b>	Asn 222 Ser 8 Arg 141 <b>Ala 134</b> Gly 191 Arg 141 <b>Asn 222</b> <b>Asn 222</b>	Asn 223 Gln 224 His 40 <b>Asp 245</b> Arg 235 Gln 183 <b>Ile 250</b> <b>Leu 253</b> Arg 235 <b>Tyr 184</b> Glu 41	Asp 7 Asn 7 Asp 95 <b>Pro 134</b> Val 142 Asn 222 <b>Asn 222</b> <b>Asn 222</b> Phe 264 <b>Phe 264</b> Lys 221
Гидрофобные взаимодействия			
Trp 187 Pro 184 Thr 223 <b>Ala 251</b>	Leu 261 Leu 261 Ile 52 <b>Pro 262</b>	Pro 151 <b>Pro 251</b> Ile 252	Phe 220 <b>Pro 262</b> Pro 262
Стеккинг-взаимодействия			
Trp 187 Tyr 204	Tyr 246 Phe 264	Phe 241 Phe 241 Tyr 184	Phe 141 Phe 264 Phe 264
Дисульфидная связь			
<b>Cys 5</b>	<b>Cys 260</b>	<b>Cys 5</b>	<b>Cys 260</b>



## **1.2. Внутриклеточный транспорт белковых токсинов.**

Токсины достигают своей цитоплазматической мишени в ходе многоступенчатого внутриклеточного транспорта [Lord and Roberts, 1998]. Интернализация токсинов внутрь клетки осуществляется посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза. В этом процессе принимают участие как клеточные рецепторы, содержащие галактозу, так и маннозные рецепторы [Simmons et al., 1986]. Далее токсины в составе везикул проходят эндосомальные компартменты клетки, аппарат Гольджи и, возможно, достигают эндоплазматического ретикулума. Финальной стадией транспорта является транслокация белков из внутриклеточных компартментов в цитозоль. Причина такого сложного маршрута, видимо, в том, что многие токсины не обладают внутренним транслокационным механизмом как дифтерийный токсин. Поэтому для выхода в цитозоль токсины транспортируются в клеточные компартменты, из которых с помощью существующих в них клеточных систем трансмембранного переноса они могут транслоцироваться. Однако место транслокации и ее механизм до сих пор не установлен. Предполагается использование токсинами системы ретротранслокации для выхода из эндоплазматического ретикулума [Hazes B. and Read R.J., 1997]. Однако прямых доказательств существования ретроградного транспорта еще не получено.



Внутриклеточный транспорт белковых токсинов (на примере рицина и шига-токсина).

### 1.2.1. Связывание с мембраной: рецепторы для рицина и вискумина.

Взаимодействие токсина с клетками начинается со связывания с соответствующими рецепторами на поверхности клетки-мишени. Связывание РИБ II с поверхностными клеточными рецепторами является необходимым этапом для инициации процессов эндоцитоза и внутриклеточного транспорта, в результате которых каталитически активные субъединицы токсинов достигают своего рибосомального субстрата в цитозоле.

Основной способ связывания РИБ II токсинов - через галактозо-содержащие рецепторы за счет лектиновых свойств В-субъединицы. Этот процесс с равной эффективностью протекает как при физиологической температуре, так и при 0<sup>0</sup>С. При добавлении лактозы или галактозы он становится обратимым, т.к. при этом блокируется связывание токсинов с рецепторами. Поскольку клетки млекопитающих экспонируют на своей поверхности целый ряд гликопротеинов и гликолипидов с концевой галактозой, эти клетки обычно имеют большое количество токсин-связывающих рецепторов. Было подсчитано, что для рицина число соответствующих рецепторов колеблется от 2 до 80 млн на клетку, абрина - от 2 до 30 млн на клетку, вискумина - от 0,9 до 40 млн на клетку [Barbieri et al., 1993]. Такое количество рецепторов с неизбежностью гарантирует, что большое количество молекул токсина будет связываться с теми компонентами поверхности клетки, которые в норме попадают внутрь клетки путем клатрин-зависимого или клатрин-независимого эндоцитоза, и которые, следовательно, способны доставить белок в клетку.

Также токсины в меньшей степени могут связываться с клетками через маннозные рецепторы за счет гликозилированной части токсинов. Количество маннозных рецепторов, которые составляют 7% от общего числа клеточных

рецепторов, например для рицина, равно  $3,1 \times 10^4$  на одну клетку [Magnusson et al., 1991].

### 1.2.2. Интернализация токсинов внутрь клетки.

После связывания с рецептором происходит интернализация токсина внутрь клетки посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза [Sandvig et al., 1982]. Термин «эндоцитоз» в широком понимании обозначает различные типы захвата внеклеточного материала внутрь клетки, включающие фагоцитоз, интернализацию с помощью кавеол, макро- и микропиноцитоз, клатрин-независимый и клатрин-зависимый рецептор-опосредованный эндоцитоз [Mukherjee et al., 1997].

В случае токсинов показано, что интернализация может проходить теми же последними механизмами. Интернализация дифтерийного токсина, в основном, происходит клатрин-зависимым путем [Моуа, 1985]. Холерный и тетанус токсин эндоцитируется преимущественно неклатриновым способом [Montesano et al., 1982]. Для рицина, кроме хорошо охарактеризованного клатрин-зависимого эндоцитоза, с помощью которого в клетку также попадают различные транспортные белки, например трансферрин, гормоны, факторы роста [Lind et al., 1995; Lamaze and Schmid, 1995], была также показана возможность клатрин-независимого пути интернализации [van Deurs et al., 1989; Sandvig and van Deurs B, 1996]. Было показано, что при закислении цитозоля нарушается формирование клатрин-окаймленных везикул и блокируется захват трансферрина, тогда как интернализация рицина не нарушается [Sandvig and Kierulff, 1996]. Мутантные клетки, в которых был заблокирован клатрин-зависимый эндоцитоз, оставались чувствительными к рицину [Simmons et al., 1995]. Таким же



разнообразие интернализации рицина определяется разнообразием рецепторов, с которыми данный белок может связываться благодаря своей лектиновой активности [Lord et al., 1996]. Интересный случай эндоцитоза наблюдается в случае с шига-токсином (продуцируемый *Shigella dysenteriae*). После связывания молекул токсина с гликофинголипидным рецептором, происходит агрегация рецепторов и интернализация комплекса клатрин-зависимым механизмом. Возможно, в процесс вовлекаются мембранные белки, которые имеют интернализационные мотивы и, образуя агрегаты с гликофинголипидными рецепторами, определяют локализацию в клатрин-окаймленные ямки [Sandvig et al., 1989].

Большинство белков, связывающихся с рецепторами на поверхности клетки, эндоцитируются с помощью клатрин-зависимого механизма [Mellman et al., 1996]. Сборка клатрин-окаймленных везикул – многостадийный процесс, включающий несколько регуляторных факторов, среди которых GTP-аза ARF-1, фосфолипаза D [Le Borgne et al., 1997]. Межмолекулярные взаимодействия белков на цитоплазматической поверхности мембраны приводят к концентрированию молекул рецептора в окаймленных ямках. Надо отметить, что некоторые из поверхностных рецепторов конститутивно располагаются в клатрин-окаймленных ямках (например, low density lipoprotein receptor или LDLR), в то время как другие рецепторы концентрируются в них только после связывания с лигандом (например, EGF receptor или Fc рецептор II типа).

Специфическая адресация рецепторов в клатрин-окаймленные ямки осуществляется за счет взаимодействия цитоплазматической части рецепторов, на которых располагаются сигнальные мотивы. Впервые важность определенных аминокислот в цитоплазматическом домене белков в определении клатрин-

зависимой локализации была продемонстрирована на примере человеческого LDLR [Goldstein et al., 1985]. Подобные последовательности в цитоплазматических доменах различных рецепторов, кластеризующихся в клатрин-окаймленные ямки были обнаружены у TR (трасферринового рецептора), CI-MPR (маннозо-6-фосфат рецептора) и др. белков.

Особенность вышеупомянутой сигнальной последовательности - наличие ароматической аминокислоты (чаще всего, тирозина), поэтому ее еще называют ароматический или тирозиновый мотив. Кроме того, как показал ряд исследований, подобные сигналы имеют определенным образом организованную структуру [Collawn et al., 1990]. Во-первых, данная сигнальная последовательность, располагается в цитоплазматическом домене белка и разделена с трансмембранным участком спейсерными аминокислотами. Конформационных и сиквенционных особенностей спейсерных участков отмечено не было, кроме того, что их длина включала не менее 7 аминокислот. Во-вторых, сама сигнальная последовательность, как это было отмечено у ряда белков, сложена в сжатую петлю (“tight turn”). Авторский термин “сжатая петля” обозначает либо  $\beta$ -поворот 1 типа, либо терминальные концы  $\alpha$ -спирали [Collawn et al., 1990]. Такая организация сигнальной последовательности необходима для взаимодействия со специальными белками – адаптерами, которые участвуют в формировании клатриновой оболочки. Адапторные белки – это гетеротетрамеры, которые направляют мембранный рецептор в клатрин-окаймленные ямки, углубления на поверхности мембраны. Эндоцитозные везикулы содержат адапторный комплекс AP-2, тогда как везикулы, производные мембран сети транс-Гольджи, содержат AP-1. Оба адапторных белка состоят из нескольких полипептидных цепей: двух адаптинов или больших

цепей –  $\gamma$  и  $\beta 1$  для AP-1;  $\alpha$  и  $\beta 1/\beta 2$  для AP-2.; средних цепей  $\mu 1$  и  $\mu 2$  соответственно; малых цепей  $\sigma 1$  и  $\sigma 2$  соответственно. Во взаимодействие вовлекаются медиальные части AP белков-  $\mu 1$  и  $\mu 2$  у AP-1 и AP-2 соответственно. В эндосомах клеток млекопитающих найден также и другой тетрамерный комплекс AP-3 [Odorizzi et al., 1998], однако роль данного белка в формировании клатриновых ямок пока не показана. Было показано, что адаптерные белки AP-1 и AP-2 взаимодействуют с тирозиновым мотивом SDYQRL in vitro [Ohno et al., 1995], причем это взаимодействие происходит в том случае, когда тирозиновый остаток не фосфорилирован. Оказалось, что глициновые остатки более важны для специфического взаимодействия с AP-1, чем с AP-2 [Mellman, 1996].

Кроме тирозинового мотива существуют ряд других сигналов, определяющих клатрин-зависимый путь эндоцитоза. Например, CD4 антиген и человеческий Fc $\gamma$ RIIb2 рецептор содержат дилейциновый мотив в цитоплазматическом домене. Инсулиновый рецептор также содержит дилейциновый мотив [Haft et al., 1994]. Молекулярная основа действия дилейцинового мотива до сих пор не ясна.

Клатрин-зависимый эндоцитоз проходит очень эффективно: в минуту с клеточной поверхности исчезает 10-50% белков, связывавшихся с рецепторами. В течение минуты после отпочковывания клатриновой везикулы, интернализуемые молекулы обнаруживаются в сортирующих эндосомах.

Как отмечалось выше, существует также возможность эндоцитоза токсинов с помощью клатрин-независимого пути. В некоторых случаях, например у человеческих фибробластов, интернализация с помощью неклатринового механизма составляет 50% от общего объема эндоцитоза.

Возможно, что индукция неклатринового механизма происходит в условиях ингибирования клатринового пути. Однако в некоторых публикациях высказываются сомнения относительно самостоятельного существования неклатринового механизма наряду с клатриновым. Предполагается, что такой путь является следствием экспериментальных манипуляций [Mellman et al., 1996]. Однако есть доказательства, что клатрин-независимый эндоцитоз рицина может иметь место, когда поглощение с помощью кавеол и клатрин-зависимый эндоцитоз ингибированы в результате удаления мембранного холестерина [Rodal et al., 1999]. Удаление холестерина приводит к исчезновению кавеол [Rothberg et al., 1990] и ингибированию образования клатрин-окаймленных ямок [Rodal et al., 1999; Subtil et al., 1999]. Подобно рицину, Moloney вирус мышинной лейкемии [Lee and Anderson, 1999], ангиотензин [Zhang et al., 1996], мускариновые рецепторы [Pals-Rylaarsdam et al., 1997] и D2 дофаминовые рецепторы [Vickery and Zastrow, 1999] эндоцитируются при экспрессии мутантного динамина, который блокирует вход и через клатрин-окаймленные ямки [Herskovits et al., 1993; van der Bliek et al., 1993; Damke et al., 1995], и через кавеолы [Henley et al., 1998; Oh et al., 1998]. Показано также, что ряд поверхностных рецепторов избегает включения в клатрин-окаймленные ямки [Mukherjee et al., 1997].

Молекулярные механизмы, определяющие подобный способ интернализации до конца не изучены. В отношении данного вопроса интересны исследования эндоцитоза двух изоформ Fc рецепторов: FcRII-B1 и FcRII-B2, образующихся в результате альтернативного сплайсинга. FcRII-B1 отличается от FcRII-B2 наличием вставки из 47 аминокислот в цитоплазматическом домене. Было показано, что в отличие от FcRII-B2, FcRII-B1 активно избегает включения в клатрин-окаймленные ямки [Miettinen et al., 1992]. Похожая картина



взаимодействия с мембраной наблюдалась и у GPI-заякоренного белка, у гемагглютиниона вируса гриппа - происходит отделение компонентов не в клатрин-окаймленные ямки, а в детергент-устойчивые мембранные участки.

Клатрин-независимый эндоцитоз можно четко отделить от процесса, который происходит с образованием так называемых кавеол. Это небольшие впячивания мембраны, которые затем отшнуровываются и образуют везикулы. С цитоплазматической стороны кавеолы покрыты белком кавеолином. В образовании кавеол принимают участие три изоформы этого белка – кавеолин-1, кавеолин-2 и кавеолин-3 [Fujimoto T. Et al., 2000; Rothberg et al., 1992; Scherer et al., 1996; Tang et al., 1996]. Процесс образования кавеол зависит от содержания холестерина в плазматической мембране [Rothberg et al., 1990]. Показано, что кавеолы чувствительны к нистатину и другим холестерол-связывающим препаратам [Schlegel and Lisanti, 2001]. Кроме того, процесс образования кавеол зависит также и от GTP-азной активности белка динамина [Sandvig and van Deurs 1999].

### **1.2.3. Везикулярный транспорт белков в клетке.**

Транспорт белков внутри клетки происходит с помощью везикул-носителей. Перенос содержимого во время эндо- и экзоцитоза является серией последовательных действий: отщепления везикулы, в полости которой находится транспортируемый белок, от одного компартмента; движение везикулы к следующему на пути компартменту; слияние везикулы с мембраной данного компартмента и высвобождение содержимого [Rothman et al., 1992]. Передвижение везикул между различными компартментами может определяться клатриновыми и COP механизмами.

Клатрин состоит из трех тяжелых и трех легких цепей, которые образуют “треножник”. Ассоциация молекул клатрина между собой приводит к формированию сетчатой структуры, состоящей из пента- или гексагональных ячеек. В результате формирования клатриновой сетки вокруг участка плазматической мембраны происходит инвагинация участка внутрь клетки. Связывание клатрина с мембраной происходит за счет специальных адаптерных белков - адаптинов (AP). Адаптины связываются с мембраной посредством взаимодействия с сигнальными последовательностями, расположенными в цитоплазматическом домене рецепторов, полимеризуются за счет агрегации рецепторов и в таком виде могут связываться с клатриновым комплексом из легких и тяжелых цепей. Как описано выше, AP отличаются локализацией: AP-1 обнаруживается в клатрин-окаймленных ямках в TGN, AP-2 ассоциируется с клатрином плазматической мембраны. Комплекс клатрин - AP-2 формируется на внутренней стороне мембраны из цитоплазматических белков. Кроме структурных компонентов в образовании комплекса участвуют регуляторные белки. К таким белкам относятся динамин, и несколько белков, содержащих последовательности, гомологичные Src 3 домену (SH3). Процесс формирования клатриновой оболочки требует энергетических затрат [Schmid et al., 1990]. Для AP-1 показано, что взаимодействие с мембраной TGN находится под контролем gas-подобной ГТФазы Arf (ADP-ribosylation factor), стимулируется GTP $\gamma$ S (негидролизуемый аналог GTP) и блокируется брефелдином А (БФА) [Stamnes et al., 1993]. Действие БФА заключается в том, что он блокирует ГДФ→ГТФ обмен, необходимый для образования стабильного комплекса Arf-ГДФ с мембраной [Donaldson et al., 1992]. В случае с AP-2 не наблюдается действия GTP $\gamma$ S и БФА на связывание с плазматической мембраной. На клеточной поверхности

обнаружена уникальная мембран-связанная форма Arf - Arf6, устойчивая к действию БФА. Возможно, она задействована в связывании AP-2 с цитоплазматической мембраной. Также показана роль динамина (ГТФаза, 100 кД) в процессе отпочковывания клатрин-зависимой везикулы от клеточной мембраны. При трансфекции мутантного динамина происходило ингибирование клатрин-зависимого пути [Blick et al., 1993]. После клатрин-зависимого эндоцитоза происходит «раздевание» транспортной везикулы. Клатриновая оболочка снимается с помощью 70 kDa АТФ-зависимого белка [Rothman et al., 1986]. В таком виде эндосома может сливаться с мембраной компартмента-мишени за счет SNARE-механизма.

Процесс движения внутри аппарата Гольджи, а также ретроградное движение от АГ к ЭР осуществляет COP I-везикулярный транспорт. Процесс начинается, когда малые ГТФ-связывающие белки типа ARF активируются связыванием с ГТФ. ГТФ-связанная форма ARF присоединяется к своему рецептору и запускает связывание белков коатомерного комплекса (COP-белки) с мембраной, которые в свою очередь формируют коатомерную оболочку. Известны  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ - и  $\zeta$ -COP. Коатомеры изначально находятся в цитозоле в виде олигомеров. Присоединение белков оболочки к мембране компартмента-донора происходит с участием GTP-связанной формы N-миристоилированного белка ARF (фактора ADP-рибозилирования), который связан с мембраной и обладает GTP-азной активностью. Во время присоединения коатомерных белков, мембрана АГ инвагинируется и формируется «почка». Каким образом происходит отщепление «почки» до сих пор остается невыясненным. Показано, что для этого процесса необходимо присутствие ацетил-СоА. Возможно, подобно слиянию вирусной оболочки с мембраной, в процесс вовлекаются fusion

белки, активированные с цитоплазматического конца с помощью ацетилирования. Гидролиз GTP необходим для высвобождения ARF и последующей диссоциации COP-белков с поверхности транспортной везикулы. Гидролиз индуцирует «раздевание» везикулы от коатомерных белков и ARF. Такое «раздевание» - одно из необходимых условий для дальнейшего взаимодействия мембран. Так как ARF – слабая GTP-аза, в этом процессе участвует ARF-специфичный GTPаза-активирующий белок (GAP).

Каждая из отщепляемых везикул точно «знает» место своего назначения. Согласно существующей гипотезе, такая специфичность осуществляется за счет имеющихся в ней SNARE (SNAP receptor) молекул [Rothman et al., 1992]. SNARE - это семейство интегральных белков, которые находятся как в мембранном составе формирующейся везикулы (v-SNARE), так и в мембране компартмента, к которому будет доставлена данная везикула (t-SNARE) [Tooze S.A. et al., 2001]. t-SNARE состоит из белков синтаксина и SNAP25, v-SNARE включает синаптобrevин и VAMP1/2 [Tooze S.A. et al., 2001; Brunger A.T., 2001]. Эти трансмембранные белки образуют пару, в которой оба комплекса антипараллельны друг другу. SNAR молекулы также взаимодействуют с регуляторными молекулами, такими как синаптотагмины и некоторые представители семейства  $Ca^{2+}$ -связывающих белков [Tooze S.A. et al., 2001; Pelham H.R.B., 2001; Gerona et al., 2000; Davis et al., 1999]. При взаимодействии соответствующей пары v-SNARE и t-SNARE запускается процесс слияния везикул с мембраной-мишенью. Специфичностью взаимодействия v-, t-SNARE определяется специфичность узнавания мембран. [Gadescu, 2000; Rizo et al., 1998]. Известно, что во взаимодействии данной пары участвуют также Rab-белки (gas-родственные GTP-азы). Кроме этого, в процессе слияния участвуют

цитозольные белки NSF (N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein) и  $\alpha$ -SNAP (soluble NSF attachment protein) [Brunger A.T., 2001]. NSF содержит два гомологичных АТФ-связывающих сайта. SNAP связывается с мембраной за счет своего рецептора - SNARE. Находясь в комплексе со SNARE, SNAP опосредует присоединение к мембране NSF. Связывание двух растворимых белков NSF и SNAP с белками SNARE инициирует процесс слияния мембран. Таким образом, комплекс SNARE, SNAP и NSF – это основной кор «машины слияния».

На ранних стадиях экзоцитоза (транспорт от ЭР к АГ) в процессе передвижения везикул задействован COP II механизм. В отличие от COP I роль ГТФазного белка ARF в данном процессе играет белок Sar1p [Schekman and Orci, 1996].

#### **1.2.4. Прохождение токсинов через эндосомальные компартменты клетки.**

После интернализации токсины обнаруживаются в эндосомальном компартменте [Johannes et al., 1997]. В данном компартменте с некоторыми токсинами происходит определенная модификация, необходимая для активации белка. Для шига-токсина показано, что белок подвергается расщеплению по месту Arg-X-X-Arg с помощью эндопротеазы клеток – фурина [Garred et al., 1995]. Внутри эндосом кислый pH способствует диссоциации лиганд-рецепторного комплекса. Однако для осуществления достаточно сильных лиганд-рецепторных взаимодействий pH ранних эндосом может быть недостаточным фактором. Свободный рецептор подвергается либо рециклингу, либо деградации. Ранний эндосомальный компартмент является основной сортирующей станцией эндоцитоза. Существует несколько возможных путей дальнейшего транспорта эндоцитируемой молекулы токсина, судьба которой, по-

видимому, на этом этапе определяется рецептором, с которым произошло связывание токсина на клеточной поверхности.

Большая часть эндоцитируемого рицина рециркулирует к клеточной поверхности [Sandvig et al., 1996]. Механизм рециклинга, как предполагается, основан на физических свойствах эндосомальных органелл. Сортирующий компартмент эндосом обладает тубуло-везикулярной структурой [Mukherjee et al., 1997]. Диаметр тубул таков, что исключает наличие больших по размеру белков в просвете тубулы. В тубулах, таким образом, концентрируется основная мембранная компонента компартмента с содержащимися в ней эндоцитируемыми рецепторами. В везикулярной части сортирующих эндосом концентрируются либо непродиссоциировавшие комплексы лиганд-рецептор, либо освободившийся от рецептора лиганд. Тубулы, отщепляясь от сортирующих эндосом, формируют тубулярный компартмент, называемый рециркулирующим эндосомальным компартментом, откуда, находящиеся в мембранах тубул рецепторы возвращаются назад, к плазматической мембране. Исследования процесса рециклинга показали, что в процессе не задействован активный сортинг с помощью специфичных сигнальных последовательностей. Кроме того, не исключено, что быстрый рециклинг может обуславливаться возвращением отпочковавшейся от плазматической мембраны везикулы назад, без прохождения через эндосомы. В настоящее время сложилась концепция о том, что рециклиngu к клеточной поверхности белки подвергаются по умолчанию, дальнейшее продвижение белков «вниз» находится под управлением сигналов, находящихся в последовательности транспортируемой молекулы.

Большинство из эндоцитируемых молекул рицина, псевдомонадного токсина и шига-токсина направляется в лизосомы. Однако скорость деградации

рицина и шига-токсина в лизосомах достаточно низка [Sandvig et al., 1996, van Deurs et al, 1988]. Транспорт в лизосомы может определяться сигналами, находящимися в последовательности белка. Например, для EGFR показано, что движение белка к поздним эндосомам и лизосомам находится под регуляцией сигналов [Opresko et al., 1995]. Также для рецептора маннозы-6-фосфата CD-MPR было показано, что рецептор избегает транспорта в лизосомы за счет находящейся на цитоплазматическом конце молекулы последовательности CRSKPR (34-39). Этот мотив является местом пальмитинирования, в отсутствии которого происходит транспорт в лизосомы [Rohrer et al., 1995]. Наоборот, для Р-селектина было показано наличие на цитоплазматическом конце 10 аминокислот, играющих роль положительного сигнала транспорта в лизосомы [Green et al., 1994]. Кроме активного сортирования с помощью сигналов показано, что физическая агрегация рецепторов также может способствовать транспорту в лизосомы [Mukherjee et al., 1997]. Интересно отметить, что при введении в белок нескольких молекул рицина, в основном, такие конструкции направлялись в лизосомы, в отличие от моновалентного конъюгата, часть молекул которого избегала лизосом и направлялась в АГ [van Deurs et al., 1986].

Здесь, в эндосомальном компартменте, некоторые токсины, дифтерийный, ботулиновый и тетанус-токсин способны к транслокации из эндосомальных компартментов в цитозоль. [Lord and Roberts, 1998a]. Наиболее изучен механизм рН-зависимой транслокации через эндосомы на примере дифтерийного токсина. Показано, что В-фрагмент дифтерийного токсина в кислом рН подвергается конформационным перестройкам, заключающихся в экспонировании гидрофобной области белка. Такие изменения позволяют В-субъединице встраиваться в мембрану и способствовать транслокации каталитической А-

субъединицы в цитозоль [London et al., 1992]. Однако большинство других токсинов (растительные токсины, шига-токсин, веротоксины, холерный токсин и др.) не обладают способностью к pH-зависимой транслокации и для осуществления своей цитотоксической активности подвергаются дальнейшему транспорту в компартменты, из которых могут проникать в цитозоль.

Только небольшая часть интернализованного токсина (для рицина 2-5%) направляется в аппарат Гольджи [van Deurs et al., 1988]. Авторы предполагают, что именно транспортировка токсина в АГ необходима для дальнейшей интоксикации клетки [Sandvig et al., 1996]. Было отмечено, что при температуре 18-20<sup>0</sup>С транспорт в АГ блокируется, при этом резко снижалась цитотоксическое действие рицина на клетки. До сих пор неясно, каким образом осуществляется транспорт молекул от ранних эндосомальных компартментов к поздним, а затем в АГ, хотя известны клеточные белки, способные рециркулировать между данными компартментами.

