

УДК: 577.352.4

Кинетика связывания литического полипептида эквинатоксина II с мембранами эритроцитов и влияние кальция на токсин-индуцированный гемолиз**С.В.Руденко¹, Е.М.Щетинина²**¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (Харьков, Украина)²Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)
rsv@kharkov.ua

Эквинатоксин II (EqтII) является цитолитическим полипептидом из морской анемоны *Actinia equina* L., который формирует поры в натуральных и искусственных мембранах. Токсин связывается с мембранами эритроцитов и может формировать два типа пор. Динамические поры, которые формируются в условиях градиента токсина, направленного на мембрану, основаны на мономере токсина, как функциональной единицы гемолиза. Равновесные поры, формируемые в условиях продолжительной инкубации клеток под осмотической протекцией с помощью 30 мМ PEG 4000, основаны на димере токсина. Размер динамических пор больше, чем равновесных. Оба типа пор блокируются с высокой кооперативностью в узком диапазоне концентраций кадмия (0,2–0,3 мМ) и трегалозы (10–25 мМ), динамические поры менее чувствительны к действию ингибиторов. Показано, что EqтII способен связываться с мембранами эритроцитов и тей как специфически, так и неспецифически. Токсин индуцирует гемолиз, взаимодействуя с ограниченным числом токсин-связывающих сайтов (рецепторов) с верхней оценкой порядка $(180 \pm 35) \times 1000$ сайтов на одну клетку, однако общее число связавшихся молекул токсина может быть на порядок больше. Ca^{2+} является активатором токсин-индуцированного гемолиза. Полученные данные показывают, что механизм его действия состоит в следующем. Ca^{2+} принимает участие только на ранних стадиях токсин-индуцированного порообразования, значительно увеличивая скорость связывания токсина с предположительным мембранным рецептором. Ca^{2+} не изменяет число связывающих сайтов и порядка литической реакции как для динамических, так и равновесных пор. Кроме этого, все равновесные поры, сформированные как в присутствии, так и в отсутствии кальция, являются кальций-нечувствительными. Ca^{2+} также принимает непосредственное участие в структуре формируемых пор, в результате чего равновесные поры, сформированные в его присутствии, имеют несколько иные свойства и менее чувствительны к действию ингибиторов. Эти данные показывают, что для EqтII на мембране эритроцитов должен существовать специфический рецептор, который обеспечивает его гемолитический эффект.

Ключевые слова: эритроциты, гемолиз, эквинатоксин II, кальций, кадмий, трегалоза, связывание, мембранные поры, рецепторы.

Кінетика зв'язування літичного поліпептиду еквінатоксину II з мембранами еритроцитів і вплив кальцію на токсин-індукований гемолиз**С.В.Руденко, Е.М.Щетиніна**

Еквінатоксин II (EqтII) є цитолітичним поліпептидом з морської анемони *Actinia equina* L., що формує пори в натуральних і штучних мембранах. Токсин зв'язується з мембранами еритроцитів і може формувати два типи пір. Динамічні пори, що формуються в умовах градієнта токсину, спрямованого на мембрану, засновані на мономері токсину, як функціональної одиниці гемолізу. Рівноважні пори, які формуються в умовах тривалої інкубації клітин під осмотичною протекцією за допомогою 30 мМ PEG 4000, засновані на димері токсину. Розмір динамічних пір більше, ніж рівноважних. Обидва типи пір блокуються з високої кооперативністю у вузькому діапазоні концентрацій кадмію (0,2–0,3 мМ) і трегалози (10–25 мМ), динамічні пори менш чуттєві до дії інгібіторів. Показано, що EqтII здатен зв'язуватися з мембранами еритроцитів і тій як специфічно, так і неспецифічно. Токсин індукує гемолиз, взаємодіючи з обмеженим числом токсин-зв'язуючих сайтів (рецепторів) з верхньою оцінкою порядку $(180 \pm 35) \times 1000$ сайтів на одну клітину, однак загальне число молекул токсину, що зв'язалися, може бути на порядок більше. Ca^{2+} є активатором токсин-індукованого гемолізу. Отримані дані показують, що механізм його дії полягає в наступному. Ca^{2+} бере участь тільки на ранніх стадіях токсин-індукованого пороформування, значно збільшуючи швидкість зв'язування токсину з можливим мембранным рецептором. Ca^{2+} не змінює число еднальних сайтів і порядок літичної реакції як для динамічних, так і рівноважних пір. Крім цього, усі рівноважні пори, сформовані як у присутності, так і у відсутності кальцію, є кальцій-нечутливими. Ca^{2+} також бере безпосередню участь у структурі формованих пір, у результаті чого рівноважні пори, сформовані в його присутності, мають трохи інші властивості і менш чуттєві до дії інгібіторів. Ці дані показують, що для EqтII на мембрані еритроцитів повинний існувати специфічний рецептор, що забезпечує його гемолітичний ефект.

