

УДК 579.83:543.42

**ДЕЛЬТА-ЭНДОТОКСИН *BACILLUS THURINGIENSIS*
КАК ПРИРОДНЫЙ ПРОТОНОФОР:
АНАЛИЗ МЕТОДАМИ ИК- И ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ**

Д.В. Каменек, О.Н. Ильинская, Л.М. Цофина, Л.К. Каменек

Аннотация

Установлена способность дельта-эндотоксинов *Bacillus thuringiensis* снижать в 2–5 раз сопротивление искусственных фосфолипидных мембран, прямо пропорциональная концентрации токсина. Дельта-эндотоксин в концентрации 70 мкг/мл снижал потенциал внутренней митохондриальной мембраны на 40% в течение 12 мин инкубации. Методами ИК- и ЯМР-спектроскопии показано, что эндотоксин является потенциальным природным разобщителем-протонофором благодаря наличию большого количества лабильных протонов.

Ключевые слова: дельта-эндотоксин, ЯМР-, ИК-спектроскопия.

Введение

Спорообразующая кристаллофорная бактерия *Bacillus thuringiensis*, поражающая многие виды насекомых, широко используется при получении инсектицидных препаратов для защиты растений. Эффективное применение таких препаратов, а также создание новых, более совершенных, требует знания многих особенностей патогена и механизмов его действия.

Известно, что основным действующим началом *B. thuringiensis*, в целом ответственным за комплекс патологических проявлений, является дельта-эндотоксин, продуцируемый ею, который наряду с инсектицидным оказывает цитотоксическое влияние на культуры раковых, бактериальных и грибных клеток [1]. Установлено, что строение и химические свойства токсинов разного происхождения имеют значительное сходство [2]. Показано также, что дельта-эндотоксин способен связываться с чувствительными рецепторами на цитоплазматических мембранах клеток кишечного эпителия насекомых, а затем проникать в них, формируя каналы-поры, приводящие к нарушению активного транспорта ионов через мембрану [3]. Однако известно, что такие каналы обладают сродством к самим токсичным полипептидам или их фрагментам в 20–30 раз более высоким, чем к электролитам [4].

Имеются данные, показывающие, что первичным действием дельта-эндотоксина является разобщение окислительного фосфорилирования и дыхания в митохондриях чувствительных к нему клеток, обусловленное его протонофорными свойствами. Способность разобщать при этом не зависит от источника происхождения токсина (в пределах патотипа), но прямо пропорциональна его концентрации [5].

Целью настоящей работы явилось выяснение особенностей строения дельта-эндотоксина, которые обуславливают его способность разобщать окислительное фосфорилирование.

1. Постановка задачи

В работе использовали следующие штаммы различных подвидов *B. thuringiensis*: *galleriae* 69-6 и 13-7; *thuringiensis* 202; *alesti* 204; *sotto* 617; *kurstaki* Z-52; *dendrolimus* 502, продуцирующие дельта-эндотоксины, токсичные для чешуекрылых (патотип А) и кодируемые генами *Cry* I-класса [6]. Культуры получены из ФГУП ГосНИИ Генетики и селекции промышленных микроорганизмов. Поверхностное культивирование осуществляли в термостатах при 27 °С в чашках Петри на агаризованной питательной среде № 14. Кристаллы предварительно выделяли в чистом виде, используя двухфазную систему: 1%-ный водный раствор сульфата натрия – четыреххлористый углерод [7]. Щелочную экстракцию дельта-эндотоксина выполняли по методу Кукси [8]. Разделение токсичных полипептидов проводили методом хроматографии на колонке Lephadex-G-200 размером 2.54 × 10 см. Уровень белка определяли по методике Лоури. Особенности строения дельта-эндотоксина изучали методами ИК- и ЯМР-спектроскопии.

ИК-спектры в диапазоне волновых чисел 4000–400 см⁻¹ были записаны с помощью ИК-спектрофотометра марки Perkin-Elmer-325, который был использован в режиме линейной спектральной поглощательной способности. Образцы готовили в виде таблеток с бромистым калием или растворов в абсолютном пиридине.

ЯМР-спектры снимали на ЯМР-спектрометре марки Varian на 60 Мгц с электромагнитом и разверткой спектра по полю, предназначенном для резонанса на ядрах Н¹. В качестве внешнего стандарта использовали тетраметилсилан (ТМС), сигнал от которого принимался за точку отсчета для измерения химических сдвигов протонов (δ-шкала). В качестве растворителей использовали дейтериевую воду (D₂O), щелочной буфер, приготовленный на D₂O, и диметилсульфоксид (ДМСО).

Разобщающие свойства эндотоксина оценивали по действию его на искусственные фосфолипидные азолектиновые мембраны.