#### **1.2.5. Транспорт токсинов в аппарат Гольджи.**

Транспорт между эндосомальным компартментом и TGN практически не изучен. По-видимому, существует множество путей, обеспечивающих транспорт везикул между данными компартментами. Впервые транспорт токсина в аппарат Гольджи был продемонстрирован на примере холерного токсина [Morris et al., 1985]. В дальнейшем подобные исследования были проведены на рицине, шига-токсине и др. [Sandvig et al., 1996]. Через час после интернализации шига-токсин, меченный флуоресцином обнаруживается в Гольджи-компартментах [Johannes et al., 1998]. Кроме того, авторы работы подтвердили попадание шига-токсина в АГ биохимическим методом. В белок был введен сайт сульфатирования и показано, что такой белок сульфатируется TGN-локализованными сульфотрансферазами.



Те же авторы считают, что шига-токсин входит в АГ на уровне TGN. Описано, что шига-токсин может попадать в АГ через перинуклеарный эндосомальный рециклинговый компартмент (ERC) и доказано, что транспорт данного токсина из ERC в Гольджи происходит с помощью клатрин-окаймленных структур, содержащих AP-1 [Mallard et al., 1998]. Для рицина было показано, что через час около 5% интернализованного рицина находится в АГ. Из этого количества 75% локализуется в TGN. Процесс транспорта в АГ – температурo-зависимый. Было показано, что при 18-20<sup>0</sup> С интернализованный ригин присутствует в эндосомах, но не в АГ и лизосомах. Авторы предполагают, что белок транспортируется прямо от ранних эндосом в TGN, минуя поздние эндосомы. Было показано, что в мутантных по Rab9 клетках движение М6Ф-рецептора от поздних эндосом к TGN заблокировано, тем не менее это не препятствует проявлению цитотоксического действия рицина [Simpson et al., 1995a]. Изучение движения рицина в АГ показало, что в данном процессе существенная роль принадлежит динамину – ГТФ-азному белку, участвующему в образовании клатрин-зависимых везикул. В клетках, мутантных по динамину, ригин продолжал интернализоваться клатрин-независимым путем, но движение белка к АГ было заблокировано [Llorente et al., 1998]. Интересно, что транспорт рицина и шига-токсина в АГ не зависит от низкого эндосомального рН везикул, циркулирующих между ранними и поздними эндосомами [Melby et al., 1991; Sandvig and van Deurs, 1996; Schapiro et al., 1998; Schapiro F.B. and Grinstein S., 2000].

Существуют различные предположения относительно механизмов транспорта токсинов в АГ из эндосомальных компартментов. По-видимому, попадая в сеть транс-Гольджи, РИБ II активно используют молекулярную «машину» сортировки. Токсин может быть связан с рецептором, который

обладает способностью рециркулировать между плазматической мембраной, эндосомами и аппаратом Гольджи. Одним из таких наиболее хорошо охарактеризованных белков является рецептор маннозо-6-фосфата (М6ФР). Данный рецептор рециркулирует между аппаратом Гольджи, эндосомами и плазматической мембраной. В TGN к нему присоединяются лизосомальные ферменты за счет маннозо-6-фосфата. Рецепторы М6Ф концентрируются в клатрин-окаймленных ямках TGN за счет связывания с  $\gamma$ -адаптином. После отпочковывания клатриновая везикула направляется к поздним эндосомам, где под действием кислого pH происходит диссоциация комплекса рецептор-лиганд. В результате рецептор М6Ф, избегая транспорта в лизосомы, либо рециркулирует сразу обратно в TGN, либо продвигается к плазматической мембране и с нее направляется в TGN [Rohrer et al., 1995]. Процесс находится под контролем малых ГТФ-аз Rab9 [Riederer et al., 1994]. Регуляция такого сложного механизма транспорта М6ФР весьма многосторонняя. В рецепторе М6Ф обнаружены сигналы множественной локализации. С одной стороны, в цитоплазматическом домене CD-MPR (катион-зависимый М6Ф рецептор) содержится тирозиновый сигнал быстрой интернализации с клеточной поверхности Y<sup>26</sup>SKV<sup>29</sup>. С другой стороны, также в С-концевой части цитоплазматического домена обнаружен дилейциновый мотив, необходимый для взаимодействия с  $\gamma$ -адаптином и выхода через клатрин-зависимый механизм из TGN. Кроме этого, как уже отмечалось выше, CD-MPR имеет сигнал из пяти аминокислот, предотвращающий транспорт в лизосомы. До сих пор неясно, существуют ли какие-либо специфические сигналы, определяющие транспорт CD-MPR от поздних эндосом обратно к TGN, или этот процесс происходит по умолчанию.

Кроме М6Ф рецептора существует ряд белков, способных к транспорту с клеточной поверхности в TGN. К таким белкам относится, например, эндопептидаза фурин. Показано, что протеолитическая модификация фурином имеет огромное значение для транспорта бактериального шига-токсина в аппарате Гольджи [Sandvig and van Deurs, 1996]. Эндопептидаза фурин рециркулирует между клеточной поверхностью и TGN [Voorhees et al., 1995]. Известно, что фурин обладает тирозиновым мотивом YKGL, обуславливающим быструю интернализацию. Тем не менее, эта последовательность недостаточна для адресации белка в TGN. Кроме того, было показано, что гидрофильная область аминокислот, содержащая кластер кислых остатков WQEECPSDSEEDGRGER и располагающаяся в цитоплазматическом домене фурина, функционирует как сигнальный мотив адресации в TGN, а также интернализации с клеточной поверхности [Voorhees et al., 1995].

Молекулярные механизмы локализации и удержания белков в аппарате Гольджи интенсивно изучаются. По-видимому, попадая в сеть транс-Гольджи, растительные РИБ II каким-то образом взаимодействуют с резидентными белками, и их дальнейший путь зависит от того, какие сигнальные последовательности содержит такой рецептор. Исследования резидентных белков АГ показали, что в локализации участвуют два механизма – retention (задержания) и retrieval (возвращения) [Pelham et al., 1993]. Трансмембранный резидентный белок TGN - TGN38, участвующий в формировании транспортных везикул, содержит две независимо действующие сигнальные последовательности. Первая - SDYQRL - располагается в цитоплазматическом домене белка и является retrieval-последовательностью, обуславливающей возвращение белка в TGN. Как отмечалось выше, последовательность SDYQRL взаимодействует с адаптерными белками AP-1 и AP-2. Ключевой момент этой последовательности YQRL является также сигналом к интернализации, однако при замене YQRL на YQDL, при которой интернализационная способность не меняется, эффективность адресации белков в TGN снижается [Humphrey et al., 1993]. Предполагается, что существует дополнительный механизм транспорта в TGN, особая роль в котором отводится  $\gamma$ -адаптину [Robinson, 1990]. Кроме того,

была обнаружена вторая последовательность в трансмембранном участке TGN38, которой отводится роль сигнала для «ареста» белка в данном компартменте (retention). Хотя механизм действия таких последовательностей до конца неясен, предполагается, что с помощью таких трансмембранных участков происходит образование олигомерных структур с соседними рецепторами, образуя так называемые kin-олигомеры, которые блокируют дальнейшее продвижение белка [Nilsson et al., 1994].

Предполагается и другой механизм транспорта токсинов в АГ. Например, для рицина существует предположение, что гликолипиды, с которыми токсин связан в эндосомах, даже после освобождения от клеточного рецептора могут транспортировать токсин в АГ [Sandvig et al., 1996]. Однако более детальный механизм такого транспорта не ясен.

#### **1.2.6. Ретроградный транспорт токсинов в эндоплазматический ретикулум.**

Известно, что в аппарате Гольджи в норме осуществляются два маршрута: anterograde транспорт de novo синтезированных белков и липидов из эндоплазматического ретикулума и их адресация по месту назначения, и retrograde транспорт, при котором происходит возвращение белков комплекса Гольджи и эндоплазматического ретикулума (так называемых «резидентных» белков) и удержание их в местах постоянного функционирования.

Постоянный состав белков и липидов ЭР поддерживается благодаря ретроградному транспорту из аппарата Гольджи. Для белков ЭР характерны особые сигналы, обеспечивающие их возвращение в исходный компартмент. Растворимые белки содержат на С-конце тетрапептид KDEL и, таким образом, узнаются KDEL-рецептором. Связывание лиганда и рецептора индуцируется при кислых pH и приводит к конформационным изменениям комплекса, которые

инициируют ретроградный транспорт данных белков [Teasdale and Jackson, 1996]. Селективное связывание и высвобождение KDEL-лиганда, по-видимому, регулируется различиями pH органелл.

Известно, что кроме клеточных белков ретроградному транспорту в эндоплазматический ретикулум подвергаются многие белковые токсины. Для шига-токсина и шига-подобного VT-1 показано, что данные белки обнаруживаются в ЭР после интернализации в HeLa, T47D, Daudi клетках и также в обработанных бутировой (butyric) кислотой A431 клетках [Garred et al., 1995, Sandvig et al., 1994]. В отношении рицина существовали определенные трудности с детекцией в ЭР молекул токсина, меченных как пероксидазой, так и коллоидным золотом с помощью электронной микроскопии [Sandvig and van Deurs, 1996]. Попадание рицина в ЭР подтверждено биохимическим путем [Rapak et al., 1997]. В молекулу рицина были введены дополнительные последовательности - сайты для сульфатирования и N-гликозилирования. Такой мутантный белок оказывался вначале сульфатированным, а затем к нему присоединялись сахара по месту гликозилирования. Это доказывает присутствие рицина в ЭР, т.к. известно, что процесс гликозилирования белков проходит в данном компартменте. Кроме того, ряд наблюдений подтверждает транспорт рицина в ЭР. Во-первых, введение KDEL последовательности усиливает цитотоксичность химерной молекулы [Zhan et al., 1998]. Во-вторых, было продемонстрировано, что клетки, мутантные по трем ГТФазам, а именно Rab1, ARF1, Sar1, вовлеченным в транспорт между АГ и ЭР были устойчивы (каждая в отдельности) к цитотоксическому действию рицина [Simpson et al., 1995a]. Мутантный Rab1 ингибирует везикулярный транспорт раннего экзоцитозного пути, предотвращая формирование SNARE комплексов. Мутантный ARF1 ингибирует слияние COPI везикул с мембраной-мишенью. Последние исследования говорят об особой роли ARF1 в процессе ретроградного транспорта из Гольджи в ЭР [Cosson et al., 1994]. Мутантный Sar1 ингибирует формирование COPII-оболочки, препятствуя anterograde движению от ЭР, но не ретроградному в ЭР [Letourneur et al., 1994]. Аналогичные эксперименты были проведены в отношении шига-подобного токсина (SLT-1), псевдомонадного экзотоксина А, дифтерийного токсина, а позднее изолированной RTA. Было показано, что мутации по Rab1, ARF1, Sar1 предотвращали также интоксикацию клеток во всех случаях, исключая дифтерийный токсин [Simpson et al. 1995a, Simpson et al., 1996]. В-третьих, известно, что брэфелдин А ингибирует цитотоксичность многих токсинов: рицина, модецина, абрина, вискумина,

волкенсина, шига-токсина, холерного токсина в отличие от дифтерийного токсина [Bilge et al., 1995]. Действие БФА заключается в том, что он предотвращает собирание COP I оболочки, и именно эти белки отвечают за везикулярный транспорт между АГ и ЭР.

Механизм ретроградного переноса белковых токсинов до сих пор остается невыясненным. У некоторых токсинов обнаружен KDEL сигнальный мотив. Эксперименты с мутантными формами псевдомонадного экзотоксина А (PE) подтверждают, что PE может подвергаться ретроградному транспорту из TGN в ЭР. Транслоцируемый фрагмент PE содержит на COOH-терминальном конце последовательность, состоящую из пяти аминокислотных остатков: Arg-Glu-Asp-Leu-Lys (REDLK) [Lord and Roberts, 1998b]. Было показано, что мутации в этом пентапептиде влияют на каталитическую и цитотоксическую активность токсина. Делеции и замены в этом участке полипептидной цепи приводят к невозможности связывания токсина с рецептором, что драматически сказывается на снижении цитотоксичности [Chaudhary V.K. et al., 1990], однако не влияет на каталитическую активность PE. Замещение последовательности REDLK на KDEL приводит к тому, что такие мутантные формы PE становятся более цитотоксичными по сравнению с диким типом [Seetharam S. et al., 1991]. Другие токсины также содержат тетрапептид KDEL или функционально родственный ему гомолог: COOH-конец каталитического полипептида холерного токсина содержит последовательность KDEL, а температуро-лабильный энтеротоксин из *E.coli* – последовательность RDEL [Day P.J. et al., 2001; Gray G.L. et al., 1984; Mekalanos J.J. et al., 1983; Spicer E.K. and Noble J.A., 1982].

Ретроградному транспорту в ЭР подвергаются также токсины, у которых отсутствует данный мотив. Предполагают, что в процессе ретроградного переноса могут играть роль липидные рецепторы, с которыми токсин остается связан в АГ [Sandvig et al., 1996]. Например, для изолированной А-цепи рицина показана возможность транспорта в ЭР. Предполагаемый механизм заключается в неспецифической ассоциации RTA с мембранными компонентами за счет гидрофобного 12-аминокислотного фрагмента, находящегося на С-конце белка. RTA в комплексе с мембраной может пассивно передвигаться благодаря существующему нормальному ретроградному движению [Simpson et al., 1996]. Известно, что липиды сами по себе подвергаются ретроградному транспорту. Интересно, что клетки, обработанные бутировой кислотой (butyric), становятся более чувствительными к действию шига-токсина, рицина, модецина. Бутировая

кислота вызывает изменения в липидной композиции рецепторов, удлиняя жировую часть [Sandvig et al., 1994].

Еще одно возможное предположение о том, каким образом осуществляется ретроградное движение рицина, возникло при исследовании мутантов рицина с измененной лектиновой активностью. Были приготовлены мутанты с «испорченными» либо одним, либо двумя галактозо-связывающими центрами [Wales et al., 1991]. Далее был сформирован целый токсин путем реассоциации RTA с мутантными RTB. Цитотоксичность таких мутантных токсинов была проверена на макрофагах в условиях, когда галактозный путь был заблокирован, но токсины могли проникать в клетки за счет маннозных рецепторов. Было показано, что токсин, в котором был испорчен один галакто-связывающий центр, сохранял цитотоксичность, в то время как двойной мутант был не токсичен [Newton et al., 1992]. Таким образом, функционально активный галактозо-связывающий центр В-субъединицы необходим не только для связывания с рецептором на клеточной поверхности, но и играет роль во внутриклеточном транспорте токсина. Авторы предполагают, что В-субъединица играет роль на последней стадии ретроградного переноса токсина из АГ в ЭР, при этом происходит связывание токсина с постоянно рециркулирующим между данными компартментами рецептором за счет лектиновой активности В-субъединицы [Pelham et al., 1992]. Другая группа авторов согласно данным экспериментов с мутантными Rab1, ARF1, Sar1 также приходит к выводу, что ретроградное движение токсинов осуществляется за счет связывания с рециркулирующими белками в TGN и дальнейшим переносом в ЭР [Simpson et al., 1995a]. К таким белкам, рециркулирующим между АГ и ЭР, относятся растворимые KDEL-несущие белки, кроме того, трансмембранные белки, имеющие либо ди-лизиновую последовательность на С-конце (для трансмембранных белков I типа), либо ди-аргининовую последовательность на N-конце (для трансмембранных белков II типа) [Teasdale and Jackson, 1996]. Показано, что транспорт рицина в ЭР может осуществляться путем взаимодействия с рециркулирующим галактоз-содержащим компонентом, таким как калретикулин (KDEL-несущий белок), который сам возвращается в ЭР через взаимодействие с рециркулирующим KDEL-рецептором [Day P.J. et al., 2001; Deurs, 2000; Lord., 1996].

Предполагается, что именно COPI механизм лежит в основе ретроградного транспорта белков в ЭР. Одними из возможных кандидатов сортировки в COPI везикулы являются белки p24 семейства. [Stamnes et al., 1995].

Присоединение белков оболочки к мембране-донору, формирование транспортных везикул опосредовано действием белка ARF1 и его эффекторов [Cosson and Letourneur, 1997]. Слияние везикул COPI и мембраны ЭР происходит вследствие специфического взаимодействия белков v-SNARE и t-SNARE (Ufe1p), а также растворимых компонентов Sec20p/Tip20p [Teasdale and Jackson, 1996].

### **1.2.7. Транслокация токсинов.**

Для проявления цитотоксической активности А-субъединица токсина должна проникнуть через внутриклеточную мембрану, чтобы достигнуть своего рибосомального субстрата в цитозоле. Однако механизм транслокации токсинов до конца не изучен. Также нет определенной уверенности относительно места транслокации токсинов. Ранее предполагалось, что, либо эндосомы, либо АГ являются местом транслокации белка [Beaumelle et al., 1993, van Deurs et al., 1986]. Позднее появился ряд экспериментальных данных, находящихся в противоречии с данными предположениями. Во-первых, несколько независимых экспериментальных исследований приводили к заключению, что процесс транслокации токсинов наиболее эффективен в поздних органеллах эндоцитозного пути. Было показано, что RTA способна эффективно пересекать мембраны, реконструированные из мембран Гольджи и ЭР [Bilge et al., 1995]. Во-вторых, было показано, что мутантные клетки по Rab1, AFR1, Sar1 (в которых заблокировано движение от АГ к ЭР) защищены от интоксикации рицина, но не дифтерийного токсина, способного транслоцироваться из эндосомального компартмента [Simpson et al., 1995]. В-третьих, известно, что некоторые агенты, например NH<sub>4</sub>Cl и моненсин, обладают способностью повышать внутриклеточный pH. Повышение pH предотвращает pH-зависимую



транслокацию дифтерийного токсина из эндосом, но не влияет на цитотоксичность рицина, модецина, абрина и ряда других токсинов [Lord et al., 1996]. В свете накапливающихся данных о существовании ретроградного транспорта белков появился новый кандидат на место транслокации ряда токсинов - эндоплазматический ретикулум.

Было показано, что RTA не может транслоцироваться из искусственных липосом, но обладает способностью пересекать липосомы, реконструированные из мембран АГ и ЭР. Вероятнее всего, токсины подобные рицину, не обладают внутренней транслокационной машиной, как дифтерийный токсин и нуждаются в клеточных белковых механизмах, способных обеспечить им выход в цитозоль [Bilge et al., 1995]. Известно, что в мембране ЭР существуют различные транслокационные машины: классический транслокон для переноса новосинтезированных полипептидных цепей внутрь ЭР [Gorlich et al., 1992], TAP-транспортёр для переноса пептидов в комплекс МНС I класса [Androlewicz et al., 1993], а также система, обуславливающая обратный транспорт пептидов в цитозоль [Romisch et al., 1994]. Исследования показали, что токсины не используют TAP систему переноса пептидов [Sandvig et al., 1993].

Ряд исследований показывает необходимость разворачивания А-субъединицы токсина перед процессом транслокации. При введении дополнительной S-S связи в молекулу RTA, жестко фиксирующей конформацию белка, цитотоксичность токсина на основе такой субъединицы по отношению к клеткам была понижена, в то время как такая связь не влияла на каталитическую активность А-субъединицы [Argent et al., 1994]. Для реализации каталитической активности по отношению к рибосоме А-субъединица токсина должна освободиться от В-субъединицы путем восстановления S-S связей, так как в составе цельного токсина каталитическая активность А-субъединицы низка [Barbieri L. et al., 1993]. Имеется много свидетельств того, что дисульфидная связь должна быть восстановлена до трансмембранного переноса токсина в цитозоль [Lord J.M. and Roberts L.M., 1996]. ЭР в этом отношении является предпочтительным компартментом, в котором есть условия для осуществления подобных модификаций с токсинами [Majoul et al., 1997]. Полости ЭР содержат множество специализированных белков, участвующих в сворачивании новосинтезированных

полипептидных цепей. Однако нельзя исключать возможности восстановления дисульфидной связи в АГ, как в случае с холерным токсином [Majoul et al., 1996].

Хотя детальные механизмы транслокации токсинов неизвестны, в настоящее время сложилась гипотеза о возможности использования токсинами системы ретротранслокации для выхода в цитозоль [Hazes et al., 1997].

Ретротранслокационная система, функционирующая во всех нормальных клетках, экспортирует из цистерн ЭР неправильно свернутые или несвернутые белки [Riezman et al., 1997]. Известно, что в состав подобной ретротранслокационной машины входят белки классического транслокона новосинтезированных белков (Sec61p и др.). Комплекс Sec61p осуществляет ретроградную транслокацию, образуя в мембране ЭР пору. Он также является каналом для переноса секретируемых белков из цитоплазмы в просвет эндоплазматического ретикулума [High, 1995; Rapoport et al., 1996]. Кроме трансмембранного канала Sec61p транслокон включает ряд мембранных белков - Sec63, Der3p/Hrd1p, причем последний образует комплекс с Sec61p и молекулой субстрата [Plempner and Wolf, 1999]. Токсины могут мимикрировать под неправильно свернутые белки в результате конформационных изменений в цистернах ЭР. Конформационные перестройки токсинов могут быть обусловлены диссоциацией субъединиц, так как в результате экспонируются гидрофобные области, скрытые в зоне контакта субъединиц. Это может быть один из способов мимикрии под «плохой» белок. Диссоциация субъединиц может быть результатом тиолдисульфидного обмена, который катализируется присутствующим в ЭР ферментом - дисульфид-изомеразой [Zhan et al., 1998]. Было показано, что изолированная В-субъединица рицина не способна транслоцироваться через мембраны, реконструированные из АГ и ЭР [Bilge et al., 1995]. В результате работы ретротранслокационной системы неправильно

свернутые белки экспортируются в цитозоль, где подвергаются модификации убиквитином (по остаткам лизина) и расщепляются в протеосомах [Brodsky et al., 1997]. Если токсины используют данную систему для выхода в цитозоль, то каким образом избегают подобной деградации неизвестно. Некоторые авторы предполагают, что транслоцированная А-субъединица успевает провзаимодействовать с рибосомной 28S РНК прежде, чем происходит деградация [Rapak et al., 1997]. Надо отметить, что А-субъединица вискумина не содержит остатков лизина - сайтов связывания с убиквитином.

Также нельзя исключать возможности транслокации А-субъединиц токсинов в отсутствие белков-переносчиков за счет взаимодействия с мембранами внутриклеточных компартментов. Ранее было показано, что А-субъединица вискумина вызывает агрегацию и слияние липосом в модельных системах [Agarov et al., 1997]. Кроме того, показана важная роль 12-членного гидрофобного фрагмента А-субъединицы рицина на С-конце белка (Val 245-Val256) в процессе транслокации белка [Simpson et al., 1995b]. Данный участок экспонируется после освобождения от В-субъединицы и возможно, по мнению авторов, участвует во взаимодействии с мембраной.

## **Заключение**

В настоящее время достигнут определенный прогресс в изучении механизма цитотоксического действия РИБ II на клетки и их внутриклеточного транспорта. Многие этапы доставки токсинов к их мишеням стали понятны. Идентифицированы многие молекулы, так или иначе опосредующие движение токсинов внутри клетки. Показано, что РИБ II активно используют везикулярную транспортную машину, служащую для переноса секретируемых белков, механизмы ретроградной транслокации. Тем не менее, несмотря на большое количество экспериментальных данных, множество вопросов внутриклеточного транспорта токсинов до сих пор остается спорным. Основная проблема заключается в отсутствии точного понимания

механизма транслокации. Нет определенной уверенности, из какого компартмента осуществляется выход токсина в цитозоль клетки. Остается открытым вопрос и о степени конформационных изменений токсинов в процессе транслокации при взаимодействии с мембранами внутриклеточных органелл.

Несмотря на то, что цитотоксическая способность отличается у различных представителей РИБ II, и сейчас до конца не выяснено, существуют ли отличия внутриклеточного транспорта среди токсинов, обладающих высокой степенью гомологии, например, среди лектинов омелы белой, между рицином и агглютинином рицина, или между рицином и вискумином.

Более полную информацию о внутриклеточном транспорте токсинов в клетках и, в частности, о степени конформационных перестроек их каталитических субъединиц перед транслокацией, можно получить из структурных исследований, изучив (например, с помощью гибридом и моноклональных антител, синтезируемых этими клетками) роль отдельных доменов в проявлении цитотоксического действия РИБ II на клетки. Детальное понимание механизма транспорта токсинов внутри клетки позволит избежать проблем недостаточной эффективности и побочных эффектов, возникающих при применении препаратов на основе каталитических субъединиц этих белков, в терапии онкологических и аутоиммунных заболеваний и значительно расширить возможности их применения в клинической практике.

## **Глава 2. Материалы и методы.**

### **2.1. Клетки.**

Гибридомные клетки и миелому sp2/0 культивировали в пластиковых флаконах (Nunc, Дания) при стандартных условиях: 5% CO<sub>2</sub>, +37°C, на среде культивирования RPMI-1640 (Sigma, США), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США). Первичные гибридомные клетки культивировали в тех же условиях на НАТ-среде в 96-луночных планках (Costar, США). Клонированные гибридомные клетки переводились сначала на промежуточную среду, не содержащую аминоптерин (НТ), а затем на среду культивирования RPMI-1640.

Мышиные фибробласты линии 3Т3 культивировали при стандартных условиях, на среде DMEM (Sigma, США), содержащей 10% ЭТС (Gibco, США).

### **2.2. Животные.**

В работе использовали мышей линии Balb/c (самок), полученных из опытно-племенного питомника лабораторных животных при НИИ биомоделей РАМН, ст. Столбовая Московской области.

### **2.3. Выделение рицина и его субъединиц из растения *Ricinus communis*.**

Рицин выделяли из семян клещевины (*Ricinus communis*) по методике, описанной ранее (Nicolson et al., 1972; Tonevitsky et al., 1990). Семена гомогенизировали в 5 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 200 мМ NaCl. Экстракцию проводили при +4°C в течение суток при непрерывном помешивании. Гомогенизат центрифугировали 30 минут при 10.000 g и при +4°C. К супернатанту добавляли сульфат аммония до 60% насыщения и инкубировали при перемешивании в течение 18 часов при +4°C. Затем взвесь центрифугировали 30 мин при 10.000 g и +4°C. Осадок растворяли в минимальном объеме 5 мМ Na-фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 200

мМ NaCl и диализовали против этого же буфера. Очистку лектинов проводили с помощью аффинной хроматографии на колонке лактозил-сефароза 4В, уравновешенной ФСБ (pH 7,4). Элюировали белки с колонки 100 мМ раствором лактозы в ФСБ. Фракции анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ). Разделение рицина и агглютинина рицина проводили гельфильтрацией на колонке Sephacryl-S200. А-субъединицы токсинов получали с помощью аффинной хроматографии. 25 мг рицина в ФСБ наносили на колонку лактозил-сефароза 4В (5 мл). Отмывали 25 мл ФСБ. Затем элюировали А-цепь 2% меркаптоэтанолом в ФСБ (pH 7,4) со скоростью 0,15 мл/мин. Полученную А-цепь диализовали против ФСБ и концентрировали. Фракцию, содержащую В-цепь элюировали буфером, содержащим 0,1 М лактозу, 50 мМ Трис-HCl и 10 мМ меркаптоэтанол (pH 7,6). Затем В-цепь наносили на колонку с DEAE-целлюлозой, уравновешенную 50 мМ Трис-HCl с 10 мМ меркаптоэтанолом (pH 7,6). Отмывали колонку от несвязанной А-цепи этим же буфером и элюировали чистую В-цепь 200 мМ хлоридом натрия. Чистоту полученных препаратов субъединиц рицина контролировали с помощью электрофореза ПААГ в денатурирующих условиях [Laemmli et al., 1970]. Электрофорез проводили в 10%-ном разделяющем полиакриламидном геле.