Ключові слова: еритроцити, гемолиз, еквінатоксин II, кальцій, кадмій, трегалоза, зв'язування, мембранні пори, рецептори.

Kinetics of binding of lytic polypeptide equinatoxin II to erythrocyte membrane and effect of calcium on toxin-induced hemolysis

S.V.Rudenko, E.M.Shchetinina

Equinatoxin II is a cytolytic polypeptide from the sea anemone *Actinia equina* L. which forms pores in natural and artificial membranes. Toxin binds to RBC membrane exponentially and forms two classes of pores. Growing pores which are formed under conditions of toxin gradient directed toward the membrane are based on toxin monomer as a functional unit of hemolysis. Steady-state pores formed at equilibrium after prolonged incubation of cells with toxin under osmotic protection by 30 mM of PEG 4000 are based on toxin dimer. The dimension of growing pore is larger than that of steady-state pore. Both types of pores are inhibited with high cooperativity at narrow range of concentration of cadmium (0.2–0.3 mM) and trehalose (10–25 mM); growing pore is less sensitive to the action of inhibitors. It is shown that equinatoxin II is able to bind specifically and non-specifically to RBC and ghosts membranes. Toxin induces hemolysis interacting with only limited number of toxin-binding sites (receptors) with an upper estimate of $(180 \pm 35) \times 1000$ sites per cell, however the whole number of bound toxin molecules could be at least one order of magnitude larger. Ca^{2+} is an activator of toxin-induced hemolysis. The present data reveal that mechanism of its action is as follows. Ca^{2+} participates only at early stage of toxin-induced pore formation significantly increasing the rate of toxin binding to the putative membrane receptor. Ca^{2+} change neither a number of toxin-binding sites nor the order of lytic reaction for both growing and steady-state pores. In addition, all steady-state pores formed in the presence or absence of Ca^{2+} are Ca^{2+} -insensitive. Ca^{2+} is also directly involved in pore formation. As a result, a steady-state pore formed in the presence of Ca^{2+} has somewhat different properties and is less sensitive to the action of inhibitors. These data strongly suggest that specific receptor must exist on the erythrocyte membrane to mediate the hemolytic action of equinatoxin II.

Key words: erythrocytes, hemolysis, equinatoxin II, calcium, cadmium, trehalose, binding, membrane pores, receptors.

Введение

Эквинатоксин II из *Actinia equina* L. является летальным и цитолитическим токсином (Масек, Lebez, 1981) и принадлежит к семейству порообразующих основных полипептидов с молекулярной массой 16–20 кДа, продуцируемых морскими анемонами. Он является гемолитическим (Belmonte et al., 1993; Масек et al., 1994), цитотоксическим (Batista et al., 1990), кардиотоксическим (Bunc et al., 1999), вызывает агрегацию тромбоцитов (Teng et al., 1988) и повреждение легких (Lafronconi et al., 1984). Он обладает способностью лизировать липидные везикулы (Belmonte et al., 1993; Mally et al., 2002) и формировать ионные каналы в плоских липидных бислоях (Belmonte et al., 1993). Хотя молекулярный механизм токсин-индуцируемого гемолиза не полностью ясен, последние наблюдения позволяют предположить, что формирование катион-селективных пор, состоящих из трех или четырех молекул токсина и также проницаемых для неэлектролитов (Belmonte et al., 1993; Mally et al., 2002; Zorec et al., 1990), ответственно за этот эффект. Было оценено, что эффективный гидродинамический диаметр этих пор составляет около 2 нм (Belmonte et al., 1993; Масек et al., 1994).