Мембраны получали на круглом отверстии диаметром 1 мм в тefлоновой ячейке. Для приготовления мембран использовали раствор азолектина и липидов, выделенных из гусениц тутового шелкопряда, в *n*-декане в концентрации 20 мг/мл. Реакцию проводили в трис-НСl буфере, рН 7.0. Подаваемое напряжение составляло 100 мВ. Изменение сопротивления мембраны регистрировали с помощью рН-метра и потенциометра. В опытах применяли неполяризующиеся хлорсеребряные электроды с агаровыми мостиками на 0.01–1.0 М растворе КСl [9].

2. Результаты и обсуждение

Известно, что обычные белки дают одинаковую картину полос поглощения в ИК-области спектра [10]. На рис. 1 представлены спектры поглощения в ИК-области дельта-эндотоксина *B. thuringiensis* var. *galleriae* штамм 69-6. Такая картина поглощения в ИК-области характерна для всех изученных эндотоксинов.

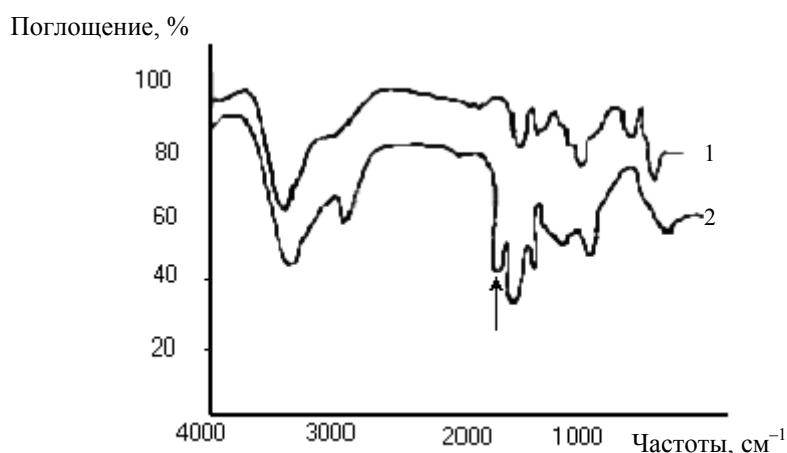


Рис 1. ИК-спектры дельта-эндотоксина *B. thuringiensis subsp. galleriae* штамм 69-6, полученного методом щелочного гидролиза: 1) в пиридине, 2) в бромистом калии (стрелкой указана полоса поглощения неионизированной COOH -группы)

Для спектров всех эндотоксинов (рис. 1, кривая 2) характерно наличие основных белковых полос поглощения. Это полосы в области $3300, 3080, 1440\text{--}1460, 1240\text{--}1260$ и $550\text{--}700\text{ cm}^{-1}$, обусловленные колебаниями NH -групп; $2960, 2920, 2840$ и $1440\text{--}1460\text{ cm}^{-1}$, связанные с поглощением C-H -связей; $1050\text{--}1070\text{ cm}^{-1}$, обусловленные колебаниями пептидной группы -CO-NH-C- . Полосы поглощения ионизированной карбоксильной группы COO^- при $1370\text{--}1383\text{ cm}^{-1}$ и колебаний C-O -связи в COOH -группе при 1170 cm^{-1} присутствуют на всех ИК-спектрах. Все полученные спектры не обладают какими-либо полосами, не свойственными для обычных белков, кроме полосы в области $1080\text{--}1150\text{ cm}^{-1}$ в спектрах культур, характерной для углеводного компонента.

Более информативным оказалось сравнение спектров в бромистом калии и абсолютном пиридине (рис. 1). Особенностью спектра в бромистом калии является наличие очень сильной полосы поглощения при 1730 cm^{-1} (кривая 2, полоса поглощения указана стрелкой). Эта полоса характерна для неионизированной карбоксильной группы COOH и обусловлена валентными колебаниями C-O -связи. Полоса исчезает при снятии спектра в пиридине (кривая 1), так как пиридин ионизирует карбоксильную группу до COO^- . При растворении же кристаллов эта группа освобождается в результате утраты четвертичной и третичной структуры белка и обладает лабильным («кислым») протоном H^+ , который легко может быть отдан дельта-эндотоксином.

ЯМР-спектры дельта-эндотоксина, полученного методом щелочного гидролиза, были сняты в апротонном биполярном растворителе диметилсульфоксиде (ДМСО) и в ДМСО с добавлением дейтериевой воды (D_2O). В качестве внешнего стандарта использовали тетраметилсилан (ТМС), сигнал от которого принимался за точку отсчета для измерения химических сдвигов протонов (δ -шкала) (рис. 2).