#### **2.4. Выделение токсинов и их субъединиц из растения *Viscum album*.**

Вискумин получали из листьев Омелы белой по методике, опубликованной ранее [Tonevitsky et al., 1990]. Образцы омелы (*Viscum album*) собирали в Крыму с одного дерева и высушивали на воздухе при комнатной температуре. К 50 г высушенного и измельченного материала добавляли 200 мл 0,2 М CH<sub>3</sub>COOH и гомогенизировали в течение 5-6 мин до получения однородной массы. Полученную массу фильтровали через бумажный фильтр и

pH фильтрата доводили до 4,0. Далее фильтрат наносили на колонку с SP-Sephadex (2,5x12 см), уравновешенную 0,2 М ацетатным буфером (pH 4,0), а затем промывали этим же буфером до 0,1 о.е. Элюцию проводили 0,15 М Трис-HCl с 0,5 М NaCl (pH 8,0). Для выделения лектинов полученный элюент пропускали через колонку с IgG-Sepharose (2x10 см), уравновешенную 0,15 М Трис-HCl с 0,5 М NaCl (pH 8,0). Колонку промывали этим же буфером до 0,1 о.е. и элюировали связавшиеся лектины 0,5 М CH<sub>3</sub>COOH (pH 2,6). В полученном растворе доводили pH до 7,4 с помощью 1 М NaOH. Белок осаждали сульфатом аммония до 50% насыщения. Для разделения токсических лектинов (MLI, MLII, MLIII) использовали колонку лактозил-сефароза 4В (общая лектиновая емкость 15 мг/мл). На колонку, содержащую 5 мл сорбента, наносили 30 мг смеси лектинов и промывали ФСБ. MLII и MLIII элюировали 2,5 мМ N-ацетил-галактозамином, а MLI - 100 мМ лактозой в ФСБ. Разделение MLII и MLIII токсинов проводили на хроматографе FPLC с колонкой Mono S HR (5 мм x 5 см), уравновешенной 0,015 М цитратным буфером (pH 4,2). 5 мг отдиализованного белка наносили на колонку, связавшийся белок элюировали линейным градиентом 0-500 мМ NaCl (общий объем 30 мл), а затем 1 М NaCl. На всех стадиях очистки наличие лектинов в образцах проверяли с помощью реакции гемагглютинации. Для этого смешивали в планшете 10 мкл 1% взвеси эритроцитов человека, 10 мкл 0,15 М Трис-HCl с 0,5 М NaCl (pH 7,4) и 10 мкл испытуемого раствора. А-субъединицу MLI получали с помощью аффинной хроматографии. 25 мг белка в ФСБ наносили на колонку лактозил-сефароза 4В (5 мл), отмывали 25 мл ФСБ, А-субъединицу элюировали 2% меркаптоэтанолом в ФСБ со скоростью 0,15 мл/мин, диализовали и концентрировали. Обогащенную фракцию В-субъединицы элюировали 100 мМ лактозой в ФСБ. Дальнейшую

очистку В-субъединицы вискумина проводили либо гель-фильтрацией на колонке TSK G3000 SWG (21,5x600 мм) в системе FPLC ("Pharmacia", Швеция), либо на колонке с иммобилизованными монАт против MLA (MNA8). Чистоту препаратов контролировали с помощью электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях [Laemmli et al., 1970]. Электрофорез проводили в 10%-ном разделяющем ПААГ.

## **2.5. Получение гибридом, продуцирующих антитела против А-субъединицы рицина.**

Мышей линии Balb/c иммунизировали изолированной А-цепью рицина (0, 12, 19, 31, 40 дни). Первые две инъекции были проведены с полным адъювантом Фрейнда (ПАФ) по 1,5 мкг RTA на мыш; последующие три инъекции – по 5 мкг RTA на мыш в отсутствии адъюванта. Антиген вводили подкожно, внутримышечно, внутривенно (кроме инъекций с адъювантом). Эффективность иммунизации определяли по активности сывороток методом ТИФА после первой иммунизации на 7-й, после остальных на 5-й день. Слияние иммунных селезеночных лимфоцитов и миеломы sp2/0 проводили на 3-й день после последней иммунизации в полиэтиленгликоле (ПЭГ<sub>4000</sub>) согласно опубликованному методу [Davidson et al., 1977]. Через 2 недели отбирали культуральную жидкость для выявления в ней антител. Активность антител определялась с помощью твердофазного иммуноферментного анализа в двух системах (антиген на плате и антиген в растворе). Клонирование гибридомных клеток проводилось методом лимитирующих разведений.



## **2.6. Получение гибридом, продуцирующих антитела против В-субъединицы вискумина.**

Для получения гибридом mlb-5,-6,-7,-9 мышей иммунизировали изолированной В-цепью вискумина (MLB). Первые две инъекции были проведены с ПАФ, по 20 мкг на мышь, последующие четыре – в отсутствии адъюванта, по 50 мкг на мышь.

Гибридома Mbch1 была получена при иммунизации мышей нативным вискумином (0, 12, 19, 31, 40 дни). MLI вводили в комплексе с монАт MNA9, взаимодействующими с А-субъединицей MLI. Молярное соотношение антиген:антитело в составе иммунного комплекса было 1:1. Первые две инъекции мыши получили с ПАФ, по 5 мкг токсина на мышь, последующие четыре – в отсутствии адъюванта и также по 5 мкг токсина на мышь.

Антигены вводили подкожно, внутримышечно, внутривенно (кроме инъекций с адъювантом).

Эффективность иммунизации определяли по активности сывороток методом твердофазного иммуноферментного анализа в системах антиген на плате и антиген в растворе. Слияние иммунных селезеночных лимфоцитов и миеломы sp2/0 проводили на 3-й день после последней иммунизации в ПЭГ<sub>4000</sub> согласно методике [Davidson et al., 1977]. Клонирование гибридомных клеток проводилось методом лимитирующих разведений.

## **2.7. Получение и очистка антител.**

Мышам предварительно (за две недели) вводили внутривенно пристан (2, 6, 10, 14- тетраметилпентадекан, Sigma, США) по 0,5 мл/мышь. Затем вводили растущие клетки гибридом (1-3 млн/мл, 2 мл/мышь). МонАт выделяли методом аффинной хроматографии на протеин А-сефарозе [Eu et al., 1978]. К

асцитной жидкости добавляли равный объем 3М забуференного раствора глицина (pH 9,0), затем NaCl до 3М. Смесь наносили на колонку с протеин А-сефарозой. Отмывали колонку 8-кратным объемом буфера, содержащего 1,5 М глицина, 3М NaCl (pH 9,0). Последовательно элюировали антитела сначала раствором, содержащим 0,03 М Трис-HCl и 0,01 М NaCl (pH 6,8), а затем раствором, содержащим 0,1 М цитрат натрия и 0,15 М NaCl (pH 3,0). Чистоту препаратов контролировали с помощью электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях по [Laemmli et al., 1970]. Электрофорез был проведен в 12%-ном разделяющем ПААГ.

## **2.8. Определение изотипа антител.**

Изотип монАТ был определен с помощью кроличьих поликлональных антител против изотипов мышинных иммуноглобулинов (RAMI-I, ИМТЕК, Россия). Исследуемые монАт сорбировали на иммунологическую плату. После трехчасовой инкубации и трехкратной отмывки ФСБ, содержащим 0,1% БСА, 0,025% Твин-20, добавляли RAMI-I. Инкубировали 45 минут при +37<sup>0</sup>С. После отмывки добавляли козьи антитела против иммуноглобулинов кролика, меченые пероксидазой хрена (ИМТЕК, Россия). Реакцию визуализировали с помощью ортофенилендиамина (ОФД, Sigma, США), растворенного в 0,1 М фосфат-0,05 М цитратном буфере (pH 5,0). Все исследуемые антитела относились к изотипу Ig G1.

## **2.9. Биотинилирование белков.**

Биотинилирование токсинов и антител проводили в соответствии с рекомендациями производителей с помощью N-оксисукцинимидного эфира биотинамидокапроата (Sigma, США). Готовили маточный раствор биотина в

диметилсульфоксиде (ДМСО, LOBA, Австрия) с концентрацией 5 мг/мл.

Реакцию проводили в течение ночи при +4<sup>0</sup>С в ФСБ при концентрации белков не менее 0,7 мг/мл. Молярное соотношение биотин:белок составляло 20:1. Реакцию останавливали добавлением 0,1% NaN<sub>3</sub>. Отмывку от несвязавшегося биотина проводили на колонке сефадекс-G25. Степень биотинилирования оценивали с помощью ТИФА, используя комплекс стрептавидин-пероксидаза хрена (ИМТЕК, Россия).

## **2.10. Изучение взаимодействия антител с антигеном с помощью твердофазного иммуноферментного анализа.**

В качестве антигена использовали вискумин, рицин и их изолированные субъединицы, а также MLIII. Активность антител определяли в трех системах:

### **1) Сорбированный антиген.**

Антиген (в концентрации 10 мкг/мл) в ФСБ (pH 7,5) сорбировали на дно лунок 96-луночной полипропиленовой платы (Costar, США) и инкубировали в течение 16 часов при +4<sup>0</sup> С. Далее плату отмывали ФСБ, содержащим 0,05% Твин-20 и 25 мМ лактозы. После инкубации с 0,1% БСА в ФСБ, в лунки вносили образцы, содержащие биотинилированные моноклональные антитела в различных концентрациях. Инкубировали 1 час при +37<sup>0</sup>С. После отмывки добавляли конъюгат стрептавидин-пероксидаза (ИМТЕК, Россия) и инкубировали 1 час при +37<sup>0</sup>С. При использовании вместо биотинилированных антител супернатантов клеток (в скрининге первичных гибридом) или иммунных сывороток (для определения титра после иммунизации) реакцию оценивали с помощью меченых пероксидазой кроличьих антител против иммуноглобулинов мыши (ИМТЕК, Россия). После отмывки в лунки вносили субстратную смесь, содержащую орто-фенилендиамин (Sigma, США) в 0,1 М цитрат – 0,05 М

фосфатном буфере (pH 5,0). После 15 мин инкубации реакцию останавливали 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Калориметрические измерения проводили на спектрофотометре Multiscan (Labsystems, Финляндия) при 492 нм.

## 2) Нативный антиген.

На дно лунок 96-луночной платы сорбировали антитела в концентрации 10 мкг/мл и инкубировали в течение 16 часов при +4<sup>0</sup>С. После отмывки ФСБ, содержащим 0,05% Твин-20 и 25 мМ лактозы (pH 7,5) и забивки мест неспецифического связывания 0,1% раствором БСА в ФСБ в лунки вносили биотинилированный антиген в различных концентрациях. Инкубировали 1 час при +37<sup>0</sup>С. После отмывки добавляли комплекс стрептавидин-пероксидаза и также инкубировали 1 час при +37<sup>0</sup>С. Затем вносили субстратную смесь, содержащую ОФД в 0,1 М цитрат – 0,05 М фосфатном буфере (pH 5,0). Реакцию останавливали добавлением 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Определяли ОП 492 нм с помощью спектрофотометра.

При использовании вместо чистых антител супернатантов клеток (в скрининге первичных гибридом) или иммунных сывороток (для определения титра после иммунизации) в лунки 96-луночной платы сначала сорбировали козы антитела против иммуноглобулинов мыши (ИМТЕК, Россия). Далее вносили образцы супернатантов или сывороток в различных разведениях, а затем – биотинилированные антигены в концентрации 1 мкг/мл. Проявляли реакцию как описано выше.

## 3) Денатурированный антиген.

Эту систему использовали для определения взаимодействия антител ТА71 и ТА7 с подвергнутыми тепловой денатурации в течение 3 минут при 100<sup>0</sup>С вискумином или его изолированной А-субъединицей.

На 96-луночную плату сорбировали моноклональные антитела в концентрации 10 мкг/мл в ФСБ и инкубировали в течение 16 часов при +4<sup>0</sup>С. Далее плату отмывали ФСБ, содержащим 0,05% Твин-20 и 25 мМ лактозы. После инкубации с 0,1% БСА в ФСБ в лунки вносили образцы, содержащие денатурированный биотинилированный антиген. Инкубировали 1 час при +37<sup>0</sup>С и отмывали ФСБ. Затем вносили конъюгат стрептавидин-пероксидаза и инкубировали 1 час при +37<sup>0</sup>С. Для проявления реакции использовали ОФД в 0,1 М цитрат – 0,05 М фосфатном буфере (рН 5,0). Реакцию останавливали добавлением 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Измеряли ОП 492 нм с помощью спектрофотометра.

### **2.11. Конкурентный иммуоферментный анализ.**

Конкурентный ИФА использовали для определения перекрестного взаимодействия антител между собой. На иммунологическую плату сорбировали антиген в концентрации 10 мкг/мл. Инкубировали в течение 16 часов при + 37<sup>0</sup>С. После отмывки платы ФСБ, содержащим 0,05% Твин-20 и 25мМ лактозу, и инкубации с 0,1% БСА в ФСБ в лунки вносили образцы немеченых монАт в различных концентрациях. После инкубации (45 мин, +37<sup>0</sup>С) и без отмывки в лунки добавляли 100-кратный избыток меченных биотином монАт. Инкубировали 45 мин при +37<sup>0</sup>С и отмывали ФСБ. Затем вносили конъюгат стрептавидин-пероксидаза (ИМТЕК, Россия). Иммунопроявление проводили, используя орто-фенилендиамин (Sigma, США) в 0,1 М цитрат – 0,05 М фосфатном буфере (рН 5,0). Контролем конкуренции служила реакция антител на себя. Уровень реакции измеряли на спектрофотометре Multiscan (Labsystems, Финляндия) при 492 нм.

### **2.12. Сэндвич-ТИФА на основе полученных монАт.**

Этот метод применялся при разработке чувствительных тест-систем для выявления рицина и вискумина в биологических образцах. На иммунологическую плату сорбировали моноклональные антитела в концентрации 10 мкг/мл. Инкубировали в течение 16 часов при +4<sup>0</sup>С. После отмывки и инкубации с 0,1% БСА в ФСБ, содержащем 0,05% Твин-20 и 25 мМ

лактозы, в лунки вносили образцы, содержащие антиген, в различных концентрациях. Инкубировали 1 час при +37<sup>0</sup>С, отмывали и затем добавляли меченые биотином монАт (в концентрации 1 мкг/мл). После инкубации (1 час при +37<sup>0</sup>С) и отмывки добавляли конъюгат стрептавидин-пероксидаза (ИМТЕК, Россия). В качестве маркера пероксидазной реакции использовали ОФД (Sigma, США) в 0,1 М цитрат – 0,05 М фосфатном буфере (рН 5,0). Реакцию останавливали добавлением 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Измерения проводили на спектрофотометре Multiscan (Labsystems, Финляндия) при 492 нм.

### **2.13. Оценка галактозо-связывающей активности токсинов.**

Галактозо-связывающую активность MLB, MLI и R60 оценивали по связыванию с асиалофетуином. Лунки 96-луночной платы сенсibiliзировали антигеном в ФСБ (концентрация 10 мкг/мл). Инкубировали в течение 16 часов при +4<sup>0</sup>С. После отмывки (ФСБ + 0,05% Твин-20) неспецифическое связывание блокировали ФСБ, содержащим 0,1% БСА и 0,05% Твин-20. Затем в лунки вносили асиалофетуин (ASF), меченный биотином (1 мкг/мл). После инкубации и отмывки (1 час при +37<sup>0</sup>С) связанный с антигеном асиалофетуин выявляли с помощью конъюгата стрептавидин-пероксидаза (ИМТЕК, Россия). Реакцию регистрировали после добавления орто-фенилендиамина (Sigma, США) в 0,1 М цитрат – 0,05 М фосфатном буфере (рН 5,0) на спектрофотометре Multiscan (Labsystems, Финляндия) при 492 нм.

### **2.14. Диссоциация субъединиц рицина и вискумина под действием дитиотреитола.**

Для изучения диссоциации рицина и вискумина на плату сорбировали асиалофетуин или монАт против А-субъединиц токсинов в концентрации 10 мкг/мл. Инкубировали в течение 16 часов при +4<sup>0</sup>С. После отмывки (ФСБ + 0,05% Твин-20) и инкубации с 0,1% БСА в ФСБ,

содержащем 0,05% Твин-20, в лунки вносили предварительно проинкубированные с 5 мМ дитиотреитолом (ДТТ, Sigma, США) токсины в различных концентрациях (инкубацию токсинов с ДТТ проводили в течение 1 часа при +25<sup>0</sup>С). После инкубации (1 час при +37<sup>0</sup>С) и отмывки в лунки добавляли биотинилированные антитела против токсинов. Инкубировали 1 час при +37<sup>0</sup>С и отмывали ФСБ. Затем в лунки вносили комплекс стрептавидин-пероксидаза (ИМТЕК, Россия) и инкубировали 1 час при +37<sup>0</sup>С. Реакцию проявляли ОФД (Sigma, США) в 0,1 М цитрат – 0,05 М фосфатном буфере (pH 5,0). ОП 492 нм измеряли на спектрофотометре Multiscan (Labsystems, Финляндия).

### **2.15. Влияние монАт против MLV на взаимодействие вискумина и его В-цепи с асиалофетуином.**

Для изучения влияния монАт на взаимодействие токсинов с ASF использовали конкурентный ИФА. Лунки 96-луночной платы сенсibilизировали асиалофетуином (концентрация 10 мкг/мл) в ФСБ. Неспецифическое связывание блокировали ФСБ, содержащим 0,1% БСА и 0,05% Твин-20. Затем в лунки вносили ASF, предварительно проинкубированный с биотинилированными монАт. Молярное соотношение антигена и антител было 1:100. Связанный комплекс выявляли с помощью конъюгата стрептавидин-пероксидаза (ИМТЕК, Россия). Все инкубации проводили при +37<sup>0</sup>С в течение 1 часа. Реакцию регистрировали после добавления орто-фенилендиамина (Sigma, США) в 0,1 М цитрат – 0,05 М фосфатном буфере (pH 5,0) на спектрофотометре Multiscan (Labsystems, Финляндия) при 492 нм.

### **2.16. Клеточный ИФА.**

Этот метод использовали, чтобы оценить доступность антигена, связанного с рецептором, для антител. Эксперимент осуществляли в три этапа.

**1). Посадка клеток в 96-луночную плату (все манипуляции проводились в стерильных условиях).** В лунки стерильной 96-луночной платы

вносили стерильный 2%-ный раствор БСА в ФСБ (по 200 мкл в лунку) и инкубировали 1 час в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при стандартных условиях (+37<sup>0</sup>С, 5,5% CO<sub>2</sub>). После инкубации БСА отбирали и отмывали плату средой культивирования DMEM (1 раз, по 200 мкл в лунку). Далее вносили по 50 мкл в лунку среды культивирования, содержащей 10% ЭТС, и затем клетки 3Т3 по 10 тысяч в лунку. Инкубировали ночь в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (+37<sup>0</sup>С, 5,5% CO<sub>2</sub>) для распластывания клеток.

**2). Подготовка клеток для проведения эксперимента (нестерильно).** После инкубации клетки отмывали теплым (+37<sup>0</sup>С) ФСБ (3 раза по 300 мкл в лунку). После отмывки клетки фиксировали глутаровым альдегидом (Merck, Германия). Для этого наносили 2,5%-ный раствор глутарового альдегида, приготовленного на ФСБ (комнатной температуры) по 100 мкл в лунку и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Отмывали клетки ФСБ 2 раза по 300 мкл в лунку. Затем проводили забивку эндогенной пероксидазы. Для этого вносили 0,5%-ный раствор перекиси водорода по 100 мкл в лунку и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Отмывали клетки ФСБ 2 раза (по 300 мкл в лунку). Такие клетки были готовы для проведения основного эксперимента.

**3). Проведение ИФА.** После инкубации клеток с 1%-ым раствором БСА (250 мкл в лунку, 30 мин при +37<sup>0</sup>С) и отмывок (ФСБ, по 300 мкл в лунку) на клетки наносили антигены - MLI или MLB - в концентрации 1 мкг/мл и инкубировали 1 час при +37<sup>0</sup>С. Далее, после отмывок, в лунки вносили анти-MLB антитела, меченные биотином, в различных концентрациях. Инкубировали (1 час при +37<sup>0</sup>С) и отмывали ФСБ, содержащим 0,05% Твин-20. Затем в лунки вносили комплекс стрептавидин-пероксидаза (ИМТЕК, Россия). В качестве субстрата для пероксидазной реакции использовали орто-фенилендиамин (Sigma, США) в 0,1 М цитрат – 0,05 М фосфатном буфере (pH 5,0). Калориметрические измерения проводили на мультискане (Labsystems, Финляндия) при ОП 492 нм.



## **2.17. Изучение рециклинга вискумина клетками TA71.**

Контрольными клетками в экспериментах служили две линии: гибридома MNA9, устойчивая к действию вискумина и продуцирующая антитела против MLA, и миелома sp2/0, неустойчивая к действию токсина.

**Работа с клетками (в стерильных условиях).** Снятые с флаконов клетки подвергали трехкратной отмывке в большом объеме холодной среды (RPMI-1640), не содержащей сыворотки. Таким образом, удалялись свободные антитела, содержащиеся в культуральной жидкости гибридом, которые могли оказывать протективное воздействие на клетки. К отмытым клеткам добавляли MLI-biotin так, чтобы конечная концентрация токсина в среде составляла  $5 \times 10^{-9}$  М. Для предотвращения синтеза новых антител, связывание токсинов с клетками гибридом проводили при  $+4^{\circ}\text{C}$  в течение часа. После инкубации клетки отмывали от несвязавшегося токсина средой (RPMI-1640) без сыворотки. Затем клетки разводили в среде, содержащей 10% ЭТС, и помещали в 24-луночную плашку в концентрации 100 тыс./лунка. Инкубировали 12-14 часов. В течение инкубации из лунок отбирали аликвоты супернатантов: 1 проба – через 1 час после посадки клеток, 2 проба – через 2 часа, 3 проба – через 12 часов. Для вычета фоновых значений в качестве контроля была отобрана аликвота супернатанта после отмывки клеток от несвязавшегося вискумина.

**Определение наличия вискумина в супернатантах.** Содержание биотинилированного MLI в пробах оценивали с помощью ТИФА. Лунки 96-луночной полипропиленовой платы сенсibilизировали моноклональными антителами MNA9. После забивки 0,1%-ым БСА в ФСБ, содержащем 0,05% Твин-20 и 25 мМ лактозы, в лунки вносили исследуемые образцы супернатантов, содержащие вискумин-биотин (перед нанесением образцы были разведены фосфатно-солевым буфером в 2 раза), а также - стандартный биотинилированный вискумин в различных концентрациях. После инкубации (1 час при  $+37^{\circ}\text{C}$ ) и отмывки ФСБ, содержащим 0,05% Твин-20 и 25 мМ лактозы, в лунки вносили комплекс стрептавидин-пероксидаза (ИМТЕК, Россия). В качестве субстрата для пероксидазной реакции использовали орто-

фенилендиамин (Sigma, США) в 0,1 М цитрат – 0,05 М фосфатном буфере (pH 5,0). Калориметрические измерения проводили на мультискане (Labsystems, Финляндия) при ОП 492 нм.

Содержание MLI-биотин в супернатантах клеток оценивали по калибровочной кривой, построенной для стандартного биотинилированного вискумина.

## **2.18. Влияние гуанидингидрохлорида на экспонирование эпитопа, узнаваемого антителами TA71.**

На 96-луночную плату сорбировали монАт TA71 в концентрации 10 мкг/мл и инкубировали в течение 16 часов при +4<sup>0</sup>С. После отмывки проводили инкубацию с 0,1% БСА в ФСБ, содержащем 0,05% Твин-20 и 25 мМ лактозы. Затем в лунки добавляли предварительно проинкубированные с гуанидингидрохлоридом биотинилированные антигены (MLA или RTA). Прединкубацию каталитических субъединиц токсинов с денатурирующим агентом проводили в 0,1 М Трис-HCl (pH 7,7) при комнатной температуре (+25<sup>0</sup>С). Концентрация гуанидингидрохлорида в инкубационной смеси составляла от 1 до 5 М. Перед добавлением к сорбированному на плате антителам объем инкубационной смеси увеличивали в 200 раз с помощью ФСБ, содержащего 0,1% БСА, 25 мМ лактозы, 0,05% Твин-20. Инкубировали 1 час при +37<sup>0</sup>С. После отмывки в лунки вносили конъюгат стрептавидин-пероксидаза (ИМТЕК, Россия). Уровень реакции оценивали с помощью орто-фенилендиамина (Sigma, США) в 0,1 М цитрат – 0,05 М фосфатном буфере (pH 5,0). Измерения проводили при ОП 492 нм на спектрофотометре Multiscan (Labsystems, Финляндия).

## **2.19. Пептидный ТИФА.**

Активность антител TA7 и TA71 по отношению к синтезированным фрагментам А-цепи вискумина проверялась методом пептидного ТИФА. Систему пептидов, фиксированных на носителе, инкубировали 1 час в 2% растворе БСА в ФСБ, содержащем 0,05% Твин-20, по 200 мкл/ на иглу при комнатной температуре (+25<sup>0</sup>С) при постоянном перемешивании. Антитела в различных концентрациях инкубировали с пептидами по 175 мкл/ на иглу в течение ночи при

4<sup>0</sup>С. Отмывку повторяли 4 раза раствором ФСБ/0,05% Твин-20 по 175 мкл/на иглу в течение 10 мин. Раствор кроличьих антител, меченных пероксидазой хрена (ИМТЕК, Россия) добавляли по 175 мкл/ на иглу в растворе 1% БСА в ФСБ/0,05% Твин-20 и инкубировали 1 час при +25<sup>0</sup>С. Повторяли процедуру отмывки. В качестве хромогенного маркера пероксидазой реакции использовали 0,5 мМ раствор 2,2'-азино-ди(3-этил)-бензоазолинсульфоновой кислоты (АБТС, Sigma, США). Субстратную смесь (0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в 0,08 М цитрат-0,02 М фосфатном буфере, рН 4,0) добавляли по 150 мкл/на иглу и инкубировали в течение 40 мин. Реакцию измеряли на спектрофотометре Multiscan (Labsystems, Финляндия) при 405 нм.