Несмотря на то, что эквинатоксин II вызывает лизис тромбоцитов и эритроцитов в очень низких концентрациях (нМ), что зависит от наличия сфингомиелина (Belmonte et al., 1993; Масек et al., 1994), остается неясным, требуется ли специфический рецептор для обеспечения действия этого токсина или оно обусловлено исключительно неспецифическим нарушением целостности мембраны. Мнение, что гемолиз и лизис других клеток является результатом токсин-липидных взаимодействий, основано на способности токсина разрушать мембраны липидных везикул (Belmonte et al., 1993; Масек et al., 1995), но прямые доказательства того, что молекулярные события, ведущие к гемолизу и лизису именно для этого токсина, в отличие от подобного токсина стихолизина I (Tejusa et al., 2001), одинаковы в обоих случаях, в настоящее время отсутствуют. Фундаментальной стадией взаимодействия токсина с мембраной является его связывание и внедрение в мембрану. С общей точки зрения понятно, что способ внедрения может изменить последующие шаги само-ассоциации пептида и его перераспределение в пределах компонент мембраны, в конечном счете ведущим к формированию пор и лизису клетки. Например, в случае колицина А было установлено, что внедрение и формирование каналов представляют собой разные стадии (Duche et al., 1994). Аналогично, было предложено, что гемолиз, индуцированный термостабильным гемолизином, включает по крайней мере две стадии: связывание и пост-связывание, и что мутантный токсин может отличаться от нативного в последней стадии (Tang et al., 1994). В случае модельных систем

связывание EqtII происходит в две стадии (Hong et al., 2002). Предполагается, что он формирует поры тороидальной структуры (Alvarez et al., 2009).

Также как и для некоторых других токсинов (Pasternak et al., 1985; Menestrina et al., 1994; Hewlett et al., 1991), гемолитические свойства эквинатоксина II зависят от присутствия двухвалентных катионов (Masek, Lebez, 1981; Masek et al., 1994), в частности, Ca^{2+} . Было установлено, что бифазный эффект Ca^{2+} зависит от концентрации катионов и химической модификации структуры молекулы токсина (Masek et al., 1994). Однако природа влияния катионов на токсин-индуцируемый гемолиз остается неясной. Настоящая работа посвящена изучению взаимосвязи между процессами связывания EqtII с мембраной эритроцитов и стехиометрией образования пор, а также механизма действия Ca^{2+} на гемолиз эритроцитов, индуцируемый эквинатоксином II.

Методы исследования

Эритроциты человека получали, добавляя несколько капель крови донора к 10 мл физиологического раствора TBS (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4), перемешивали и дважды отмывали путем центрифугирования (2000 g, 3 мин). 30 мкл полученного осадка эритроцитов разводили в 0,5 мл физиологического раствора и использовали в течение нескольких часов как сток-суспензию. Использовали ЭДТА, A23187, D(+)-трегалозу дигидрат фирмы Sigma (США); полиэтиленгликоль PEG 4000 фирмы Ferak (Германия), раффинозу фирмы Pfanstiehl Laboratories Inc. (Waukegan, IL). Остальные реактивы были квалификации х.ч. или ч.д.а. Эквинатоксин II был любезно предоставлен Др. П.Мачеком (Университет Любляна, Словения) и Др. Д.Менестриной (Поло, Тренто, Италия).

Определение гемолиза. Динамику гемолиза эритроцитов и изменение их формы при взаимодействии с токсином измеряли спектрофотометрически при длине волны 720 нм (Belmonte et al., 1993; Masek et al., 1994; Menestrina et al., 1994; Hewlett et al., 1991). Сток-суспензию эритроцитов (6–7 мкл) помещали в кювету спектрофотометра (2 мл) при постоянном перемешивании, таким образом, чтобы начальное пропускание составляло 0,12–0,13. Эта величина соответствует концентрации клеток в кювете $0,8 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл, которая была определена с помощью счетчика клеток. Аликвоты токсина из концентрированного сток-раствора, приготовленного на физиологическом растворе (40 мкг/мл), или других веществ (1 М для Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} и ЭДТА, 1,4 М для сахарозы, 2 М для трегалозы, 0,5 М для раффинозы) добавляли в кювету с клетками или без них. Время смешивания составляло приблизительно 2 с. Поскольку оптическая плотность (ОП) суспензии пропорциональна концентрации клеток, измеряемая скорость изменения ОП пропорциональна скорости гемолиза (Belmonte et al., 1993; Rudenko, Nipot, 1996). Во всех случаях скорость гемолиза выражали в условных единицах (у.е.), рассчитанных из кинетических кривых как тангенс угла наклона α линейного участка зависимости оптического пропускания от времени. Одна условная единица соответствует скорости изменения пропускания $8,3 \cdot 10^{-4}$ ед. ОП в секунду. Эксперименты проводили при комнатной температуре 20–24°C и были воспроизведены от трех до четырех раз на различных образцах крови. Данные показывают типичные результаты, полученные для одного донора. Качественно аналогичные результаты были получены для других доноров, однако величина эффектов может варьировать до трех раз в зависимости от образца крови. Воспроизводимость результатов для одного донора обычно составляет ~15%. Для увеличения воспроизводимости сток-суспензию токсина выдерживали на льду. Это значительно уменьшило спонтанную инактивацию разбавленной суспензии токсина по сравнению с ее хранением при комнатной температуре.