Сущность исследования заключалась в том, что если в ДМСО ожидали полного спектра сигналов от протонов дельта-эндотоксина, то при внесении D_2O некоторые наиболее подвижные (лабильные, «кислые») протоны должны

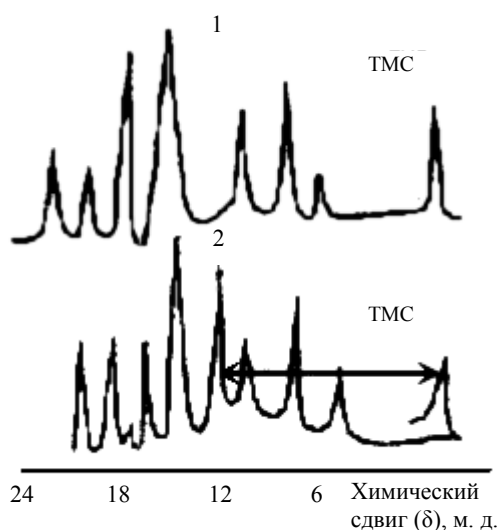


Рис. 2. ЯМР-спектры дельта-эндотоксина *B. thuringiensis subsp. galleriae* штамм 69-6, снятые в смеси ДМСО и D₂O (1) и в ДМСО (2); δ – безразмерная величина, отвечающая миллионным долям поля (м. д.)

были заместиться на дейтерий, в результате чего химический сдвиг сигнала и его интенсивность должны измениться. При сравнении спектров, представленных на рис. 2, было обнаружено, что довольно сильный сигнал в области 12 м. д. (обозначен стрелкой на спектре 2), проявляющийся в ДМСО, совершенно исчезает при добавлении D₂O (спектр 1). Именно в этой области расположен сигнал карбоксильного протона в карбоновых кислотах [11]. Следует отметить, что аналогичная картина получена для всех изученных дельта-эндотоксинов, спектры которых лишь незначительно отличались величиной химического сдвига.

Следовательно, дельта-эндотоксин обладает лабильными протонами, которые он способен легко отдавать после растворения в щелочном содержимом кишечника насекомого. Большое количество «кислых» протонов обусловлено доминирующим содержанием в составе белкового дельта-эндотоксина аспарагиновой и глутаминовой аминокислот. Вещества природного или синтетического происхождения, обладающие лабильными протонами, могут являться разобщителями процессов окислительного фосфорилирования (синтеза АТФ), происходящего в митохондриях, если они обладают способностью проникать через биологические мембраны.

Нативный кристалл следует рассматривать как четвертичную белковую структуру дельта-эндотоксина, о чем свидетельствуют результаты электронно-микроскопических и кристаллографических исследований [12]. В стабилизации такой высоко регулярной структуры безусловно участвуют все возможные в полипептидных структурах химические взаимодействия, в том числе и нековалентные связи, образование которых обусловлено наличием большого количества аспарагиновой и глутаминовой кислот (до 25%). В щелочной же среде происходит частичное расщепление S–S-связей, а также освобождение карбоксильных групп глутаминовой и аспарагиновой кислот. В результате кристалл распадается на гидрофильные субъединицы кислой природы, способные осу-

Табл. 1

Влияние дельта-эндотоксина на сопротивление искусственной фосфолипидной мембраны

Штамм <i>B. thuringiensis</i>	Изменение сопротивления, Ом·10 ¹⁰ , в зависимости от концентрации токсина, мкг/мл		
	16	50	100
<i>galleriae 69-6</i>	1.93 ± 0.20*	0.72 ± 0.19	0.52 ± 0.16
<i>galleriae 13-7</i>	2.08 ± 0.18	0.83 ± 0.17	0.51 ± 0.18
<i>thuringiensis 202</i>	2.01 ± 0.17	0.77 ± 0.18	0.48 ± 0.20
<i>alesti 204</i>	1.89 ± 0.21	0.80 ± 0.20	0.32 ± 0.24
<i>sotto 617</i>	1.91 ± 0.16	0.73 ± 0.17	0.50 ± 0.25
<i>kurstaki Z-52</i>	1.80 ± 0.18	0.86 ± 0.22	0.60 ± 0.25
<i>dendrolimus-502</i>	2.11 ± 0.26	0.70 ± 0.16	0.45 ± 0.15
исходное сопротивление мембраны	2.00 ± 0.27	2.00 ± 0.27	2.00 ± 0.27

*среднее квадратическое отклонение.

ществлять протонодонорную функцию. Очевидно, именно эта функция обеспечивает дельта-эндотоксину возможность осуществлять разобщение окислительного фосфорилирования и дыхания в митохондриях кишечных клеток насекомых.

Установлено, что разобщители являются переносчиками протонов через мембрану, изменяя таким образом разность потенциалов на ней. Этот эффект может быть обнаружен с помощью искусственных фосфолипидных («черных») мембран, сопротивление которых снижается под действием разобщителей [10].