## **2.20. Оценка цитотоксической активности токсинов.**

Цитотоксическое действие токсинов определяли по выживаемости клеток в присутствии токсинов по методике, описанной ранее [Mossman et al., 1983]. Тест основан на способности дегидрогеназ живых клеток восстанавливать бледно-желтый водорастворимый 2-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенил-тетразолиум бромид (МТТ, Sigma, США) до формазана (голубые кристаллы, нерастворимые в воде). Количество образованного формазана прямо пропорционально числу живых клеток.

Клетки гибридом, пребывающих в логарифмической фазе роста, отмывали от продуцируемых ими моАт холодной средой RPMI-1640 трехкратно. Затем клетки вносили в лунки 96-луночной платы из расчета 5×10<sup>4</sup> клеток на лунку и инкубировали в 200 мкл среды RPMI-1640, не содержащей эмбриональной сыворотки телят, в присутствии различных концентраций токсинов (вискумина или рицина) при +4<sup>0</sup>С в течение часа. После инкубации клетки отмывали и инкубировали в атмосфере, содержащей 5% углекислого газа, при +37<sup>0</sup>С, в среде культивирования RPMI-1640 с добавлением 10% ЭТС в течение 48 часов. После окончания инкубации в лунки добавляли по 10 мкл раствора МТТ (концентрация 5 мг/мл) в ФСБ, инкубировали при +37<sup>0</sup>С в течение

3 часов. После центрифугирования 96-луночной платы (30 мин при 1200 g) супернатантную жидкость из лунок отбирали, осадок формазана растворяли, добавляя в лунки по 200 мкл ДМСО. Калориметрические измерения проводили на мультискане (Labsystems, Финляндия) при 540 нм. Согласно методике величина оптической плотности прямо пропорциональна числу живых клеток [Mossman et al., 1983]. Чтобы сравнить активность токсинов на разных гибридах определяли дозу токсина, вызывающую гибель 50% клеток ( $LD_{50}$ ) по отношению к контролю. За контроль (100%) принимали интенсивность окрашивания клеток, которые культивировались в отсутствие цитотоксических агентов. Контрольными клетками в экспериментах по устойчивости гибридных клеток к действию цитотоксических агентов служила миеломная линия sp2/0, а также другие гибридные клетки с известными свойствами.

## **2.21. Бесклеточная система трансляции.**

Определяли ингибирование синтеза гемоглобина в бесклеточной системе синтеза белка лизата ретикулоцитов кролика с помощью метода [Jackson et al, 1983]. Уровень синтеза белка оценивали по включению  $^3H$ -меченого лейцина после 1 часа инкубации при  $+30^{\circ}C$  в присутствии различных концентраций А-субъединицы рицина. По окончании инкубации к пробе (10 мкл) добавляли 10% ТХУ (1 мл). Кипятили при  $+100^{\circ}C$  на водяной бане в течение 2 мин (для гидролиза аминок-ацил-тРНК) и обесцвечивали раствор добавлением перекиси водорода. Затем переносили осажденный белок на фильтры путем фильтрования. Фильтры помещали в раствор сцинтиллянта и просчитывали радиоактивность с помощью сцинтилляционного счетчика Delta 300 Spectra Analytic.

При изучении влияния моАт на ферментативную активность RTA, А-субъединицу токсина предварительно инкубировали в присутствии 100-кратного молярного избытка антител, затем смесь добавляли к бесклеточной системе синтеза белка.

## 2.22. Электрофорез в системе Лэммли.

Электрофорез белков проводили в 12% и 10% ПААГ в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях. В лунки вносили 1-5мкг белка. Образцы 5-20 мкг белка растворяли в буфере, содержащем 0,125 М Трис-НСl (рН 6,8), 4% додецилсульфата натрия (SDS), 20% глицерина, 0,005% бромфенола синего и 10% 2β-меркаптоэтанола (Merck, Германия). Для проведения электрофореза в невосстанавливающих условиях образцы готовили в буфере, не содержащем меркаптоэтанол. Образцы кипятили 2 мин на водяной бане и вносили в лунки геля. Для приготовления разделяющих гелей использовали 30% смесь акриламида (АА, 29,2%) и бис-акриламида (бис-АА, 0,8%) которую разводили в соответствующее количество раз 1,5М Трис-НСl буфером (рН 8,8) и водой до конечной концентрации Трис-НСl 375 мМ. В смесь также добавляли 0,1% SDS (додецилсульфат натрия), 0,1% APS (персульфат аммония) и 0,1% TEMED (N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин, Acros, Бельгия). Для приготовления концентрирующего геля 30% смесь АА и бис-АА разводили до 5% 1М Трис-НСl буфером (рН 6,8) и водой до конечной концентрации Трис-НСl 125мМ. В смесь также добавляли 0,1% SDS, 0,1% APS и 0,1% TEMED. В работе использовали стекла 8x10см со спейсерами толщиной 0,75мм. Для проведения электрофореза использовали Трис-глициновый электродный буфер, содержащий 25 мМ Трис-НСl, 192 мМ глицин, 0,1% SDS, рН 8,3. Электрофорез проводили при постоянном токе 10 мА в режиме концентрирования и 15 мА в режиме разделения. По окончании электрофореза гель либо окрашивали, либо переносили белки на нитроцеллюлозную мембрану. Окрашивание геля проводили 0,125% (в/о) раствором Кумасси R-250 в системе этанол/уксусная кислота/вода (50/10/40) в течение 60 мин и отмывали от избытка красителя в системе этанол/уксусная кислота/вода (5/7/88).

## 2.23. Иммуноблоттинг.

Иммуноблоттинг проводили согласно методике, описанной ранее [Towbin et al., 1979]. Проводили электрофорез белков в 12 % полиакриламидном геле. Затем белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану полусухим методом в течение 1 часа при 150 мА, 20 V. Качество переноса оценивали окрашиванием части геля и окрашиванием нитроцеллюлозной мембраны 2% раствором

Ronseau S. Нитроцеллюлозную бумагу далее отмывали ФСБ с Твин-20 (0,05%) и лактозой (25 мМ) 3 раза в течение 5 мин при встряхивании, инкубировали с 3% БСА в ФСБ/Твин/лактоза в течение 2 часов при комнатной температуре (все дальнейшие инкубации и отмывки проводили в ФСБ/БСА/Твин/лактоза и ФСБ/Твин/Лактоза соответственно; при встряхивании). Далее мембрану обрабатывали монАт, меченными биотином (10 мкг/мл) в течение ночи при +4<sup>0</sup>С. Затем на мембрану наносили конъюгат стрептавидин-пероксидаза (ИМТЕК, Россия) и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. В качестве хромогенного маркера пероксидазной реакции использовали хлорнафтол (6 мг/мл в 12 ml субстратного буфера (1мл C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>ОН в 11 мл ФСБ + 20 мкл Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>)). Реакцию останавливали отмывкой ФСБ.

## **Глава 3. Результаты и обсуждение.**

### **3.1. Изучение механизма действия рицина и вискумина на стадии внутриклеточной диссоциации.**

Устойчивость гибридом, продуцирующих мoнoкoнAт против РИБ II типа, к действию токсинов определяется способностью антител ингибировать трансмембранный перенос каталитических субъединиц в цитоплазму [Kornfeld et al., 1991]. В отношении вискумина было показано, что существуют гибридомы, которые синтезируют антитела против MLA, не узнающие нативный токсин. Эпитоп для этих антител находится на каталитической субъединице вискумина в зоне контакта с B-субъединицей [Малюченко и др., 1997]. При этом клетки, продуцирующие данные антитела, устойчивы к действию вискумина. Устойчивость гибридом указывает на доступность эпитопа для антител внутри клеток (рис. 1). Таким образом, перед транслокацией происходит диссоциация токсина, в результате чего экспонируются гидрофобные области, скрытые в зоне контакта субъединиц. Это может быть важным для выхода токсина из внутриклеточных компартментов в цитоплазму. С одной стороны, токсин может использовать ретро-транслокационную систему клетки, которая экспортирует из эндоплазматического ретикулума в цитозоль белки с неправильной укладкой полипептидных цепей. С другой стороны, предполагают, что после разделения цепей в водную фазу экспонируются гидрофобные участки, что, в свою очередь, может запускать перестройки в структуре A-субъединицы. Гидрофобные участки встраиваются в мембрану, инициируя процесс транслокации.

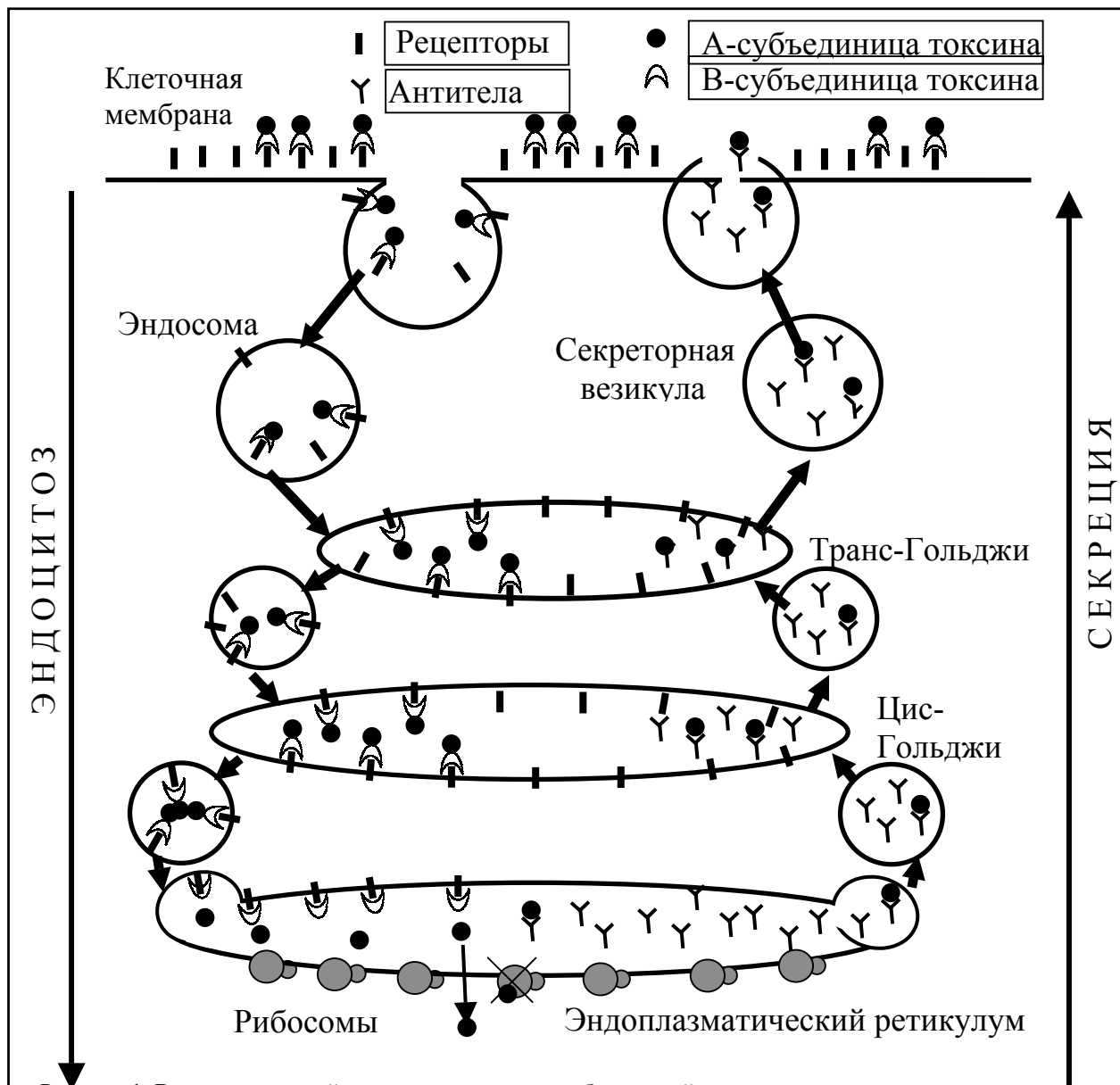


Рисунок 1. Внутриклеточный транспорт токсина в гибридной клетке.

Токсин в составе эндосом достигает комплекса Гольджи и ретроградно попадает в просвет эндоплазматического ретикулума. Синтезируемые клеткой антитела накапливаются также в просвете ЭР. Затем антитела внутри везикул доставляются антероградно через комплекс Гольджи к поверхности и секретируются. Антероградный и ретроградный транспорт осуществляются последовательным и непрерывным слиянием мембранных везикул. Пути движения токсина и антител могут пересекаться. При этом происходит образование комплексов токсин-антитело, которое приводит к ингибированию переноса каталитической субъединицы в цитозоль.



Для изучения механизма действия и пути внутриклеточного транспорта рицина нами были получены гибридомы, продуцирующие монАт против различных эпитопов А-субъединицы рицина (RTA). Среди полученных гибридом большинство продуцировали антитела к цельному токсину. Отбор наиболее активных антител проводился в двух системах скрининга (токсин на плате или токсин в растворе). В результате были выделены три типа моноклональных антител: Rch1, Rch2 и Rch5. Полученные антитела по-разному реагировали с RTA и цельным рицином (R60) в двух системах ТИФА (рис.2). МонАт Rch1и Rch2 взаимодействовали с нативными и сорбированными на плату RTA и R60. В отличие от этих антител монАт Rch5 активно связывались с изолированной А-цепью в растворе, но не взаимодействовали с рицином.

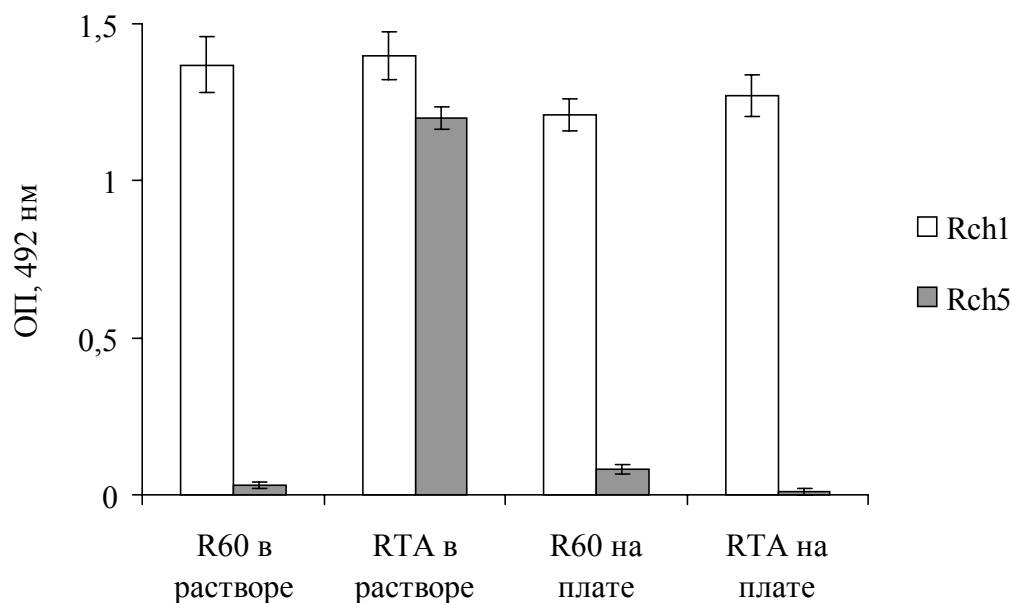


Рисунок 2. Взаимодействие монАт Rch1 и Rch5 с рицином и его изолированной А-цепью в растворе и сорбированными на плату.

Следовательно, эпитоп для этих антител расположен в области RTA, которая в целом токсине экранирована В-цепью и становится доступной только при диссоциации цепей. Важно, что при сорбции RTA на иммунологическую плату эпитоп исчезает. Свойства полученных анти-рициновых антител аналогичны свойствам ранее описанных антител MNA-серии против MLA [Малюченко и др., 1997].

Была изучена устойчивость гибридом, продуцирующих монАт против А-субъединицы рицина. Контрольными клетками в этих экспериментах служила гибридома MNA5, не синтезирующая антител против данного токсина. Было показано, что клетки гибридом Rch1 и Rch5 отличались устойчивостью по отношению к R60 (рис. 3). Концентрация рицина, вызывающая гибель 50% клеток ( $LD_{50}$ ) на контрольных гибридомных клетках составила  $5 \times 10^{-13}$  М.  $LD_{50}$  для рицина на клетках Rch1 и Rch5 отличалась от  $LD_{50}$  контрольных клеток

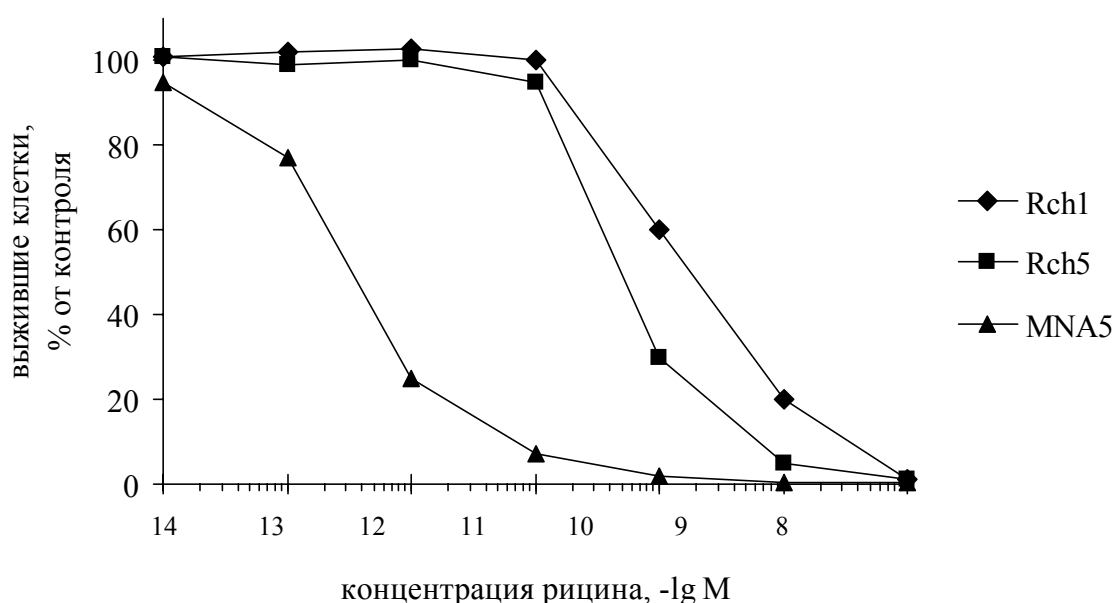


Рисунок 3. Цитотоксическое действие рицина на клетки гибридом Rch1, Rch5 и MNA5.

более чем в 100 раз и составляла  $2 \times 10^{-10}$  и  $5 \times 10^{-11}$  М соответственно. При этом чувствительность клеток Rch1 и Rch5 к действию вискумина не отличалась от чувствительности контрольных клеток. Вискумин использовался в качестве контроля на неспецифическую устойчивость гибридом к действию токсинов. Сходные результаты получены ранее для гибридом против MLA [Малюченко и др., 1997].

Интересно, что монАт Rch1 и Rch5 (рис. 4), как и монАт MNA9 и MNA5 против MLA, не оказывали влияния на ингибирование токсинами белкового синтеза в бесклеточных белок-синтезирующих системах. Ферментативная активность RTA и MLA была практически одинаковой. Активность голотоксинов была почти в 1000 раз ниже, чем изолированных А-цепей.

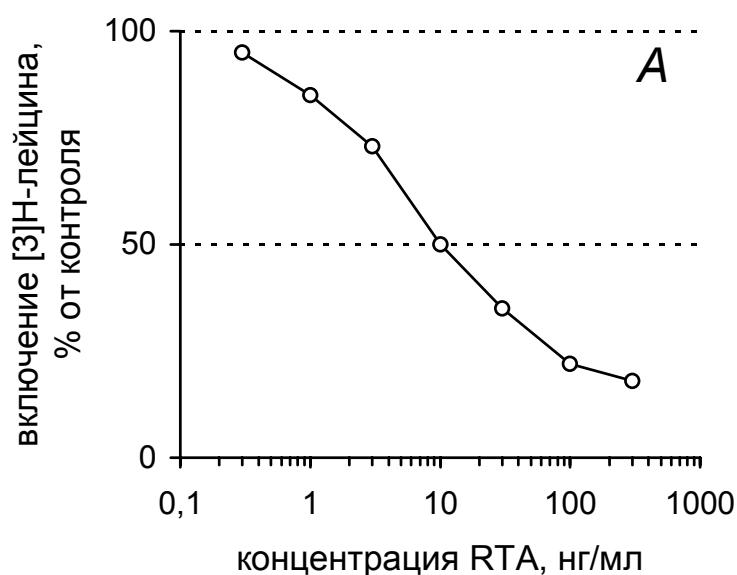
Следовательно, В-цепь рицина или вискумина стерически экранирует не только эпитопы Rch5 и MNA5, но также ферментативно-активный центр А-цепи. Размер межцепочечных доменов MLA и RTA (около 800 Å) больше, чем размер эпитопов MNA5 и Rch5 [Sweeney E.C. et al., 1998].

Таким образом, В-цепь в голотоксине ингибирует каталитическую активность А-цепи, но моАт не оказывают такого эффекта.

Повышенная устойчивость гибридом к действию рицина обусловлена нарушением процессов ретроградного транспорта и/или транслокации токсина в цитозоль клетки.

Блокирование ретроградного транспорта происходит за счет взаимодействия антител с токсинами во внутриклеточных компартментах. Устойчивость гибридомы Rch5 может быть свидетельством того, что антитела связываются с молекулой токсина после восстановления А- и В-субъединиц.

Известно, что для реализации каталитической активности по отношению к рибосоме А-субъединица должна освободиться от В-субъединицы путем



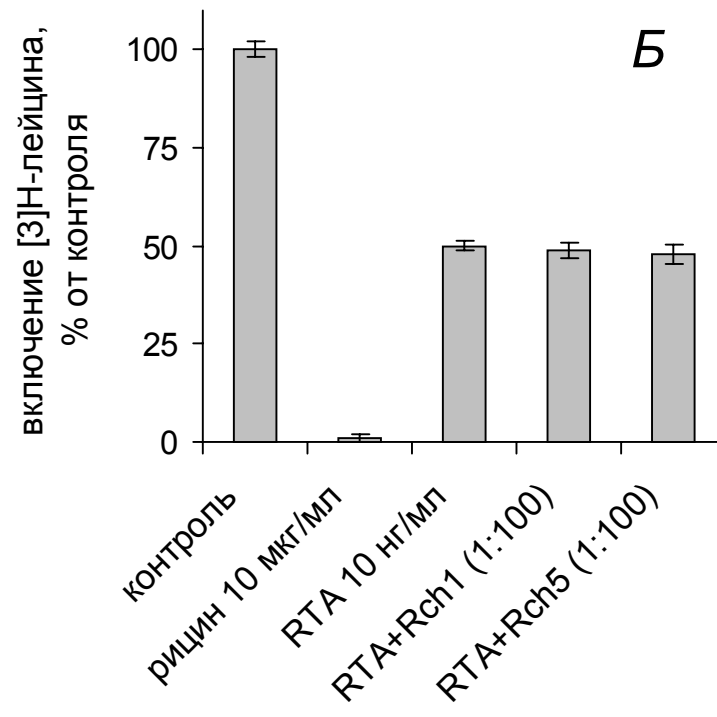


Рисунок 4. Рибосом-инактивирующее действие А-субъединицы рицина в бесклеточной системе синтеза белка (А) и влияние монАт на ЛД<sub>50</sub> РТА (Б). В качестве контроля брали пробу, куда не добавлялась РТА.

восстановления S-S связей, так как в составе цельного токсина каталитическая активность А-субъединицы низка [Barbieri L. et al., 1993]. Таким образом, устойчивость гибридомы Rch5 подтверждает, что экспонирование эпитопа Rch5 и, следовательно, диссоциация рицина на А- и В-цепи происходит до трансмембранного переноса токсина в цитозоль (рис. 5).

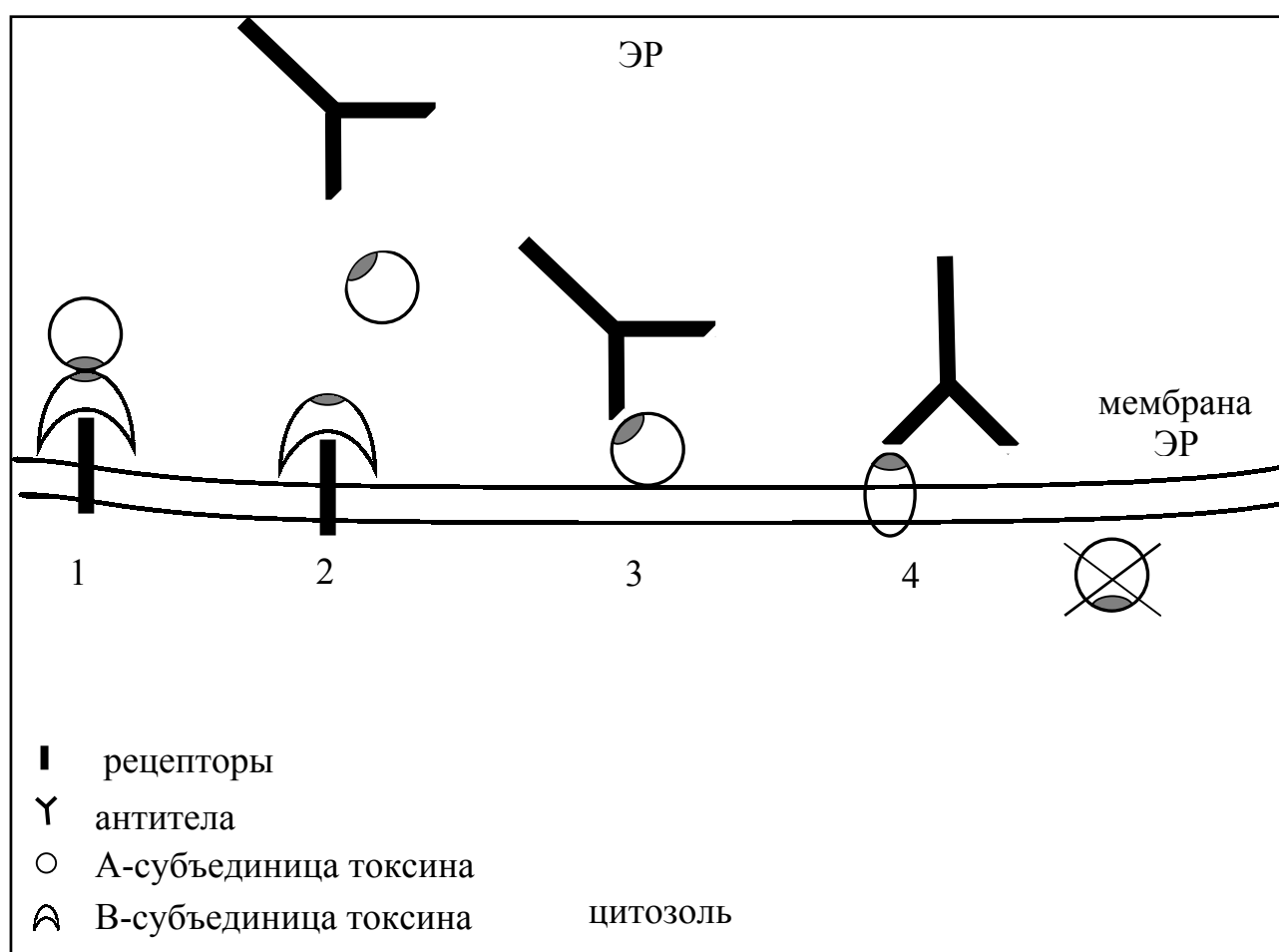


Рисунок 5. Ингибирование трансмембранного переноса каталитической субъединицы с помощью антител в клетках гибридом, устойчивых к действию токсина.