Обработка эритроцитов ионофором A23187. 100 мкл суспензии эритроцитов с концентрацией $3 \cdot 10^8$ клеток в 1 мл инкубировали в физиологическом растворе при комнатной температуре в течение 1 часа в присутствии 5 мкМ A23187 и указанного количества Ca^{2+} или ЭДТА. После инкубации аликвоту суспензии эритроцитов переносили в кювету, содержащую 2 нМ токсина и, при необходимости, 1 мМ CaCl_2 , после чего измеряли кинетику гемолиза, как описано выше.

Приготовление токсин-индуцированных теней эритроцитов. Суспензию эритроцитов с концентрацией $3 \cdot 10^8$ клеток в 1 мл инкубировали в TBS при комнатной температуре в течение 1 часа в присутствии 200 нМ токсина. В течение этого времени происходил полный гемолиз клеток, и этот образец использовали как источник теней в последующих экспериментах.

Внедрение молекул токсина в мембрану эритроцитов под защитой PEG 4000. Суспензию эритроцитов (0,1 мл) с концентрацией $3 \cdot 10^8$ клеток в 1 мл сначала смешивали с 0,1 мл раствора PEG 4000 (60 мМ), приготовленного на физиологическом растворе. При необходимости CaCl_2 был добавлен до конечной концентрации 1 мМ. После этого аликвоты концентрированного раствора токсина добавляли к каждому образцу, чтобы получить требуемое количество молекул токсина, приходящегося на одну клетку. В течение последующей инкубации (до 3 часов при комнатной

температуре) аликвоты суспензии эритроцитов переносили в кювету, содержащую или не содержащую 1 мМ CaCl₂ и не содержащую токсин, где исследовали кинетику гемолиза. Гемолиз в образцах с токсином отсутствовал при инкубации до 6 часов.

Статистическая обработка результатов. Результаты обрабатывали с использованием t-критерия Стьюдента-Фишера и прикладных компьютерных программ статистической обработки данных «Биостат» и SigmaPlot.

Результаты и их обсуждение

Определение свободной концентрации токсина с использованием референтной порции эритроцитов. Типичные спектрофотометрические треки, полученные в ходе гемолиза, индуцированного EqтII, показывают, что добавление второй порции клеток в среду через различный интервал времени после первой порции эритроцитов или теней ведет к уменьшению скорости их гемолиза (рис. 1).

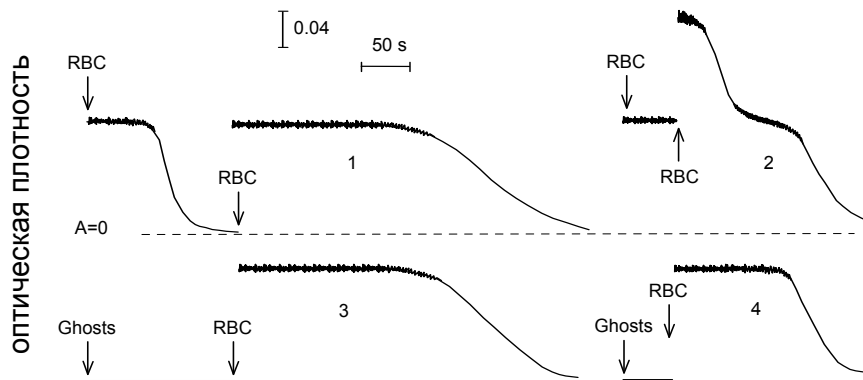


Рис. 1. Типичные спектрофотометрические треки, полученные в ходе гемолиза эритроцитов, индуцированного 5 нМ EqтII

Примечания: стрелки показывают момент добавления порции эритроцитов (RBC) или теней (ghosts) в конечной концентрации $0,8 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл. Тени были приготовлены в результате токсин-индуцированного гемолиза, как описано в методах исследования.