Было обнаружено, что дельта-эндотоксин, полученный методом щелочного гидролиза, не оказывал влияния на искусственную азолектиновую мембрану в концентрации 16 мкг/мл, а в концентрации 50 и 100 мкг/мл вызывал падение ее сопротивления (табл. 1).

Разница между этими величинами достоверна (при $n = 16$ $P \leq 0.01$). Таким образом, сопротивление уменьшалось в 2–3 раза под действием токсина в концентрации 50 мкг/мл и 3–5 раз – в концентрации 100 мкг/мл. Некоторые синтетические разобщители, способные свободно проникать через липидную мембрану и переносить таким образом протоны (так называемые проникающие ионы) снижают сопротивление, как правило, на несколько порядков. Показываемый дельта-эндотоксином эффект сравнительно невелик по отношению к эффекту разобщителей типа проникающих ионов. Однако разобщающее действие дельта-эндотоксина бесспорно. Полученные данные соответствуют известному из литературы факту о способности белка-токсина ассоциироваться (или интегрироваться) с фосфолипидами мембраны, создавая таким образом каналы, через которые могут поступать лабильные протоны в составе токсичного полипептида [4].

Summary

L.K. Kamenek, O.N. Ilinskaya, L.M. Cofina, L.K. Kamenek. *Bacillus thuringiensis* Delta-endotoxin As a Natural Protonophore: IR and NMR Spectroscopy Analysis.

It is stated that delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* are able to decrease the resistance of artificial phospholipid membranes, in direct proportion to the endotoxin concentration. Delta-endotoxin in concentration of 70 mkg/ml reduces the inner mitochondrial membrane potential by 40% during 12 min incubation. IR and NMR spectroscopy have shown that endotoxin is a potential natural protonophore-uncoupler due to the presence of a large amount of labile protons.

Key words: delta-endotoxine, NMR, IR spectroscopy.

Литература

1. Юдина Т.Г., Бурцева Л.И. Действие дельта-эндотоксинов четырех подвигов *B. thuringiensis* на различных прокариот // Микробиология. – 1997. – Т. 66, № 1. – С. 25–31.
2. Chestukhina G.G., Kostina L.I., Mikhailova A.L., Yurin S.A., Klepikova F.S., Stepanov V.M. The main features of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin structure // Arch. Microbiol. – 1982. – V. 132. – P. 159–162.
3. Carroll J., Ellar D.J. An analysis of *Bacillus thuringiensis* endotoxin action on insect midgut membrane permeability using a light scattering assay // Eur. J. Biochem. – 1993. – V. 214. – P. 771–778.
4. Кагава Я. Биомембраны. – М.: Высш. шк., 1985. – 303 с.
5. Каменек Л.К. Дельта-эндотоксин *Bacillus thuringiensis*: строение, свойства и использование для защиты растений: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – М., 1998. – 43 с.
6. Höfte H., Whiteley H. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins determined by compilation analysis // J. DNA Sequens. Mapp. – 1990. – V. 1. – P. 97–106.
7. Pendleton I.R., Morrison R.B. Separation of the spores and crystals of *Bacillus thuringiensis* // Nature. – 1966. – V. 212. – P. 228–229.
8. Cooksey K.E. Purification of a protein from *Bacillus thuringiensis* toxic to a larvae of Lepidoptera // Biochem. J. – 1968. – V. 106. – P. 445–454.
9. Либерман Е.А., Мохова Е.Н., Скулачев В.П., Топалы В.П. Действие разобщителей окислительного фосфорилирования на бимолекулярные фосфолипидные мембраны // Биофизика. – 1968. – Т. 13. – С. 188–193.
10. Чиргадзе Ю.Н. Инфракрасные спектры и структура полипептидов и белков. – М.: Наука, 1965. – 135 с.
11. Ионин Б.И., Ершов Б.А. ЯМР-спектроскопия в органической химии. – Л.: Химия, 1967. – 32 с.
12. Ануфриев Э.Ф. Электронно-микроскопическое изучение кристаллов эндотоксина *Bacillus thuringiensis* var. dendrolimus // Энтомопатогенные бактерии и грибы в защите растений. – Новосибирск: Изд-во СО ВАСХНИЛ, 1985. – С. 135–145.

Поступила в редакцию
05.09.07

Каменек Дмитрий Валерьевич – старший преподаватель кафедры общей и биологической химии Ульяновского государственного университета.

E-mail: kamenekvm@ulsu.ru

Ильинская Ольга Николаевна – доктор биологических наук, профессор, член-корр. АН РТ, заведующий кафедрой микробиологии Казанского государственного университета.

E-mail: *Olga.Ilinskaya@ksu.ru*

Цофина Лиля Мионовна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Института проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН, г. Москва.

Каменек Людмила Кирилловна – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой общей и биологической химии Ульяновского государственного университета.

E-mail: *kamenekvm@ulsu.ru*