Диссоциация токсина должна происходить в компартменте, в котором присутствуют антитела. Известно, что часть молекул эндоцитированного токсина (около 5%), не попавшая в лизосомы и не вернувшаяся путем рециклинга на поверхность клетки, попадает в аппарат Гольджи и далее, ретроградно, в просвет ЭР [Lord J.M. and Roberts L.M., 1996]. Синтезируемые клеткой антитела накапливаются также в просвете ЭР, а затем доставляются в комплекс Гольджи и далее к клеточной поверхности. Скорее всего, данные компартменты и являются наиболее вероятным местом взаимодействия токсина с синтезируемыми гибридной клеткой антителами. Таким образом, резистентность гибридом связана со взаимодействием внутриклеточных антител против R60, синтезированных *de novo* для секреции, с рицином либо в цистернах эндоплазматического ретикулума, либо в области секреторного компартмента пре-Гольджи [Youle and Colombatti, 1987]. Аффинность монАт не влияет на чувствительность гибридом к цитотоксическому действию токсина [Малюченко Н.В. и др., 1999]. Однако отличия в чувствительности гибридом, продуцирующих монАт против цельного рицина и его изолированной А-цепи, могут быть результатом различного времени связывания антител с токсинами внутри клетки из-за того, что внутриклеточная диссоциация голотоксинов является более поздним событием внутриклеточного транспорта.

Известно, что вискумин обладает более низкой цитотоксической активностью (примерно в 30 раз) по сравнению с рицином. Т.к. В-цепи токсинов стерически экранируют ферментативно активные центры А-цепей (см. выше), логично предположить, что разница в цитотоксической активности рицина и вискумина связана с характером и силой взаимодействия субъединиц токсинов между собой.

Дитиотреитол (ДТТ) вызывает восстановление дисульфидной связи между А- и В-цепями токсинов, что должно приводить к диссоциации

субъединиц рицина и вискумина. Однако кроме ковалентной дисульфидной связи субъединицы удерживаются вместе за счет нековалентных гидрофобных взаимодействий. Для сравнения эффективности межсубъединичных взаимодействий в молекулах рицина и вискумина к сорбированным на плату асиалофетуину (ASF) или моноклональным антителам против А-субъединиц токсинов добавляли предварительно проинкубированные с ДТТ токсины, после чего в лунки вносили вторые биотинилированные анти-токсиновые антитела. Асиалофетуин – гликопротеин с концевой галактозой – может служить моделью рецептора для растительных РИБ II, т.к. взаимодействует с галактозо-связывающими центрами В-субъединиц токсинов. С помощью данной системы оценивали количество диссоциировавших молекул токсинов.

Из рисунка 6 видно, что нековалентные взаимодействия между А- и В-субъединицами у вискумина сильнее, чем у рицина. Это согласуется с данными рентгеноструктурного анализа - показано, что межцепочечная область в вискумине как минимум на 20% больше, чем в ричине (у которого она равна 1600 Å) и содержит больше гидрофобных аминокислот [Sweeney E.C. et al., 1998]. Более сильные межсубъединичные взаимодействия у вискумина могут объяснить снижение цитотоксической активности этого токсина по сравнению с ричином.

По-видимому, диссоциация субъединиц является необходимой для транслокации каталитической субъединицы в цитозоль. Этапы восстановления дисульфидной связи и последующая диссоциация субъединиц являются универсальной стадией для цитотоксического действия РИБ II. Однако, место и механизм этого процесса пока неясен.

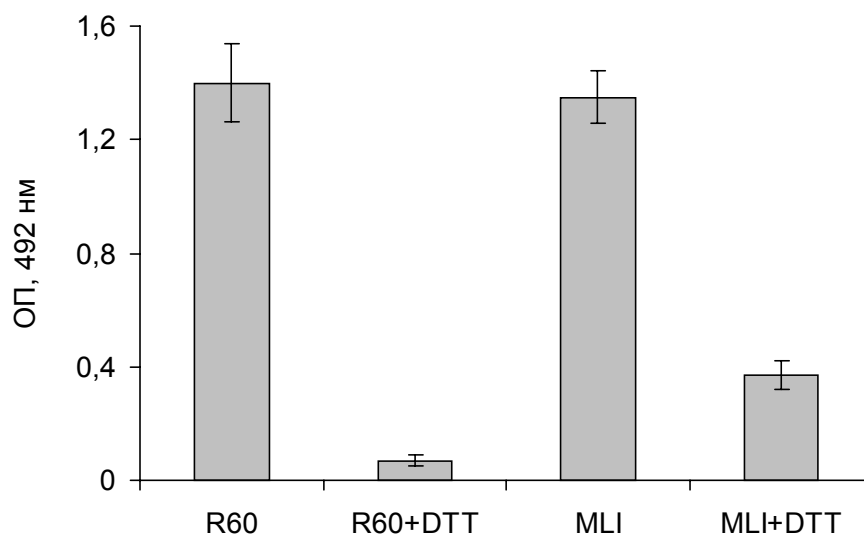


Рисунок 6. Диссоциация субъединиц рицина и вискумина под действием ДТТ, детектируемая с помощью монАт Rch1 и MNA9.

Используя различные комбинации полученных монАт серии Rch с другими имеющимися анти-рициновыми антителами в сэндвич-ИФА, удалось подобрать тест-систему для количественного определения рицина. Таким образом, на основе пары монАт Rch-1 и 2RK-1 была впервые разработана высокочувствительная система для определения концентраций рицина и конъюгатов на его основе в биологических образцах и исследуемых препаратах (рис. 7). Система позволяет выявлять около 0,5 нг токсина.



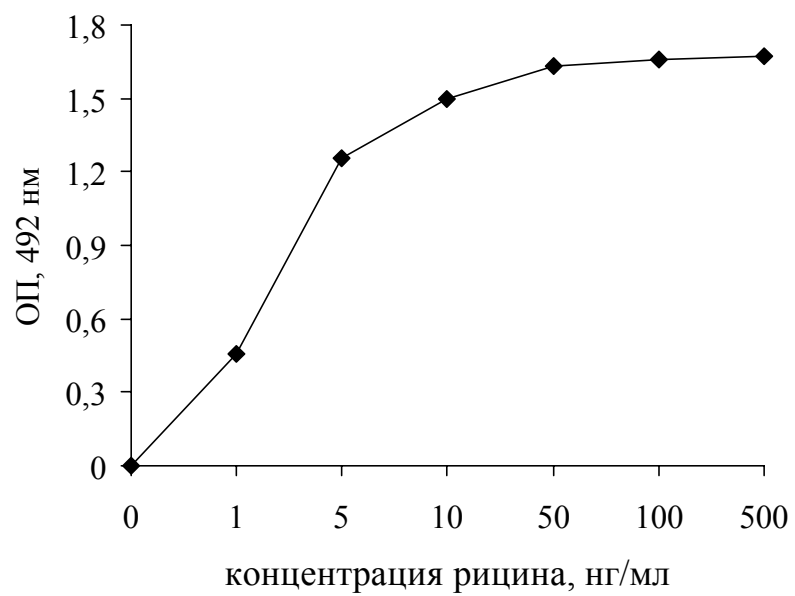


Рисунок 7. Тест-система для определения концентрации рицина в биологических образцах.

### **3.2. Ингибирующее действие вискумина на гибридомы, синтезирующие антитела против его связывающей субъединицы.**

Известно, что иммунотоксины на основе цельных токсинов более активны, чем иммунотоксины на основе их каталитических субъединиц. Это может говорить о важной роли В-субъединицы в проявлении цитотоксических свойств этих белков. Показано, что В-цепь обеспечивает связывание токсина с рецепторами на клеточной мембране и его последующую интернализацию. Она может защищать А-субъединицу от деградации под действием эндосомальных и лизосомальных ферментов во время внутриклеточного транспорта токсина, что повышает вероятность транслокации А-цепи в цитоплазму [Bilge et al., 1994]. Предполагают, что В-субъединица может транспортировать А-субъединицу до места транслокации благодаря взаимодействию с галактозо-содержащими белками, циркулирующими между транс-Гольджи и ЭР. Однако роль В-цепи в самом процессе транслокации А-субъединицы в цитозоль не совсем ясна. Существует гипотеза, что В-субъединица, взаимодействуя с мембраной ЭР, подготавливает условия для трансмембранного переноса А-цепи.

Для изучения роли В-цепи в процессе транслокации А-субъединицы была получена серия гибридом, продуцирующих моноклональные антитела против связывающей субъединицы вискумина (MLB).

Для получения гибридом применялись две схемы иммунизации. В одной схеме в качестве антигена использовали изолированную MLB. В другой – цельный вискумин. При этом для наиболее вероятного получения гибридом, синтезирующих антитела против MLB, токсин вводили в смеси с монАт MNA9, узнающими А-субъединицу вискумина. В таком комплексе антитела снижают иммуногенность А-цепи.

Эффективность иммунизаций проверяли по активности сывороток в двух системах скрининга: в первой - антигены (MLB и MLI) были сорбированы на иммунологическую плату, во второй - антигены находились в растворе. Сыворотки мышей, иммунизированных изолированной MLB, были более активны, чем сыворотки мышей, иммунизированных нативным вискумином в составе иммунных комплексов с монАт MNA9. Это может объясняться тем, что иммуногенность В-цепи в составе цельного вискумина гораздо ниже, чем его изолированной В-цепи.

Для получения гибридом из каждой группы были выбраны мыши, сыворотки которых имели самые высокие титры – 1:100000 и 1:10000 при первой и второй схемах иммунизации соответственно. В результате слияния иммунных селезеночных лимфоцитов мыши, иммунизированной MLB с миеломой sp2/0 были получены 374 ГАТ-устойчивых клон. Из них нами были отобраны четыре гибридомы (mlb-5, -6, -7 и -9), антитела которых в различной степени реагировали с нативной и сорбированной формами вискумина и его В-цепи.

Из 533 ГАТ-устойчивых гибридом, полученных при слиянии лимфоцитов мыши, иммунизированной смесью MLI+MNA9, с миеломой две продуцировали антитела против В-субъединицы и одна против А-субъединицы. Оказалось, что антитела против В-цепи, синтезируемые двумя гибридомами, направлены к одному эпитопу. Поэтому для дальнейшего изучения нами была выбрана одна из гибридом (Mbch-1).

Таким образом, в ходе иммунизаций, дальнейшего получения и изучения свойств антител нами были отобраны пять клонов: mlb-5, mlb-6, mlb-7, mlb-9 и Mbch-1.

Исследуемые монАт в различной степени реагировали с нативной и сорбированной формами вискумина и его изолированной В-субъединицы (таблицы 1 и 2, данные получены на основании ТИФА).

Общая черта полученных монАт – способность взаимодействовать с сорбированной на иммунологическую плату MLB (рис. 8Б). При этом способность данных антител взаимодействовать с сорбированной формой цельного токсина сильно варьирует (рис. 8А).

Специфичность	Название антител
сорбированная =нативная MLB	mlb-5, mlb-6, mlb-9
сорбированная > нативная MLB	mlb-8
сорбированная < нативная MLB	Mbch-1
сорбированная, но не нативная MLB	mlb-7

Таблица 1. Реакция монАт с сорбированной и нативной формами В-субъединицы вискумина.

Специфичность	Название антител
только сорбированный MLI	mlb-6
сорбированный < нативный MLI	mlb-5, mlb-9, Mbch-1
не реагируют с MLI	mlb-7

Таблица 2. Реакция монАт с сорбированной и нативной формами вискумина.

С наибольшей аффинностью с такой формой антигена реагируют монАт mlb-6.

Способность монАт mlb-9 и Mbch-1 реагировать с сорбированной формой MLI снижена по сравнению с mlb-6. Но из всех исследуемых монАт только антитела mlb-9 и Mbch-1 взаимодействуют с высокой эффективностью и с изолированной биотинилированной MLB, и с биотинилированным цельным токсином (рис. 9А, Б).

Реакция антител mlb-5 с сорбированной формой MLI ниже, чем у антител mlb-9 и Mbch-1 (рис. 8А). По-видимому, данный эпитоп в молекуле цельного токсина частично экранирован. Эпитоп mlb6 доступен для антител на ML1 и MLB, сорбированных на пластике (рис. 8А,Б), частично экспонирован на поверхности изолированной MLB в растворе (рис. 9Б) и полностью экранирован в молекуле MLI в растворе (рис. 9А).

Особое внимание обращают на себя монАт mlb-7, которые не взаимодействуют с сорбированной формой вискумина (рис. 8А). Кроме того, эпитоп mlb-7 оказывается скрытым как на поверхности изолированной MLB (рис. 9Б), так и в молекуле нативного токсина (рис. 9А). По-видимому, данный эпитоп находится на участке MLB, который контактирует с MLA. Тот факт, что антитела узнают только сорбированную форму В-цепи, говорит о том, что при взаимодействии с мембраной В-субъединица вискумина может претерпевать конформационные изменения, в результате которых появляются скрытые ранее эпитопы. Это согласуется с данными о том, что В-субъединица рицина может находиться в состоянии «расплавленной глобулы», представляющей собой стабильное состояние, промежуточное между нативной конформацией и полностью развернутой [Тоневицкий и др., 1991]. Наличие промежуточных

состояний для молекул токсинов, возможно, тесно связано с функциональными особенностями этих белков. Подобные конформационные изменения возможны *in vivo* в ходе внутриклеточного транспорта белка при взаимодействии с мембранами клеточных органелл. Таким образом, MLB, возможно, подготавливает условия и способствует трансмембранному переносу каталитической А-субъединицы в цитозоль.

Из представленных данных следует, что монАт mlb-5,-6,-7,-9 взаимодействуют с разными участками молекулы MLB. Очень похожими по своей способности реагировать с антигенами оказываются монАт mlb-9 и Mbch-1. Тем не менее, реакция данных антител с ML-изоформами (лектинами MLII и MLIII) различается (рис. 10). Как видно из рисунка, антитела Mbch-1 и mlb-9 сравнимо реагируют с MLIII, но эффективность взаимодействия монАт Mbch-1 с MLII значительно ниже по сравнению с монАт mlb-9.

На рисунке 11 представлены результаты конкурентного анализа монАт между собой. Контролем конкуренции служила реакция антител на себя. Как видно из рисунка, при взаимодействии с сорбированной MLB, монАт mlb-9 вытесняют монАт mlb-5 (рис. 11Б). В свою очередь, монАт mlb-5 создают стерические препятствия биотинилированным монАт mlb-9 (рис. 11Д). Таким образом участки сорбированной на пластике MLB, с которыми взаимодействуют монАт mlb-5 и mlb-9, частично перекрываются.

Сходно ведет себя пара монАт mlb-6/mlb-7 – антитела mlb-6 почти полностью вытесняют монАт mlb-7 (рис. 11А), но антитела mlb-7 вытесняют монАт mlb-6 лишь частично (рис. 11В). МонАт mlb-5 частично вытесняются mlb-7 и mlb-6 антителами (рис. 11А, В), но сами вытеснять данные антитела они не могут (рис. 11Б).

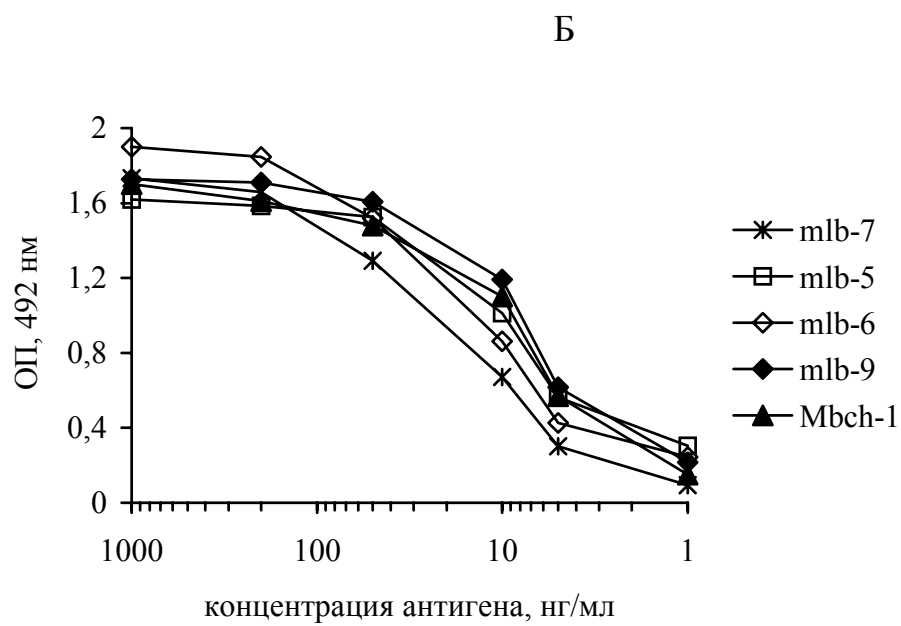
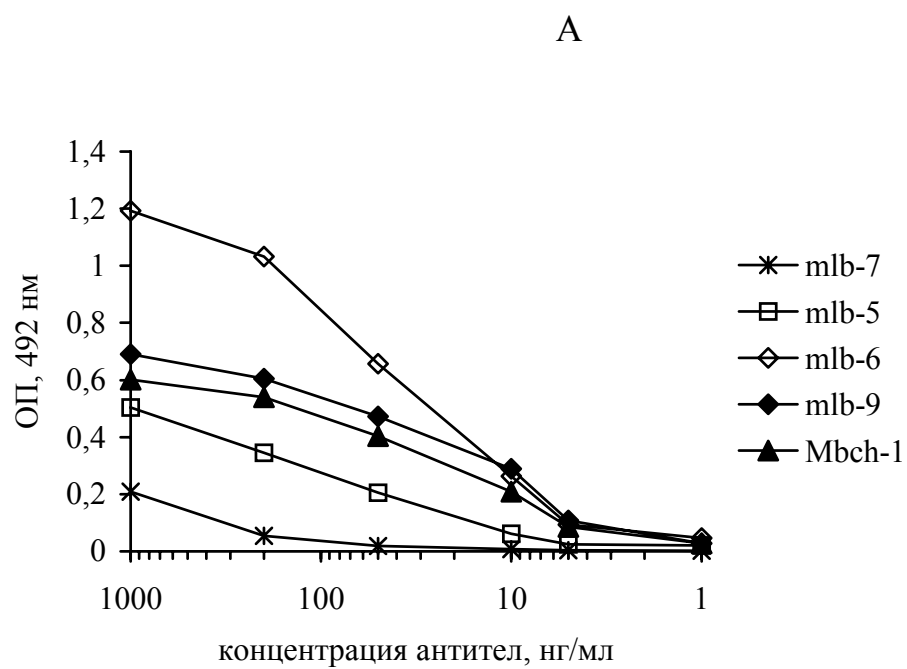


Рисунок 8. Взаимодействие антител с антигенами, сорбированными на плате. А – с MLI, Б – с MLB.

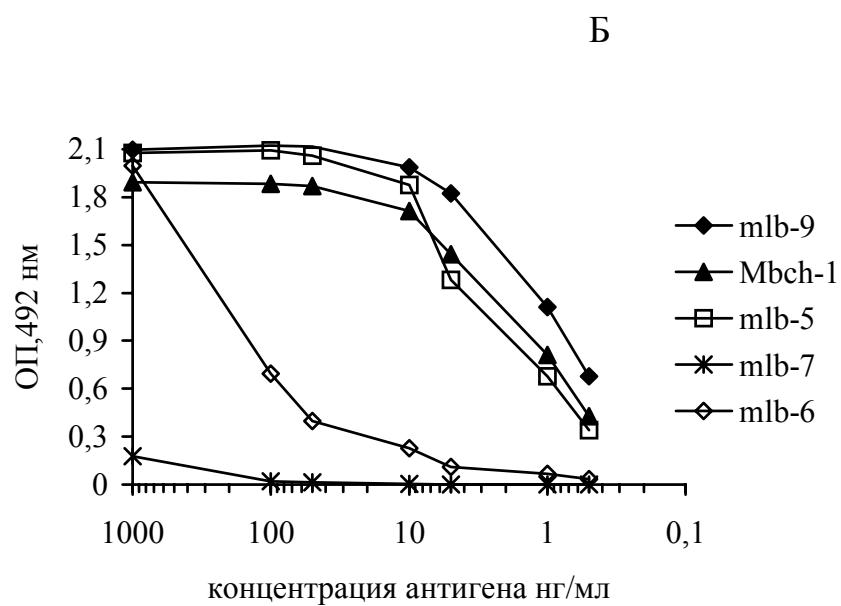
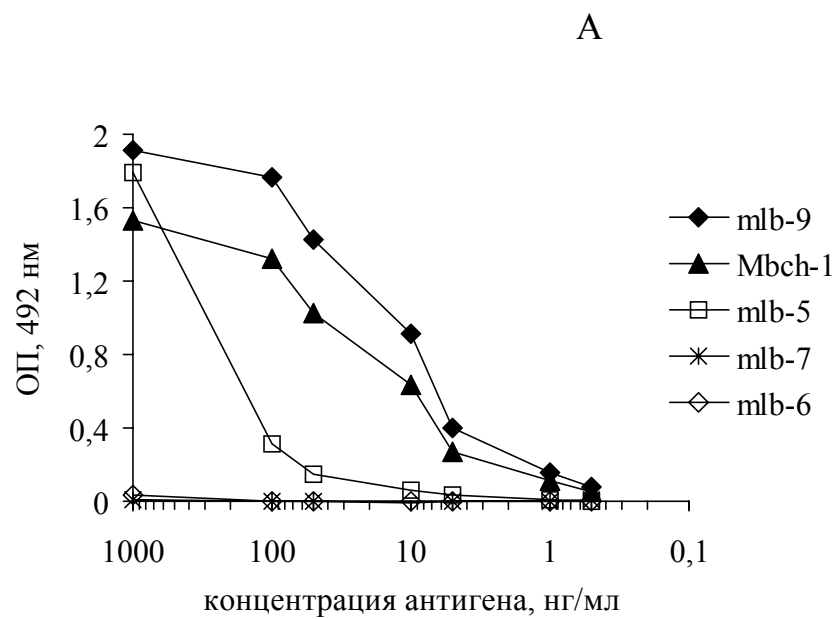


Рисунок 9. Взаимодействие антител с антигенами в растворе: А – с MLI, Б – с MLB.

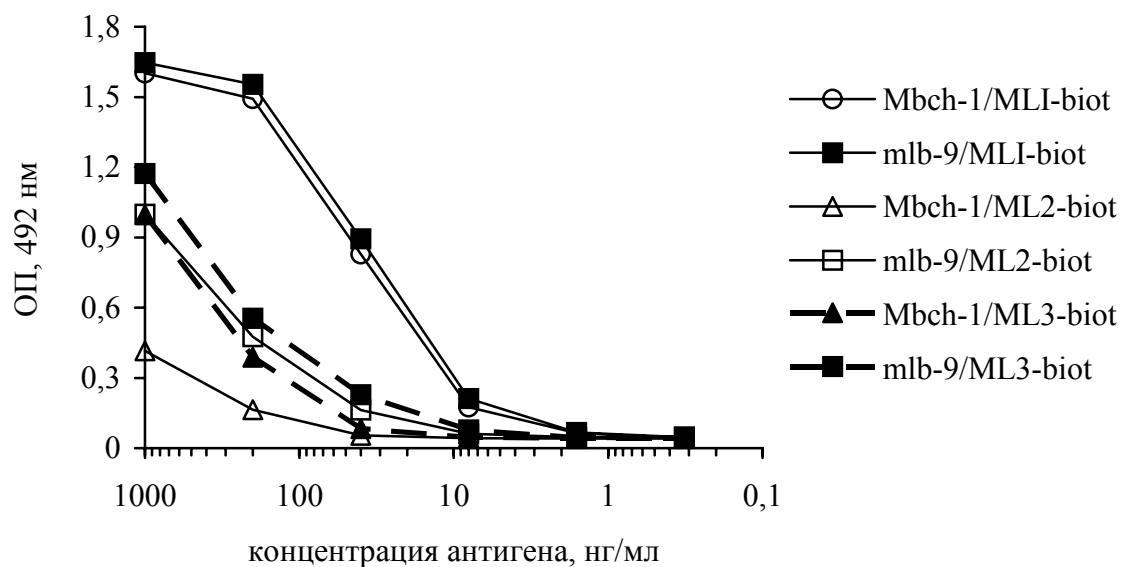


Рисунок 10. Взаимодействие монАт mlb-9 и Mbch-1 с лектинами MLII и MLIII.

Антитела mlb-9 не вытесняют антитела Mbch-1 (рис. 11Г), также как и антитела Mbch-1 не способны вытеснять антитела mlb-9 (рис. 11Д).

Следовательно, данные монАт направлены к разным эпитопам молекулы MLV.

Таким образом, с помощью конкурентного анализа антител между собой, было показано, что эпитопы для большинства антител частично перекрываются (рисунок 12).

Была изучена устойчивость гибридом, синтезирующих антитела против MLV, к цитотоксическому действию вискумина. Контрольными клетками в этих экспериментах служила миелома sp2/0, не продуцирующая антител против MLI, а также клетки описанной ранее гибридомы TB12 [Tonevitsky et al., 1995], устойчивой к действию вискумина. В отличие от гибридомы TB12 ( $LD_{50} = 5 \times 10^{-11}$  М), полученные гибридомы были неустойчивы к действию токсина.  $LD_{50}$



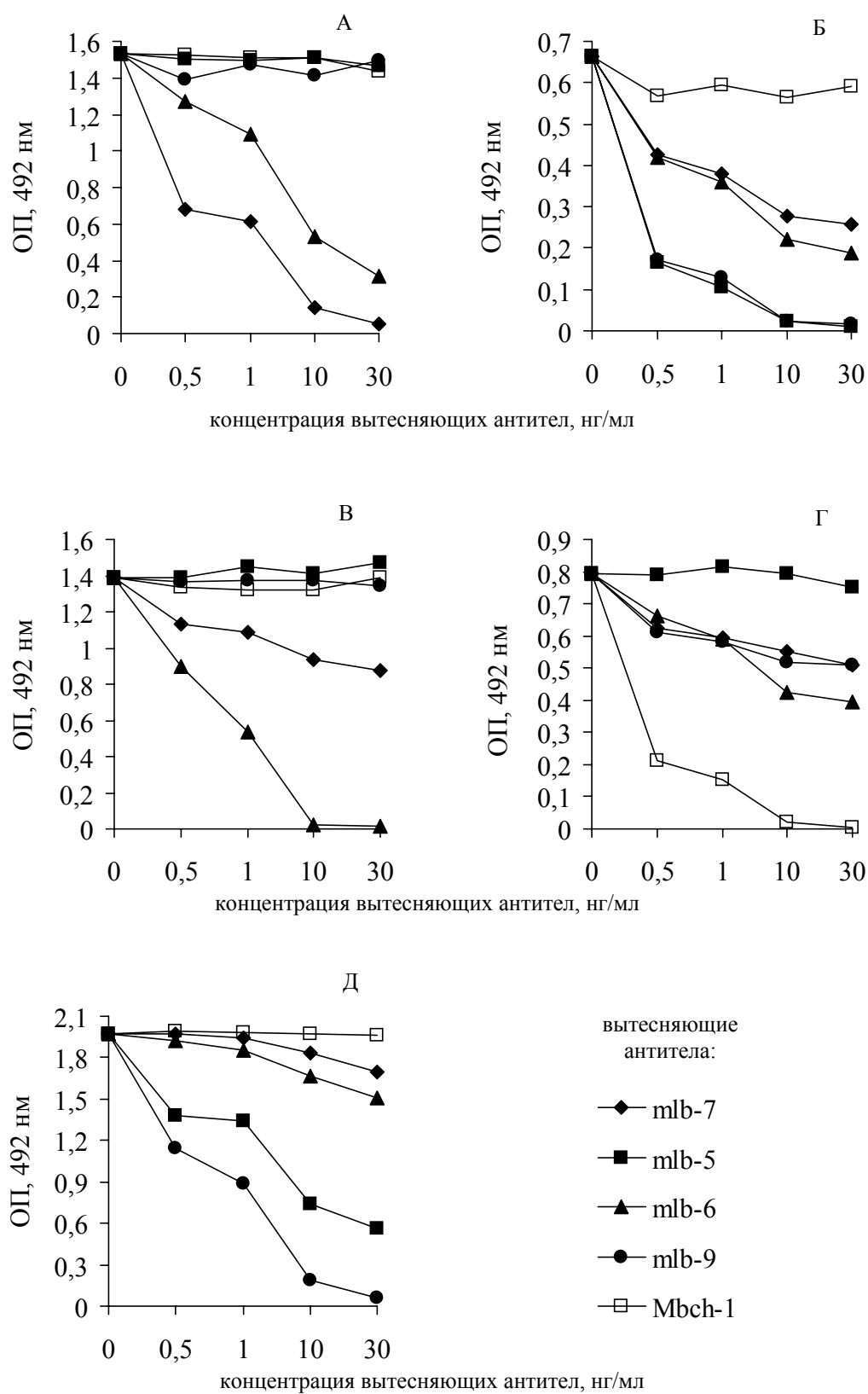


Рисунок 11. Конкурентный иммуноферментный анализ монАт: А – mlb-7, Б – mlb-5, В – mlb-6, Г – Mbch-1, Д – mlb-9.

составляла  $\sim 10^{-12}$  М (таблица 3), что сравнимо с ЛД<sub>50</sub> контрольной линии sp2/0.

На рисунке 13 показано цитотоксическое действие вискумина на клетки Mbch-1.

Как говорилось выше, устойчивость гибридом к цитотоксическому действию РИБ II определена внутриклеточным взаимодействием токсинов и антител [Агаров et al., 1999]. Отсутствие протективного эффекта полученных антител может быть связано с тем, что участки В-цепи, взаимодействующие с антителами, не влияют как на взаимодействие MLB с рецепторами, так и на транслокацию А-цепи.

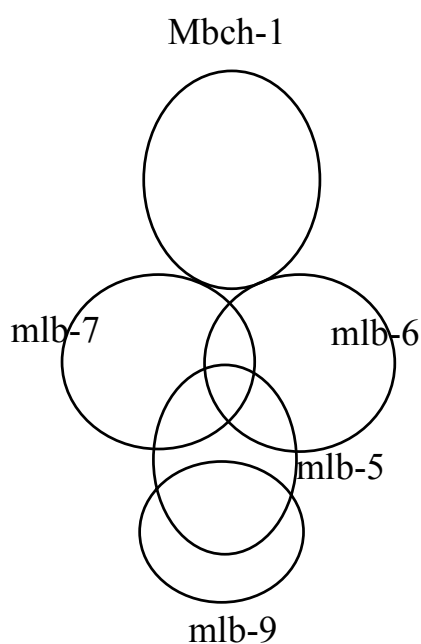


Рисунок 12. Предполагаемая схема расположения эпитопов на MLB, узнаваемых антителами серии mlb и Mbch-1.

	Mbch-1	mlb-5	mlb-6	mlb-7	mlb-9	TB12	sp2/0
ЛД <sub>50</sub> , вискумин	$2,0 \times 10^{-12}$	$3,3 \times 10^{-12}$	$3,0 \times 10^{-12}$	$1,8 \times 10^{-12}$	$3,9 \times 10^{-12}$	$5,0 \times 10^{-11}$	$10^{-12}$

Таблица 3. Значения ЛД<sub>50</sub> клеток гибридом, секретирующих антитела против MLB, определенные для вискумина.

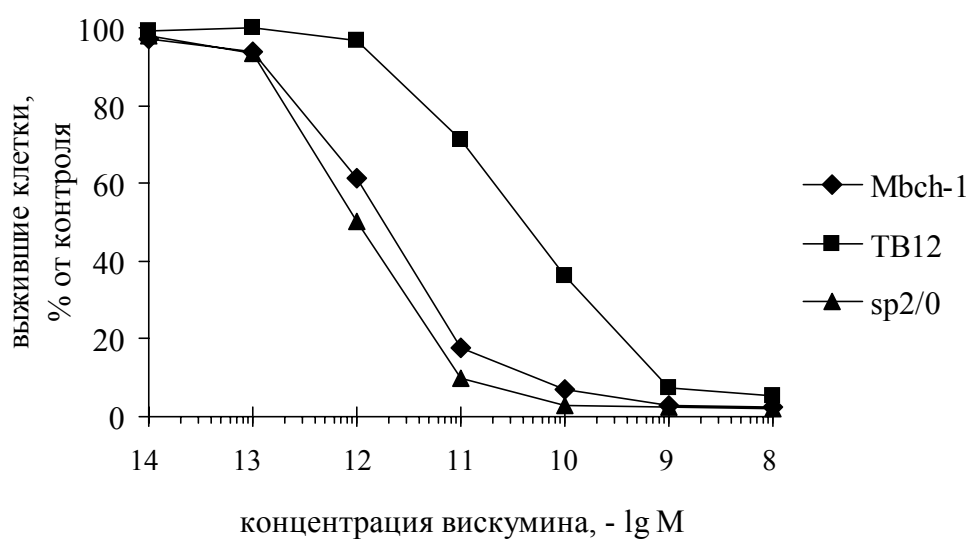


Рисунок 13. Цитотоксическое действие вискумина на клетки гибридомы Mbch-1.

МонАт были протестированы на способность ингибировать связывание MLB с асиалофетуином. В конкурентном иммуноферментном анализе на сорбированный на плату ASF наносили вискумин, предварительно проинкубированный с биотинилированными антителами. Соотношение токсина и антител было 1:100. Как видно из рисунка 14 монАт Mbch-1 не препятствовали связыванию асиалофетуина с В-цепью вискумина. Следовательно, эпитоп на MLB, узнаваемый монАт Mbch-1, расположен таким образом, что данные антитела не создают стерических препятствий для связывания токсина с рецептором. Сходные данные получены и для антител mlb-5, -6, -7 и -9.

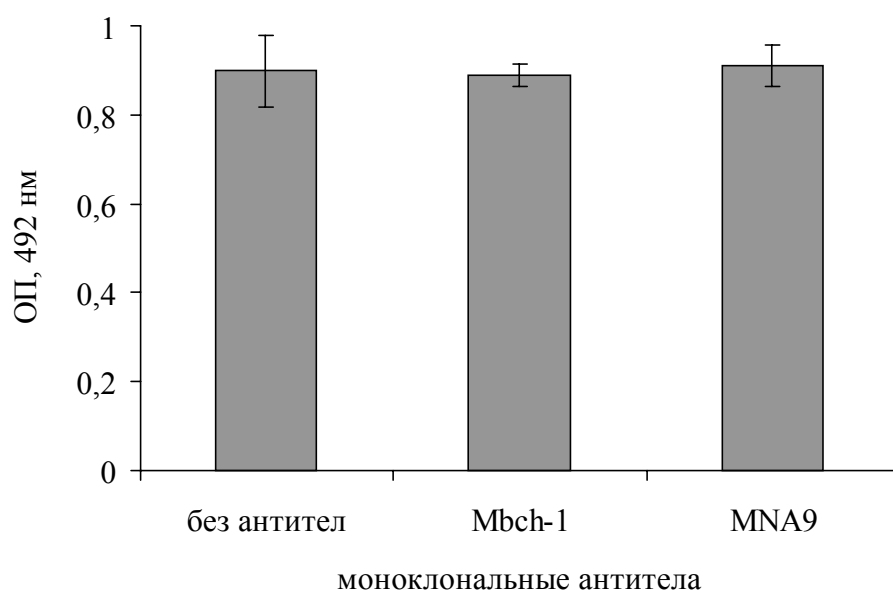


Рисунок 14. Влияние антител Mbch-1 на взаимодействие MLB с асиалофетуином.

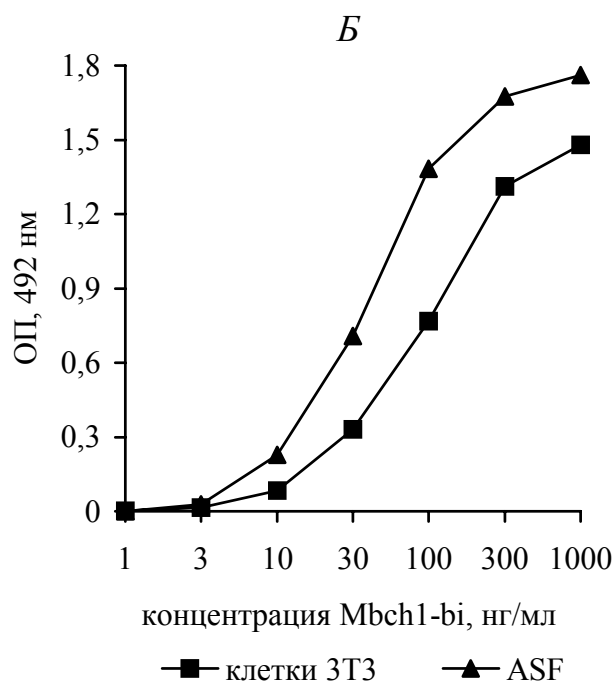
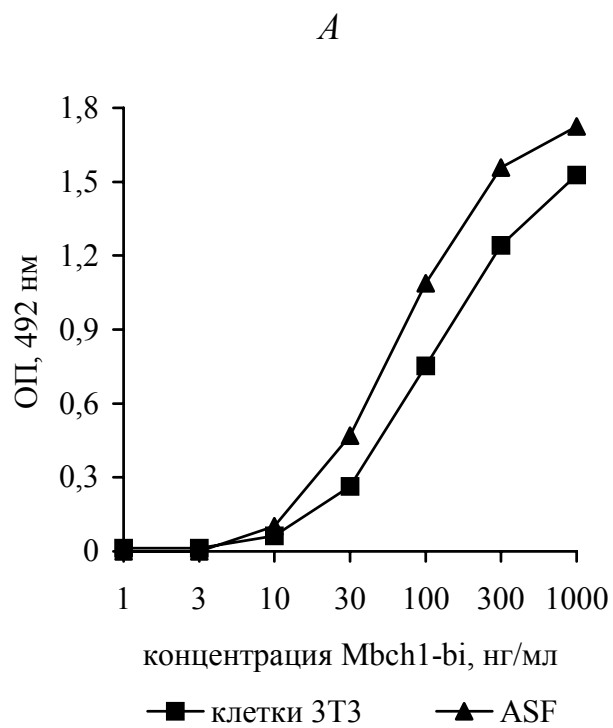


Рисунок 15. Доступность вискумина (*A*) или его изолированной В-цепи (*Б*), находящихся в комплексе с рецептором, для антител Mbch-1.

Возможно, что эпитопы, распознаваемые данными антителами, становятся недоступными в образовавшемся комплексе токсин-рецептор.

Была оценена доступность вискумина или его изолированной В-субъединицы, находящихся в комплексе с рецептором, для антител. MLI или MLB связывались с сорбированными на пластике клетками 3Т3 или асиалофетуином и к такому комплексу добавлялись биотинилированные антитела. Как видно из рисунка 15, доступность эпитопа, узнаваемого антителами Mbch-1, практически не отличается для комплексов рецептор-токсин и асиалофетуин-токсин. Аналогичные результаты получены и для антител mlb-5, -6, -7 и -9. Полученные данные указывают на доступность В-субъединицы, находящейся в комплексе с рецептором, для антител.

Необходимо отметить, что описаны гибридомы (например, TB12), синтезирующие антитела против MLB, устойчивые к действию вискумина. По-видимому, устойчивость гибридомных клеток определяется вытеснением токсина из комплекса с рецептором. Это подтверждается тем, что монАт TB12 способны частично подавлять связывание вискумина или его В-цепи с асиалофетуином [Tonevitsky et al., 1995]. Более того, добавление антител TB12 к комплексу ASF-токсин приводит к диссоциации комплекса [Tonevitsky et al., 1995].

Неустойчивость гибридом mlb-5, mlb-6, mlb-7, mlb-9 и Mbch-1 к цитотоксическому действию вискумина говорит о том, что В-субъединица является вектором для доставки А-субъединицы в компартмент, из которого происходит ее транслокация, но, по-видимому, не участвует в ее трансмембранном переносе.

Каждая полученная гибридома представляет интерес для создания модельных систем, позволяющих изучать особенности внутриклеточного транспорта вискумина. Однако для эффективного количественного анализа MLB, вискумина и его изоформ необходимо иметь пару монАт, взаимодействующих с

различными участками антигена. Ранее была разработана и применяется до сих пор тест-система на основе моноклональных антител ТА5 (антитела, узнающие А-субъединицу вискумина) и ТВ12 (анти-MLB антитела). С помощью этой системы можно детектировать примерно 5 нг антигена.

Пара антител: mlb-9 и Mbch-1 - была использована нами для создания более чувствительной тест-системы, выявляющей MLI в фармакологических препаратах и в биологических образцах, в частности, в экстрактах омелы белой (рис. 16). Как видно из рисунка, с помощью этой пары можно выявить до 1 нг вискумина.

Благодаря высокой степени гомологии аминокислотной последовательности вискумина и ML-токсинов (MLII и MLIII), между данными белками возможна перекрестная реакция. Однако следует отметить, что полученная тест-система обладала строгой специфичностью к вискумину – MLII и MLIII (лектины – изоформы MLI, содержащиеся в листьях Омелы белой) с ее помощью не выявлялись (рис. 17).

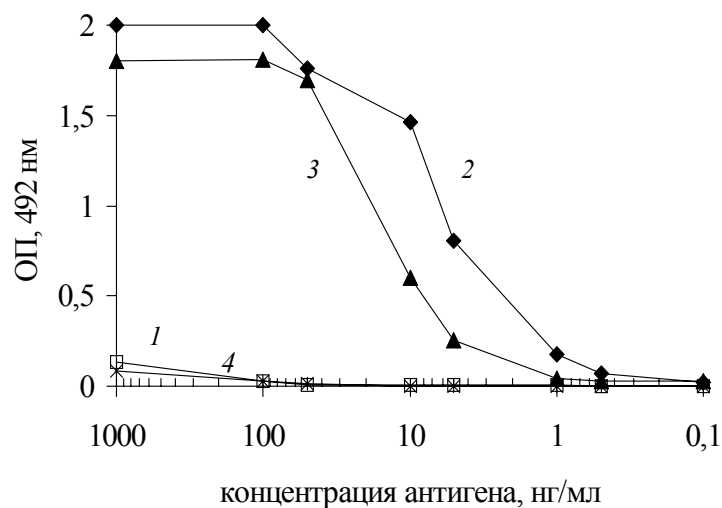


Рисунок 16. Тест-система для выявления MLI и MLB (2 и 3 соответственно) с помощью пары монАт – Mbch-1 (на плате) и mlb-9. В качестве контроля использовалась конкуренция антител Mbch-1 с самими собой (1 – MLI, 4 – MLB).



Рисунок 17. Специфичность тест-системы на основе монАт mlb9 и Mbch-1 для вискумина.



### **3.3. Конформационные изменения А-субъединицы вискумина при внутриклеточной транслокации.**

В ходе внутриклеточного транспорта и во время транслокации А-субъединиц в цитозоль происходит взаимодействие токсинов с гидрофобными мембранами органелл. Известно, что субъединицы рибосом-инактивирующих белков во время прохождения через мембрану могут находиться в состоянии «расплавленной глобулы». При такой частично развернутой конформации возможно появление скрытых ранее эпитопов. Конформация RTA и MLA, при которой экспонируются такие эпитопы, может быть важной для проявления биологической активности каталитических субъединиц токсинов.

Для изучения конформационных изменений А-субъединицы вискумина перед транслокацией были использованы гибридомы, продуцирующие антитела против денатурированной формы вискумина. Т.к. устойчивость гибридом к действию токсина определяется взаимодействием антител и токсина внутри компартментов, то изменение конформации токсина внутри клетки, т.е. появление новых антигенных эпитопов, можно детектировать по уменьшению его цитотоксической активности на клетках гибридомы, продуцирующей антитела против этого эпитопа.

Конкурентный анализ семи монАт между собой позволил разделить антитела на две группы, обладающие различной специфичностью. В первую группу вошли шесть монАт, во вторую – одно монАт ТА7. В дальнейших экспериментах использовали по одному монАт из каждой группы - ТА7 и ТА71. Важно, что оба антитела взаимодействовали с MLA и MLI, сорбированными на плате, и с денатурированными антигенами, но не реагировали с нативными белками (рис. 18).

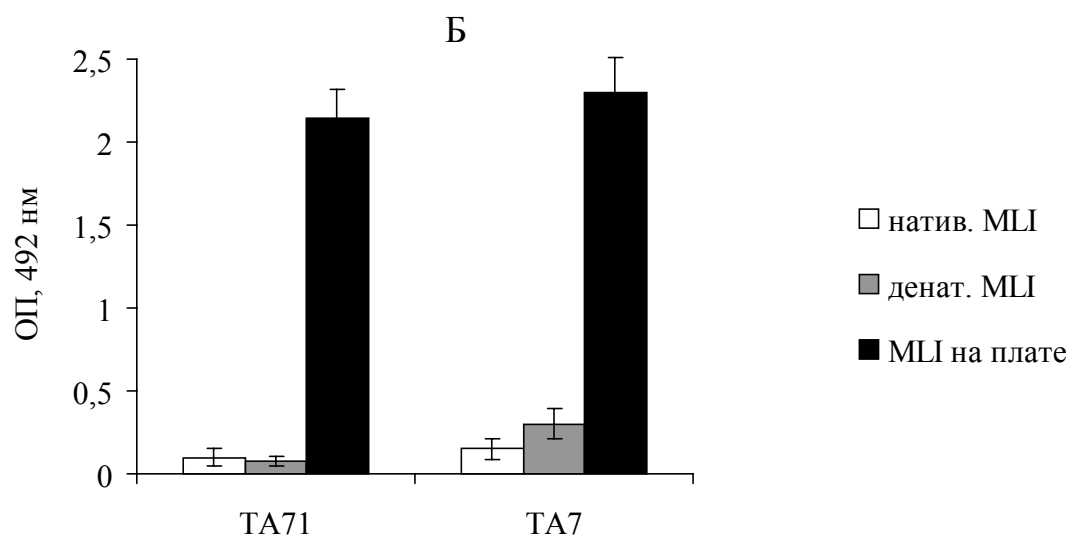
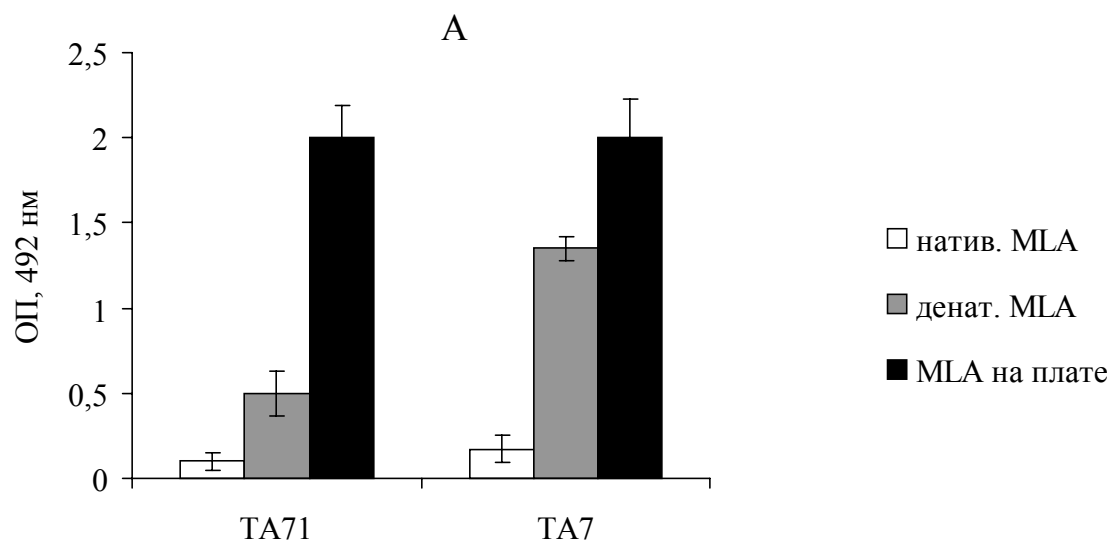


Рисунок 18. Взаимодействие моноклональных антител TA71 и TA7 с сорбированными на плате, денатурированными и нативными MLA (А) и MLI (Б).

Интересно, что гибридома TA71, синтезирующая соответствующие монАт, была неустойчива к действию токсинов. ЛД<sub>50</sub> данной гибридомы к вискумину составляла  $1,5 \times 10^{-12}$  М токсина (рис.19), ЛД<sub>50</sub> к рицину –  $2,5 \times 10^{-13}$  М токсина, что в обоих случаях сравнимо с ЛД<sub>50</sub> контрольной линии sp2/0. Рицин использовался в качестве контроля на неспецифическую устойчивость гибридом к действию токсинов. Таким образом, в эндоплазматическом ретикулуме изучаемый эпитоп недоступен для взаимодействия с антителами.

Это подтверждается данными по эффективности выброса вискумина клетками гибридомы TA71 по сравнению с клетками гибридомы MNA9, устойчивой к действию токсина. Как видно из рисунка 20, количество токсина, выбрасываемого из клеток, практически не отличается у миеломы sp2/0 и гибридомы TA71. В то же время эффективность выброса токсина клетками гибридомы MNA9 в три раза ниже, чем у TA71 и sp2/0. Наличие токсина в супернатанте клеток, преинкубированных с вискумином, объясняется рециклингом MLI. Пониженное количество MLI в супернатанте клеток MNA9, скорее всего, связано с “арестом” токсина во внутриклеточных компартментах клеток данной гибридомы. По-видимому, внутри клетки монАТ MNA9 связываются с А-субъединицей эндоцитированного вискумина, в результате чего становится невозможным трансмембранный перенос А-субъединицы. Отсутствие разницы в содержании токсина в супернатантах клеток TA71 и sp2/0 говорит о том, что монАт TA71 не взаимодействуют с антигеном во внутриклеточных компартментах. Антитела к денатурированной форме вискумина внутри клетки могут не распознавать свой эпитоп по ряду причин: 1) конформационные изменения, при которых начинают экспонироваться эпитопы, не происходят во время транспорта вискумина, 2) изменения такого рода происходят, но время существования «развернутых» форм вискумина недостаточно для взаимодействия с антителами. Это может происходить в том случае, когда антитела и токсины разделены расстоянием внутри везикулы и токсин, разворачиваясь для трансмембранного перехода, успевает уйти из области взаимодействия с антителами, например, в результате погружения в липидный бислой. Кроме того, отсутствие протективного эффекта антител на устойчивость клеток может наблюдаться даже в случае образования комплекса токсина с антителами внутри клетки, если участок белка, взаимодействующий с антителами, не влияет на функциональную активность токсина.

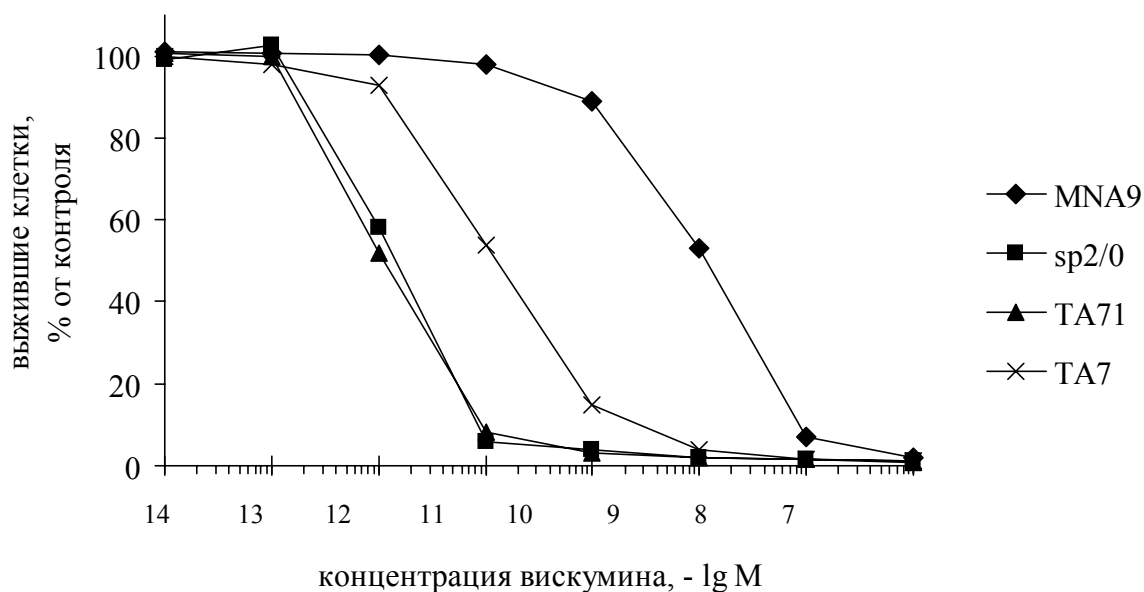


Рисунок 19. Устойчивость гибридом TA71, TA7, MNA9 и миеломы sp2/0 к цитотоксическому действию MLI.

В отличие от гибридомы TA71 клетки гибридомы TA7 были в 15 раз более устойчивы к цитотоксическому действию вискумина ( $LD_{50} = 3 \times 10^{-11}$ ) по сравнению с контрольной линией (рис. 19), но также не обладали устойчивостью к действию рицина ( $LD_{50} = 4 \times 10^{-13}$ ). Устойчивость гибридомы TA7 к вискумину может определяться специфичностью продуцируемых антител. Однако, отсутствие сильного протективного эффекта TA7 антител может объясняться, например, недолговременным существованием промежуточных конформационных состояний вискумина, в которых эпитоп для TA7 становится доступен.

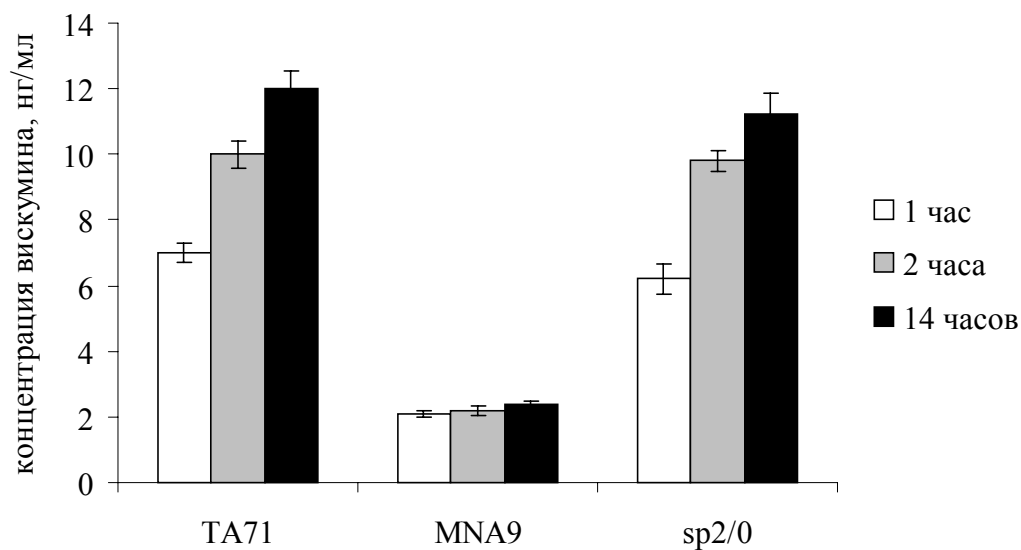


Рисунок 20. Выделение вискумина клетками, предобработанными MLI-биотин.

С данными по устойчивости TA7 гибридомы согласуются данные по влиянию TA7 антител на слияние азолектиновых липосом [Agapov et al., 1999; Малюченко и др., 2000]. Было показано, что монАт TA7 снижают слияние липосом, вызванное А-субъединицей вискумина. Следовательно, TA7 антитела могут узнавать А-субъединицу вискумина, находящуюся в контакте с фосфолипидным бислоем, и ослаблять взаимодействие MLA с ним.

Наличие или отсутствие углеводов в составе эпитопов TA7 и TA71 оценивали по взаимодействию монАт с негликозилированными формами антигена. Наряду с вискумином в листьях Омелы белой содержатся два родственных токсина, обозначаемые как Mistletoe lectin II (MLII) и Mistletoe lectin III (MLIII). Характерной особенностью MLIII является отсутствие углеводов в составе его каталитической субъединицы [Soler M.H. et al., 1997]. Как видно из рисунка 21, монАт взаимодействуют с MLIII, а также с рекомбинантной MLA (r-MLA), полученной из *E. coli*, и, следовательно, негликозилированной. Таким образом, углеводы не входят в состав изучаемых

эпитопов, поскольку эти эпитопы представлены на дегликозилированных молекулах - рекомбинантной MLA и на изоформе вискумина MLIII.

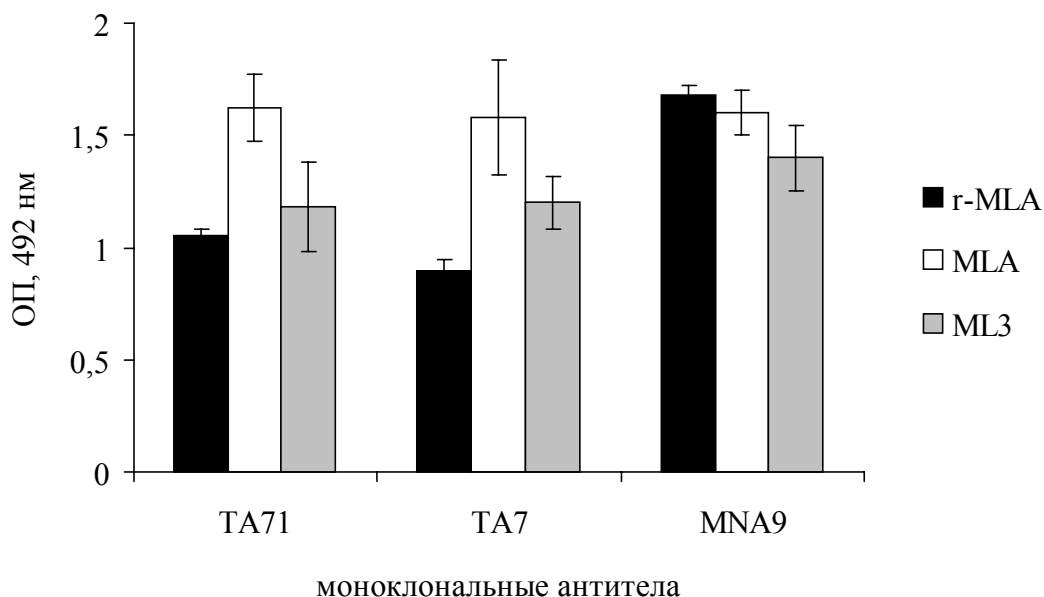


Рисунок 21. Взаимодействие монАт с рекомбинантной MLA и MLIII.

Интересно отметить, что монАт TA71 (но не TA7) узнавали ризин и его изолированную А-субъединицу, сорбированные на плате. Взаимодействие антител TA71 с R60 и RTA объясняется большой степенью гомологии ризина и вискумина (41%) и сходством их третичных структур [Sweeney et al., 1993].

Обработка токсинов гуанидингидрохлоридом приводит к появлению эпитопа TA71. Гуанидингидрохлорид или солянокислый гуанидин является очень сильным денатурирующим агентом. Он конкурирует с пептидными и функциональными группами белка за водородные связи и нарушает структуру воды. В дополнение к этому раствор данного реагента обладает высокой ионной силой - гуанидин является очень сильным основанием и практически всегда полностью протонирован, поэтому в концентрированных его растворах исключаются внутрибелковые электростатические взаимодействия и, следовательно, устраняется еще один из факторов, способных стабилизировать пространственную структуру белка.

Сравнивали условия экспонирования эпитопа TA71 на RTA и MLA. На плату сорбировали монАт. Затем в лунки вносили предварительно проинкубированные с

денатурирующим агентом биотинилированные антигены. Чтобы избежать разрушения антиген-связывающих центров антител под действием гуанидингидрохлорида, перед нанесением раствор разводили в 200 раз.

Из рисунка 22 видно, что экспонирование эпитопа на молекулах RTA и MLA вызывается разной концентрацией денатурирующего агента: эпитоп на MLA появляется при концентрации гуанидингидрохлорида 3 М, а на RTA - при концентрации 2М. Это может быть связано с разной скоростью ренатурации у RTA и MLA. Поскольку при прохождении через клеточную мембрану необходимо разворачивание субъединиц [Argent et al., 1994; Argent et al., 2000], их способность возвращаться к исходной конфигурации может быть важной для восстановления ферментативной активности. Различия в скорости ренатурации могут влиять на цитотоксическое действие этих двух токсинов и иммунотоксинов, синтезированных на их основе.

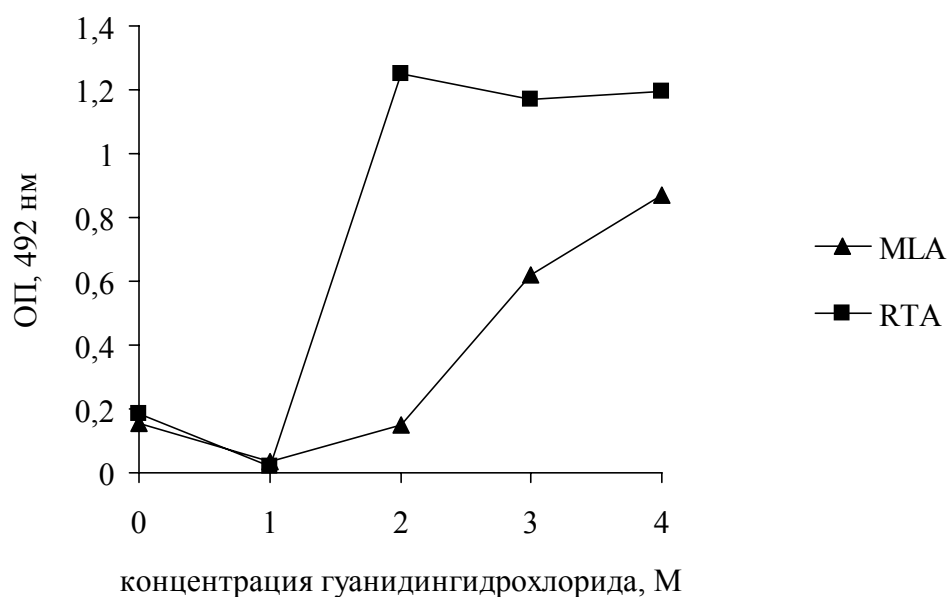


Рисунок 22. Взаимодействие монАт с биотинилированными MLA и RTA после инкубации в течение 1 часа при +25°C в присутствии гуанидингидрохлорида.

В дальнейшем, проводили более детальное исследование направленности антител ТА7 и ТА71. Основываясь на данных о взаимодействии полученных антител с денатурированной формой вискумина, мы предположили, что эпитопы, распознаваемые монАт ТА7 и ТА71,

являются полностью или частично линейными. Чтобы установить аминокислотные последовательности эпитопов, исследовали взаимодействие антител с синтетическими фрагментами MLA. Панель из 65 перекрывающихся октапептидов была любезно предоставлена сотрудницей ГУ БМХ им. В.Н. Ореховича РАМН Е.И. Колесановой. Пептиды были синтезированы по результатам предсказания, проведенного с учетом особенностей вторичной и третичной структуры вискумина, вариабельности аминокислотных последовательностей в ряду гомологичных белков и ряда других факторов и соответствовали наиболее иммуногенным линейным участкам MLA. В качестве положительного контроля брали сыворотку иммунной мыши, спленоциты которой использовались для гибридизации. Было показано, что антитела TA71 взаимодействуют с участком 93-103 (эпитоп AETHL) на MLA. Антитела TA7 с высокой эффективностью взаимодействовали с участком 98-108 (эпитоп FTGTT) на MLA. Данные по пептидному анализу согласуются с данными конкурентного ТИФА, в котором наблюдались частичные перекресты (не более 20%) между эпитопами, узнаваемыми монАт TA7 и TA71 (рис. 23). Согласно

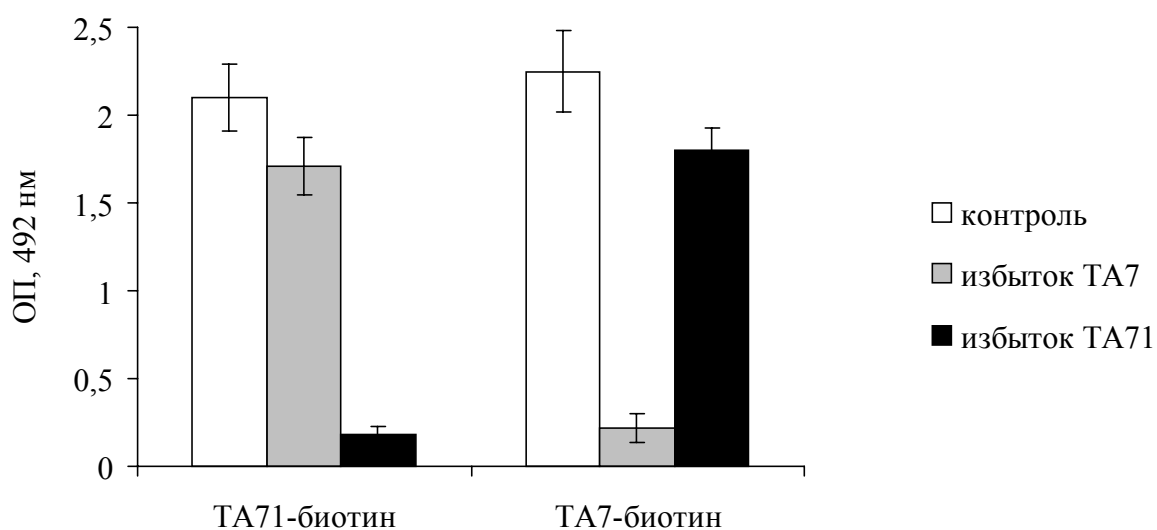


Рисунок 23. Конкурентное ингибирование взаимодействия биотинилированных монАт с сорбированным ML1 стократным молярным избытком вторых антител. В качестве контроля определяли реакцию биотинилированных TA7 и TA71 с вискумином в отсутствии вторых антител.



результатам рентгено-структурного анализа аминокислотные последовательности эпитопов для данных антител скрыты в нативной молекуле вискумина [Krauspenhaar et al., 2002].

Итак, с помощью мoнАт, узнающих ненативную А-субъединицу вискумина, было получено свидетельство о разворачивании вискумина перед транслокацией. Представленные данные согласуются с ранее опубликованными данными о том, что при введении ковалентной дисульфидной связи в А-субъединицу рицина, то есть при жесткой фиксации конформации белка, способность токсина транслоцироваться резко понижается, что в конечном итоге приводит к снижению его цитотоксической активности [Beaumelle et al., 1997]. Факторы, вызывающие изменение конформации каталитической субъединицы внутри везикул клетки, неизвестны. Разворачивание токсина внутри клеточных компартментов может происходить либо в результате взаимодействия белка с шаперонами, если механизм транслокации токсинов существует за счет белков-переносчиков клетки, либо при прямом контакте с мембраной, если транслокация осуществляется собственными «силами» токсина. Дальнейшее изучение механизма транслокации токсинов позволит объяснить роль «развернутых» форм данных белков в ходе внутриклеточного транспорта. С помощью моноклональных антител, реагирующих с эпитопом ТА71, возможно получение дополнительной информации о процессах ренатурации у каталитических субъединиц вискумина и рицина.

### **Выводы:**

1. Получены и охарактеризованы монАт, узнающие изолированную А-субъединицу рицина. Показано, что эпитоп для антител Rch5 расположен в области контакта с В-субъединицей. Устойчивость гибридомы Rch5 к цитотоксическому действию рицина указывает на то, что появление эпитопа, а следовательно, диссоциация токсина на субъединицы происходит до трансмембранного переноса каталитической субъединицы в цитоплазму.
2. Получена панель монАт против связывающей субъединицы вискумина. Антитела не ингибируют связывания токсина с рецептором. Гибридомные клетки не обладают устойчивостью к цитотоксическому действию вискумина. Это указывает на то, что связывающая субъединица токсина является только вектором для А-субъединицы и не участвует в ее трансмембранном переносе.
3. Показано, что монАт ТА7 узнают эпитоп, который отсутствует в нативном белке и появляется при денатурации вискумина. Гибридома ТА7 устойчива к цитотоксическому действию вискумина, что свидетельствует о взаимодействии антител и токсина до трансмембранного перехода каталитической субъединицы в цитозоль. Таким образом, устойчивость гибридомных клеток свидетельствует об изменении конформации А-субъединицы вискумина и появлении нового эпитопа в ходе внутриклеточного транспорта.

### Список литературы.

1. Агапов И.И., Тоневицкий А.Г., Малюченко Н.В., Мойсенович М.М., Гусарова В.Ю. // Диссоциация каталитической и связывающей субъединиц вискумина при транслокации через мембрану. // ДАН, Т. 363(6), стр. 823-826, 1998
2. Верносова Е.А., Конарева Н.В., Михайлов А.М. и др. // Пространственная структура молекулы *Viscum album* в кристаллическом состоянии. // Кристаллография, Т. 43, стр. 739-744, 1998
3. Малюченко Н.В., Гусарова В.Ю., Мойсенович М.М., Егорова С.Г., Агапов И.И., Комолов И.С., Тоневицкий А.Г., Кирпичников М.П. // Устойчивость гибридом к растительному токсину вискумину не зависит от аффинности антител. // ДАН, Т. 367(1), стр. 126-9, июль 1999
4. Малюченко Н.В., Мойсенович М.М., Егорова С.Г., Агапов И.И., Колесанова Е.Ф., Тоневицкий А.Г. // Разворачивание А-субъединицы вискумина в ходе внутриклеточного транспорта токсина. // Молекулярная биология, Т 34(1), 2000
5. Малюченко Н.В., Мойсенович М.М., Егорова С.Г., Гусарова В.Ю., Агапов И.И., Пфюллер У., Айфлер Р., Тоневицкий А.Г. // Получение моноклональных антител к различным детерминантам А-субъединицы *Mistletoe lectin I*. // Биотехнология, № 7-8, стр. 8-18, 1997

6. Agapov I.I., Tonevitsky A.G., Maluchenko N.V., Moisenovich M.M., Bulah Y.S., Kirpichnikov M.P. // Mistletoe lectin A-chain unfolds during the intracellular transport. // FEBS Lett, V. 464(1-2), PP. 63-6, 1999
7. Agapov I.I., Tonevitsky A.G., Moysenovich M.M., Maluchenko N.V., Weyhenmeyer R., Kirpichnikov M.P. // Mistletoe lectin dissociates into catalytic and binding subunits before translocation across the membrane to the cytoplasm. // FEBS Lett, V. 452(3), PP. 211-214, 1999
8. Agapov I.I., Tonevitsky A.G., Shamshiev A.T., Pohl E., Pohl P., Palmer R.A., Kirpichnikov M.P. // The role of structural domains in RIP II toxin model membrane binding. // FEBS Lett, V. 402, PP. 91-93, 1997
9. Androlewicz M.J., Anderson K.S., Cresswell P. // Evidence that transporters associated with antigen processing translocate a major histocompatibility complex class I-binding peptide into the endoplasmic reticulum in an ATP-dependent manner. // Proc. Natl. Acad. Sci USA, V. 90, PP. 9130-9134, 1993
10. Argent R.H., Parrott A.M., Day P.J., Roberts L.M., Stockley P.G., Lord J.M., Radford S.E. // Ribosome-mediated folding of partially unfolded ricin A-chain. // J Biol Chem, V. 275(13), PP. 9263-9, Mar 31, 2000
11. Argent R.H., Roberts L.M., Wales R., et al // Introduction of a disulfide bond into ricin A-chain decreases the cytotoxicity of the ricin holotoxin. // J. Biol. Chem., V. 269, PP. 26705-26710, 1994

12. Barbieri L., Battelli M.G., Stirpe F. // Ribosome-inactivating proteins from plants. // *Biochim. Biophys. Acta.*, V. 1154, pp. 237-282. 1993
13. Beaumelle B., Alami M., Hopkins C.R.// ATP-dependent translocation of ricin across the membrane of purified endosomes. // *J. Biol. Chem.*, V. 268, PP 23661-23669, 1993
14. Bilge A., Howell-Clark J., Ramakrishnan S., et al // Degradation of ricin A-chain by endosomal and lysosomal enzymes: the protective role of ricin B-chain. // *Ther. Immunol.*, V. 1, PP. 197-204, 1994
15. Bilge A., Warner C., Press O. //Translocation of ricin A-chain into proteoliposomes reconstituted from Golgi and endoplasmic reticulum. // *J. Biol. Chem.*, V. 270, PP. 23720-23725, 1995
16. Blik V.D., Redelmeier T.E., Damke H. et al // Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation. // *J. Cell Biol.*, V. 122, PP. 553-565, 1993
17. Bradley D., Piatak M., Lane J.A., McGuire P.M. // Site-directed mutagenesis at amino terminus of recombinant ricin A chain. // *Int. J. Peptide protein Res.*, V. 34(1), PP. 2-5, 1989
18. Brodsky J.L., McCracken A.A.//Er-associated and proteasome-mediated protein degradation: how two topologically restricted events came together. // *Trends Cell Biol.*, V. 7, PP. 151-156, 1997
19. Brunger A.T. // Structural insights into the molecular mechanism of calcium-dependent vesicle-membrane fusion. // *Current Opinion in Structural Biology*, V.11, PP. 163-173, 2001

20. Chaudhary V.K., Jinno Y., FitzGerald D., Pastan I. // Pseudomonas exotoxin contains a specific sequence at the carboxyterminus that is required for cytotoxicity. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, V. 87, PP. 308-312, 1990
21. Collwan J.F., Stangel M., Kuhn L.A., et al. // Transferrin Receptor internalization sequence YXRF implicates a tight turn at the structural recognition motif for endocytosis. // Cell, V. 63, PP 1061-1072, 1990
22. Cosson P., Letourneur F. // Coatamer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs. // Science, V. 263, PP. 1629-1631, 1994
23. Cosson P., Letourneur F. // Coatamer (COP I)-coated vesicles: role in intracellular transport and protein sorting. // Curr.Opin.Cell Biol., V. 9, PP. 484-487, 1997
24. Damke H., Baba T., van der Bliek A.M., Schmid S.L. // Clathrin-independent pinocytosis is induced in cells overexpressing a temperature-sensitive mutant of dynamin. // J. Cell Biol., V. 131, PP. 69-80, 1995
25. Davidson R.L., Gerald P.S.// Induction of mammalian somatic cell hybridization by polyethyleneglycol. // Methods Cell Biol., V. 15, P.325, 1977
26. Davis A.F., Bai J., Fasshauer J.L., Wolowick M.J., Lewis J.L., Chapman E.R. // Kinetics of synaptotagmin responses to  $\text{Ca}^{2+}$  and assembly with the core SNARE complex onto membranes. // Neuron, V. 24, PP. 363-376, 1999

27. Day, P.J., Owens, S.R., Wesche, J., Olsnes, S., Roberts, L.M., Lord, J.M. // An interaction between ricin and calreticulin that may have implications for toxin trafficking. // J. Biol. Chem. 276, 7202-7208, 2001
28. Donaldson J.G., Finazzi D., Klausner R.D. et al // Brefeldin A inhibits Golgi membrany-catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein. // Nature, V. 360, PP. 350-352, 1992
29. Duzgunes N. and Wilschut J. // Fusion assay monitoring intermixing of aqueous contents. // Methods in Enzymology, V. 220, PP. 3-14, 1993
30. Endo Y., Tsurugi K., Franz H. // The site of action of the A-chain of mistletoe lectin I on eukaryotic ribosomes. The RNA N-glycosidase activity of the protein. // FEBS Letters, V.231, PP. 378-380. 1988
31. Eschenburg S., Krauspenhaar R., Mikhailov A., Stoeva S., Betzel C., Voelter W. // Primary structure and molecular modeling of mistletoe lectin I from Viscum Album. // Biochem and Biophys Res. Commun., v. 247, pp. 367-372, 1998
32. Ey P.L., Prowse S.J., Jenkin C.R. //Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-sepharose. // Immunochemistry, V. 15, PP. 429-436, 1978
33. Franz H. // Mistletoe lectins and their A and B chains. // Oncology, V. 43, PP. 23-34, 1986
34. Fujimoto T., Kogo H., Nomura R., Une T. // Isoforms of caveolin-1 and caveolar structure. // J. of Cell Science, V. 113, PP. 3509-3517, 2000

35. Gagescu R. // SNARE hypothesis 2000. // Nature Reviews Molecular Cell Biology, V. 1, PP. 5, 2000
36. Garred O., Deurs B.V., Sandvig K. // Furin-induced cleavage and activation of Shiga toxin. // J.Biol.Chem., V.270, PP. 10817-10821, 1995
37. Gerona R.R., Larsen E.C., Kowalchuk J.A., Martin T.F. // The C terminus of SNAP-25 is essential for  $\text{Ca}^{(2+)}$ -dependent binding of synaptotagmin to SNARE complexes. // J Biol Chem, V. 275, PP. 6328-6336, 2000
38. Gilleron M., Siebert H.C., Kaltner H., von der Lieth C.W., Kozar T., Halkes K.M., Korchagina E.Y., Bovin N.V., Gabius H.J., Vliegthart J.F. // Conformer selection and differential restriction of ligand mobility by a plant lectin--conformational behaviour of Galbeta1-3GlcNAcbeta1-R, Galbeta1-3GalNAcbeta1-R and Galbeta1-2Galbeta1-R' in the free state and complexed with galactoside-specific mistletoe lectin as revealed by random-walk and conformational-clustering molecular-mechanics. // Eur J Biochem, V. 252(3), PP. 416-27, Mar 15, 1998
39. Gluck A., Endo Y., Wool I. // The ribosomal RNA identity elements for ricin and for alpha-sarcin: mutations in the putative CG pair that close a GAGA tetraloop. // Nucleic Acids Res., V. 22, pp. 321-324. 1994
40. Goldstein J.L., Brown M.S., Anderson G.W. et al. // Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor systems. // Ann.Rev.Cell.Biol., V.1, PP.1-39, 1985



41. Gorlich D., Hartmann E., Prehn S., et al // A protein of endoplasmic reticulum involved early in polypeptide translocation. // Nature, V. 357, PP. 47-52, 1992
42. Gray G.L., Smith D.H., Baldrige J.S., Harkins R.N., Vasil M.L., Chen E.Y., Heyneker H.L. // Cloning, nucleotide sequence, and expression in Escherichia coli of the exotoxin A structural gene of Pseudomonas aeruginosa. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, V. 81, PP. 2645-2649, 1984
43. Green S.A., Setiadi H., McEver R.P. // The cytoplasmic domain of P-selectin contains a sorting determinant that mediates rapid degradation in lysosomes. // J Cell Biol., V. 124, PP. 435-448, 1994
44. Gronenborn A.M. and Clore G.M. // Modeling the three-dimensional structure of the monocyte chemo-attractant and activating protein MCAF/MCP-1 on the basis of the solution structure of interleukin-8. // Protein Eng., V. 4(3), PP. 263-9, Feb 1991
45. Haft C. R., Klausner R.D., Taylor S.I. // Involvement of dileucine motifs in the internalization and degradation of the insulin receptor. // J.Biol. Chem., V. 269, PP. 26286-26294, 1994
46. Hatakeyama T., Yamasaki N., Funatsu G. // Identification of the tryptophan residue located at the low-affinity saccharide binding site of ricin D. // J. Biochem., V. 100, PP. 781-788, 1986
47. Hazes B. // The (QxW)<sub>3</sub> domain: a flexible lectin scaffold. // Protein Science, V. 5, PP. 1490-1501, 1996

48. Hazes B., Read R.J. // Accumulating evidence suggests that several AB-toxins subvert the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway to enter target cells. // *Biochem.*, V. 36, PP. 11051-11054, 1997
49. Henley J.R., Krueger E.W.A., Oswald B.J., McNiven M.A. // Dynamin-mediated internalization of caveolae. // *J. Cell Biol.*, V. 141, PP. 85-99, 1998
50. Herskovits J.S., Shpetner H.S., Burgess C.C., Vallee R.B. // Microtubules and Src homology 3 domains stimulate the dynamin GTPase via its C terminal domain. // *Proc Natl Acad Sci USA*, V. 90, PP. 11468-11472, 1993
51. High S. // Protein translocation at the membrane of the endoplasmic reticulum. // *Prog.Biophys.molec.Biol.*, V. 63, PP. 233-250, 1995
52. Humphrey J.S., Peters P.J., Yuan L.C et al // Localization of TGN38 to the trans-Golgi network: involvement of a cytoplasmic tyrosine containing sequence. // *J. Cell Biol.*, V. 120, PP. 1123-1135, 1993
53. Hwang C., Sinskey A.J. and Lodish H.F.// Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. // *Science*, V. 257, PP. 1496-1502. 1992
54. Itin C., Foguet M., Kappeler F., Klumperman J., Hauri H.P. // Recycling of the endoplasmic reticulum/Golgi intermediate compartment

- protein ERGIC-53 in the secretory pathway. // Biochem. Soc. Trans., V. 23, PP. 541-544, 1995
55. Johannes L. and Goud B. // Surfing on a retrograde wave: how does Shiga toxin reach the endoplasmic reticulum? // Trends Cell Biol., V. 8, PP. 158-162, 1998
56. Johannes L., Tenza D., Antony C. // Retrograde transport of KDEL-bearing B-fragment of Shiga-toxin. // J.Biol.Chem., V. 272, PP. 19554-10561, 1997
57. Katzin B.J., Collins E.J., Robertus J.D. // Structure of ricin A-chain at 2.5 Å. // Proteins: Structure, function, and genetics, V. 10, PP. 251-259, 1991
58. Kornfeld S.B., Leonard J.E., Mullen M.D., and Taetle R. // Assessment of ligand effects in intracellular trafficking of ricin A chain using anti-ricin hybridomas. // Cancer Res; V. 51, PP. 1689-1693, 1991
59. Krauspenhaar R., Eschenburg S., Perbandt M., Kornilov M., Konareva N., Mikhailova I., Stoeva S., Wacker R., Maier T., Singh T., Mikhailov A., Voelter W., Betzel C. // Crystal Structure of mistletoe lectin I from Viscum Album. // Biochem., Biophys., Res., Commun, V. 257, PP. 418-424, 1999
60. Laemmli U.K. // Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. // Nature, V. 227, PP. 680-685, 1970

61. Lamaze C. and Schmid S.L. // The emergence of clathrin-independent pinocytic pathways. // *Curr. Opin. Cell Biol.*, V. 7, PP. 573-580, 1995
62. Le Borgne R., Hoflak B. Mannose-6-phosphate receptors regulate the formation of clathrin-coated vesicles in the TGN. // *J. Cell Biol.*, V. 137, PP. 335-345, 1997
63. Lee R.T., Gabius H.J., Lee Y.C. // Ligand binding characteristics of the major mistletoe lectin. // *J. Biol. Chem.*, V. 267, PP. 23722-23727, 1992
64. Lee S.Z.Y. and Anderson W.F. // Receptor-mediated Moloney murine leukemia virus entry can occur independently of the clathrin-coated-pit-mediated endocytic pathway. // *J. Virol.*, V. 73, PP. 5994-6005, 1999
65. Letourneur F., Gaynor E.C., Hennecke S. // Coatamer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. // *Cell*, V. 79, PP. 1199-1207, 1994
66. Llorente A., Rapak A., Schmid S., et al // Expression of mutant dynamin inhibits toxicity and transport of endocytosed ricin to the Golgi apparatus. // *J. Cell Biol.*, V. 140, PP. 553-563, 1998
67. London E. // How bacterial protein toxins enter cells: the role of partial infolding in membrane translocation // *Mol. Microbiol.*, V. 6, PP. 3277-3282, 1992

68. Lord J.M., Roberts L.M. // The intracellular transport of ricin: why mammalian cells are killed and how Ricinus cells survive. // Plant Physiol Biochem., V. 34 (2), PP. 253-261, 1996
69. Lord J.M., Roberts L.M. // Retrograde transport: going against the flow. // Curr. Biol., V. 8, PP R56-R58, 1998
70. Lord J.M., Roberts L.M. // Toxin entry: retrograde transport through the secretory pathway. // J. of Cell Biology, V. 140(4), PP. 733-736, 1998b
71. Magnusson S., Berg T., Turpin E., Frenoy G.P. // Interaction of ricin with sinusoidal endothelial rat liver cells. Different involvement of to distinct carbohydrate-specific mechanism in surface binding and internalization. // Biochem., V. 277, PP. 855-861, 1991
72. Majoul I. V., Ferrari D., Solling H.D. //Reduction of protein disulfide bonds in an oxidizing enviroment. The disulfide bridge of cholera toxin A subunit is reduced in the endoplasmic reticulum. // FEBS Lett., V. 401, PP. 104-108, 1997
73. Majoul I.V., Bastianes P.I., Solling H.D. // Transport of an external Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL) protein from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum: studies with cholera toxin in Vero cells. // J.Cell Biol., V. 133, PP. 777-789, 1996
74. Mallard F., Antony C., Tenza D., Salamero J., Goud B., Johannes L. // Direct pathway from early/recycling endosomes to the Golgi apparatus revealed through the study of shiga toxin B-fragment transport. // J. Cell Biol., V. 143, PP. 973-990, 1998

75. Mekalanos J.J., Swarth D.J., Pearson G.D.N., Harford N., Groyne F. // Cholera toxin genes: nucleotide sequence, deletion analysis and vaccine development. // *Nature*, V. 306, PP. 551-557, 1983
76. Melby E.L., Prydz K., Olsnes S., Sandvig K. // Effect of monensin on ricin and fluid phase transport in polarized MDCK cells. // *J. Cell. Biochem.*, V. 47, PP. 1-10, 1991
77. Mellman I. // Endocytosis and molecular sorting. // *Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.*, V.12, PP. 575-625, 1996
78. Miettinen H.M., Matter W., Hunziker J.K. et al // Fc receptor endocytosis is controlled by a cytoplasmic domain determinant that actively prevents coated pit localization. // *J. Cell. Biol.*, V. 116, PP. 875-888, 1992
79. Mohanraj D., Ramakrishnan S. // Cytotoxic effects of Ricin without an interchain disulfide bond: Genetic modification and chemical crosslinking studies. // In: Proceedings of poster communication, 4-th Int. Symposium on immunotoxins, South Carolina., P. 98, 1995
80. Montesano R., Roth J., Robert A. et al // Non-coated membrane invaginations are involved in binding and internalization of cholera and tetanus toxin. // *Nature*, V. 296, PP. 548-559, 1982
81. Montfort W., Villifranca J.E., Monzingo A.F., Ernst S., Katzin B., Rutenber E., Xuong N.H., Hamlin R., Robertus J.D. // The three-dimensional structure of ricin at 2,8 Å. // *J. Biol. Chem.*, V.262, PP. 5398-5403, 1987

82. Morris R.E., Gerstein A.S., Bonventure P.F., et al // Receptor-mediated entry of diphtheria toxin into monkey kidney (Vero) cells: electron microscopical evaluation. // *Infect. Immun.*, V. 50, PP 721-727, 1985
83. Mossman T. // Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation cytotoxicity assays. // *J. Immunol. Methods*, V. 65, PP. 55-63, 1983
84. Moya M., Dautry-Varsat A., Goud B. // Inhibition of coated pit formation in Hep2 cells blocks the cytotoxicity of diphtheria toxin but not that of ricin toxin. // *J. Cell Biol.*, V. 101, PP. 548-559, 1985
85. Mukherjee S., Ghosh R.N., Maxfield F. // Endocytosis // *Physiol. Reviews*, V. 77, PP. 759-803, 1997
86. Murzin A., Lesk A., Chothia C. // Beta-trefoil fold. // *J. Mol. Biol.*, V. 223, PP. 531-543, 1992
87. Newton D.L., Wales R., Richardson P.T., et al // Cell surface and intracellular functions for ricin galactose binding. // *J. Biol. Chem.*, V. 267, PP. 11917-11922, 1992
88. Nicolson G.L., Blaustein J. // The interaction of Ricinus communis agglutinin with normal and tumor cell surfaces. // *Biochem. Biophys. Acta.*, V. 266, PP. 543-547, 1972
89. Nie X, Basu S, and Cerny J // Immunization with immune complex alters the repertoire of antigen-reactive B-cells in the germinal centers. // *Eur J Immunol*, V. 27(12), PP. 3517-3525, 1997

90. Nilsson T., Hoe M.H., Shsarewicz P. et al // Kin recognition between medial Golgi enzymes in Hela cells. // EMBO J., V. 13, PP. 562-574, 1994
91. Odorizzi G., Cowles C.R., Emr S.D. // The AP-3 complex: a coat of many colors. // Trends Cell Biol., V. 8, PP. 282-288, 1998
92. Oh P., McIntosh D.P., Schnitzer J.E. // Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. // J. Cell Biol., V. 141, PP. 101-104, 1998
93. Ohno H., Stewart J., Fournier M.C. et al. // Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. // Science, V. 269, PP. 1872-1875, 1995
94. Opresko L.K., Chang C.P., Will B.H. et al // Endocytosis and lysosomal targeting of epidermal growth factor receptors are mediated by distinct sequence independent of the tyrosine kinase domain. // J. Biol. Chem., V. 270, PP. 4325-4333, 1995
95. Pals-Rylaarsdam R., Gurevich V.V., Lee K.B., Ptasienski J.A., Benovic J.L., Hosey M.M. // Internalization of the m2 muscarinic acetylcholine receptor. Arrestin-independent and -dependent pathways. // J. Biol. Chem., V. 272, PP. 23682-23689, 1997
96. Pelham H.R., Munro S. // Sorting of membrane proteins in the secretory pathway. // Cell, V. 75. PP. 603-605, 1993
97. Pelham H.R.B. // SNAREs and the specificity of membrane fusion. // Cell Biology, V. 11(3), PP. 99-101, 2001



98. Plemper R.K., Wolf D.H. Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease.// Trends Biochem. Sci., V. 24 (7), PP. 266-270, 1999
99. Rapak A., Falnes P., Olsnes S. //Retrograde transport of mutant ricin to the endoplasmic reticulum with subsequent translocation to cytosol. //Proc. Natl. Acad. Sci. USA, V. 94, PP. 3783-3788, 1997
100. Rapoport T., Rolls M., Jungnickel B. Approaching the mechanism of protein transport across the ER membrane. // Curr.Opin.Cell Biol., V. 8, PP. 499-504, 1996
101. Riederer M.A., Soldati T., Shapiro J., Lin J., Pfeffer S.R. // Lysosome biogenesis requires Rab9 function and receptor recycling from endosomes to the trans-Golgi network. // J. Cell Biol., V. 125, PP. 573-582, 1994
102. Riezman H. // The ins and out of protein translocation// Science, V. 278, PP. 1728-1729, 1997
103. Rizo, J., Suedhof T.C. // Mechanisms of membrane fusion. // Nature Struct.Biol., V. 5, PP. 839-842, 1998
104. Roberts L.M. and Lord J.M. //Cytotoxic proteins. // Current Opin Biotech, V. 3, PP. 422-429, 1991
105. Robinson M.S. et al // Cloning and expression of  $\gamma$ -adaptin, a component of clathrin-coated vesicles associated with Golgi apparatus. // J.Cell.Biol, V. 111, PP. 2319-2326, 1990
106. Rodal S.K., Skretting G., Garred O., Vilhardt F., van Deurs B., Sandvig K. // Extraction of cholesterol with methyl- $\beta$ -cyclodextrin

- perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. // *Mol. Biol. Cell*, V. 10, PP. 961-974, 1999
107. Rohrer J., Schweizer A., Johnson K.F. et al // A determinant in the cytoplasmic tail of cation-dependent mannose 6-phosphate receptors prevents trafficking to lysosomes. // *J. Cell Biol.*, V. 130, PP. 1297-1306, 1995
  108. Romisch K. // *Trends Cell Biol.*, V. 4, PP. 311-314, 1994
  109. Rothberg K.G., Heuser J.E., Donzell W.C., Ying Y.-S., Glenney J.R., Anderson R.G.W. // Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. // *Cell.*, Feb 21; V. 68(4), PP. 673-82, 1992
  110. Rothberg K.G., Ying Y.S., Kamen B.A., Anderson R.G. // Cholesterol controls the clustering of glycosphingolipid-anchored membrane receptor for 5-methyltetrahydrofolate. // *J. Cell Biol.*, V. 111, PP. 2931-2938, 1990
  111. Rothman J.E. // Mechanisms of intracellular transport. // *Nature*, V. 372, PP. 55-63, 1992
  112. Rothman J.E., Schmid S.L. // Enzymatic recycling of clathrin from coated vesicles. // *Cell*, V. 46, PP. 5-9, 1986
  113. Rutenber E., Ready M., Robertus J.D. // Structure and evolution of ricin B-chain. // *Nature*, V. 326, PP. 624-626, 1987
  114. Rutenber E., Robertus J.D. // Structure of Ricin B-chain at 2.5 Å Resolution. // *Proteins*, V. 10, PP. 260-269, 1991
  115. Sacchettini J.C., Baum L.G., Brewer C.F. // Multivalent protein-carbohydrate interactions. A new paradigm for supermolecular assembly

- and signal transduction. // *Biochemistry*, V. 40(10), PP. 3009-3015, Mar 13, 2001
116. Sandvig K., Bo van Deurs // Endocytosis, intracellular transport and cytotoxic action of shiga toxin and ricin. // *Phys. Reviews*, V. 76, PP. 949-966, 1996
  117. Sandvig K., Ryd M., Garred O., et al. // Retrograde transport from the Golgi complex to the ER of both Shiga toxin and nontoxic shiga B-fragment is regulated by butyric acid and cAMP // *J. Cell Biol.*, V. 126, PP. 53-64, 1994
  118. Sandvig K., Dubinina E., Garred O. et al // Endocytosis and intracellular transport of protein toxins. // *Biochem. Soc. Trans.*, V. 21, PP. 707-710, 1993
  119. Sandvig K., Olsnes S. // Entry of the toxic proteins abrin, modeccin, ricin and diphtheria toxin into cells. II. Effect of pH, metabolic inhibitors and ionophores and evidence for toxin penetration from endocytotic vesicles. // *J. Biol. Chem.*, V. 257, PP. 7504-7513, 1982
  120. Sandvig K., Olsnes S., Petersen O.W. et al // Endocytosis from coated pits of Shiga toxin: a glycolipid-binding protein from *Shigella dysenteriae* // *J. Cell Biol.*, V. 108, PP. 1331-1343, 1989
  121. Sandvig K., van Deurs B. // Endocytosis and intracellular transport of ricin: recent discoveries. // *FEBS Let.*, V. 452, PP. 67-70, 1999

122. Schapiro F.B., Lingwood C., Furuya W., Grinstein S. // pH-independent retrograde targeting of glycolipids to the Golgi complex. // Am. J. Physiol., V. 274, PP. 319-332, 1998
123. Schapiro F.B. and Grinstein S. // Determinants of the pH of the Golgi complex. // J. of Biological Chemistry, V. 275, PP. 21025-21032, 2000
124. Schekman R. and Orci L. // Coat proteins and vesicle budding. // Science, V. 271, PP. 1526-1533, 1996
125. Scherer P.E., Okamoto T., Chun M., Nishimoto I., Lodish H.F., Lisanti M.P. // Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, V. 93, PP. 131-135, 1996
126. Schlegel A. and Lisanti M.P. // Caveolae and their coat proteins, the caveolins: from electron microscopic novelty to biological launching pad. // J Cell Physiol. Mar, V. 186(3), PP. 329-37, 2001
127. Schmid S.L., Carter L.L. // ATP is required for receptor-mediated endocytosis in intact cells. // J. Cell Biol, V. 111, PP. 2307-2318, 1990
128. Seetharam S., Chaudhary VK, FitzGerald D, Pastan I // Increased cytotoxic activity of Pseudomonas exotoxin and two chimeric toxins ending in KDEL. //J. Biol. Chem., V. 266, PP. 17376-17381, 1991
129. Sharon N. // Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. // TIBS, V. 18, PP. 221-226, 1993
130. Simmons B.M., Stahl P.D., Russel I.H. Mannose receptor-mediated uptake of ricin toxin and ricin A-chain by macrophages.

- Multiple intracellular pathways for A chain translocation. // J.Biol.Chem., V. 261, PP. 7912-7920, 1986
131. Simpson J.C., Dascher C., Roberts L.M. et al //Ricin cytotoxicity is sensitive to recycling between the endoplasmic reticulum and the Golgi complex. // J. Biol. Chem., V. 270, PP. 20078-20083, 1995a
  132. Simpson J.C., Lord J.M., Roberts L.M. // Point mutation in the hydrophobic C-terminal region of ricin A chain indicate that Pro250 plays key role in the membrane translocation. // Eur. J. Biochem., V. 232, PP. 458-463, 1995b
  133. Simpson J.C., Roberts L.M., Lord J.M. // Free ricin A-chain reaches an early compartment of the secretory pathway before it enters the cytosol. // Exp. Cell Res., V. 229, PP. 447-451, 1996
  134. Soler M.H., Stoeva S, Voelter W // Complete amino acid sequence of the B chain of mistletoe lectin I. // Biochem Biophys Res Commun V. 246(3), PP. 596-601, 1998
  135. Soler M.H., Stoeva S., Schwamborn C., Wilhelm S., Stifel T, Voelter W. Complete aminoacid sequence of the A-chain of mistletoe lectin I. // FEBS letters, V. 399, PP.153-157, 1996
  136. Spicer E.K. and Noble J.A. // Escherichia coli heat-labile enterotoxin. Nucleotide sequence of the A subunit gene. // J. Biol. Chem., V. 257, PP. 5716-5721, 1982
  137. Stamnes M.A., Craighead M.W., Hoe M.H. et al //An integral membrane component of coatomer-coated transport vesicles defines a

- family of proteins involved in budding. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, V. 92, PP. 8011-8015, 1995
138. Stamnes M.A., Rothman J.E. // The binding of AP-1 clathrin adaptor particles to Golgi membrane requires ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein. // Cell, V. 73, PP. 999-1005, 1993
  139. Subtil A., Gaidarov I., Kobylarz K., Lampson M.A., Keen J.H., McGraw T.E. // Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding. // Proc. Natl Acad. Sci. USA, V. 96, PP. 6775-6780, 1999
  140. Sweeney E.C., Palmer R.A., Pfuller U. // Crystallization of the ribosome-inactivating protein MLI from *Viscum album* (Mistletoe) complexed with  $\beta$ -D-galactose. // J. Mol. Biol., V. 234, PP. 1279-1281, 1993
  141. Sweeney E.C., Rex A.P., Pfuller U. et al // Dimerisation of mistletoe lectin I occurs by non-covalent association of two molecules. // COST 98, V. 5, PP. 69-75, 1998
  142. Tang Z., Scherer P.E., Okamoto T., Song K., Chu C., Kohtz D.S., Nishimoto I., Lodish H.F., Lisanti M.P. // Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. // J. Biol. Chem., V. 271, PP. 2255-2261, 1996
  143. Teasdale R.D., Jackson M.R. // Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. // Ann.Rev.Cell Dev.Biol., V. 12, PP. 27-54, 1996
  144. Tonevitsky AG, Agapov I, Temiakov D, Moisenovich M, Maluchenko N, Solopova O, Würzner G, and Pfueller U // Study of

- heterogeneity of lectins in Mistletoe preparations by monoclonal antibodies to their A-subunits. // Drug Res; V. 49(II), PP. 970-975, 1999
145. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. // Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, V. 76, PP. 4350-4354, 1979
146. Van Deurs B. // Ricin transport into cells: studies of endocytosis and intracellular transport. // Int. J. Med. Microbiol, V. 290, PP. 415-420, 2000
147. Van Deurs B., Sandvig K., Petersen O.W. et al // The ways of endocytosis. // Int. Rev. Cytol, V. 117, PP. 131-177, 1989
148. Van Deurs B., Sandvig K., Petersen O.W. et al // Estimation the amount of internalized ricin that reaches the trans-Golgi network. // J.Cell Biol., V.106, PP. 253-267, 1988
149. Van Deurs B., Tonnessen T.I., Petersen O.W., Sandvig K., Olsnes S. Routing of internalized ricin and ricin conjugates to the Golgi complex. // J.Cell Biol., V. 102, PP. 37-47, 1986
150. Vernoslova E.A., Konareva N.V., Mikhailov A.M., Popov A.N., Zaitsev V.N., Agapov I.I., Tonevitskii A.G., Kirpichnikov M.P., Lentzen H., Kornev A.N., Kornilov V.V., Pfueller U., Betzel C., Mikhailova I.V. // X-ray diffraction study of native MLI from Viscum Album (Mistletoe) at 3.5 Å resolution. //Crystallography Reports, V. 44, № 4, PP. 582-588, 1999

151. Vickery R.G. and Zastrow M. // Distinct dynamin-dependent and –independent mechanisms target structurally homologous dopamine receptors to different endocytic compartments. // J. Cell Biol., V. 144, PP. 31-43, 1999
152. Villafranca J.E., Robertus J.D. // Ricin B chain is a product of gene duplication. // J.Biol.Chem., V. 256, PP. 554-556, 1981
153. Villifranca J.E // The crystal structure of ricin at low resolution. // Ph.D. dissertation. University of Texas at Austin, 1980
154. Voorhees P., Deignan E., van Donselaar et al // An acidic sequence within the cytoplasmic domain of furin functions as a determinant of trans-Golgi network localization and internalization from cell surface. // EMBO J., V. 14, PP. 4961-4975, 1995
155. Wales R., Richardson P.T., Roberts L.M. et al // Mutational analysis of the galactose binding ability of recombinant ricin B chain. // J. Biol. Chem., V. 266, PP. 19172-19179, 1991
156. Weston S., Tucker A., Thatcher D., Derbyshire D., Paupit R. // X-ray structure of recombinant ricin A-chain at 1,8 Å resolution. // J Mol Biol, V. 244, PP. 410-22, 1994
157. Yamasaki N., Hatakeyama T., Funatsu G. // Ricin D-sacharide interaction as studied by ultraviolet difference spectroscopy. // J. Biochem., V. 98, PP. 1555-1560, 1985
158. Youle R.J. and Colombatti M. // Hybridoma cells containing intracellular anti-ricin antibodies show ricin meets secretory antibody before entering the cytosol. // J Biol Chem; V. 262, PP. 4676-4682, 1987



159. Zhan J., Stayton P., Press O. // Modification of ricin A chain, by addition of endoplasmic reticulum (KDEL) or Golgi (YQRL) retention sequences enhances its cytotoxicity and traslocation. // Cancer Immunol., Immunother., V. 46, PP. 55-60, 1998
160. Zhang J., Ferguson S.S.G., Barak L.S., Menard L., Caron M.G. // Dynamin and  $\beta$ -arrestin reveal distinct mechanisms for G proein-coupled receptor internalization. // J. Biol. Chem., V. 271, PP. 18302-18305, 1996

### **Благодарности.**

Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю д.б.н., профессору А.Г. Тоневицкому за умелое руководство и ценные советы при выполнении данной работы. Автор благодарит д.м.н. И.С. Комолова за предоставленную возможность сделать данную работу в лаборатории Дизайна и инженерии белков Центра «Биоинженерия» РАН; д.б.н. И.И. Агапова (ГНЦ «ГосНИИГЕНЕТИКА»), к.б.н. М.М. Мойсеновича (МГУ им М.В. Ломоносова), к.б.н. И.А. Демину за ценные рекомендации и советы, а также помощь в обсуждении результатов; к.б.н. Н.В. Малюченко за предоставленные клетки гибридом и антитела против ненативной А-субъединицы вискумина; к.б.н. Е.Ф. Колесанову (ГУНИИБМХ РАМН) за предоставленную панель связанных с иглами пептидов – синтетических фрагментов MLA; аспирантов Е.Н. Попову и Н.В. Козловскую за помощь в постановке некоторых экспериментов и дружеское участие. Автор выражает глубокую признательность всем сотрудникам лаборатории, где выполнялась работа, за неизменную доброжелательность и поддержку.