Это обусловлено связыванием токсина с первой порцией клеток или теней и уменьшением концентрации EqтII в среде. Поскольку скорость гемолиза второй порции, фактически, одинакова, независимо от того эритроциты или тени были использованы в качестве первой порции, ясно, что токсин связывается с ними одинаково. Тот факт, что скорость гемолиза пропорциональна свободной концентрации EqтII в нашей экспериментальной системе определения гемолиза, позволяет определить эти концентрации с использованием соответствующих калибровочных кривых. Рис. 2 показывает зависимости доза-ответ для одной и двух порций клеток, а также для смеси клеток и теней. Как и ожидалось, скорость гемолиза двойной порции или одной порции в присутствии теней меньше, чем для одной порции: разница (около 2 раз), хорошо выраженная при низких концентрациях токсина, фактически, устраняется при увеличении его концентрации.

Поскольку в эксперименте вторую (референтную) порцию, как правило, добавляли после полного лизиса первой, для определения свободной концентрации EqтII в кювете непосредственно перед добавлением туда референтной порции, в качестве калибровочной кривой использовали кривую для теней (рис. 2, треугольники). Такой подход позволяет определить кинетику связывания EqтII с мембранами эритроцитов.

Кинетика связывания EqтII с мембранами эритроцитов в свободном растворе и под протекцией PEG 4000 и Cd²⁺. Рис. 3 показывает динамику связывания EqтII в ходе гемолиза, индуцированного 20 нМ и 5 нМ токсина для нативных клеток и клеток, обработанных A23187 и 1 мМ CaCl₂. При высокой концентрации (20 нМ) разницы между нативными и обработанными клетками не наблюдается, а при низких концентрациях обработанные клетки связывают EqтII быстрее. В результате, в этих случаях свободная концентрация токсина отличается в два раза.

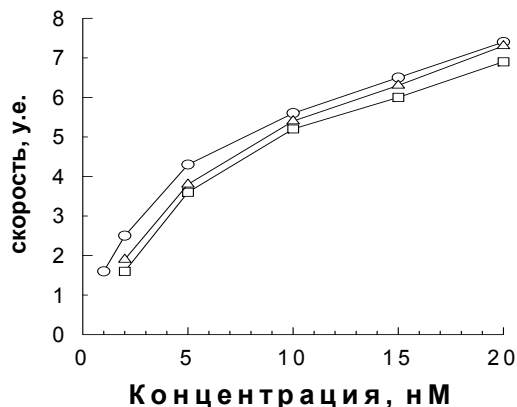


Рис. 2. Зависимость скорости гемолиза от концентрации EqII

Примечания: эритроциты в концентрации $0,8 \cdot 10^6$ кл/мл (O) или $1,6 \cdot 10^6$ (□) или эритроциты и тени в концентрации $0,8 \cdot 10^6$ кл/мл каждый (Δ) добавляли в среду, содержащую указанное количество EqII и скорость гемолиза определяли, как указано в методах исследования.

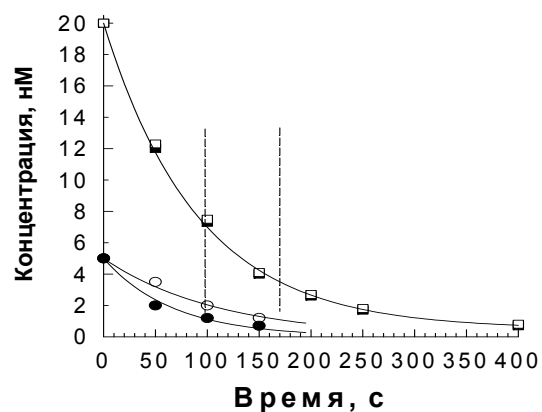


Рис. 3. Кинетика связывания EqII с мембранами эритроцитов

Примечания: нативные клетки (открытые символы) или эритроциты, обработанные A23187 и Ca^{2+} (закрытые символы) инкубировали заданное время в кювете в присутствии 5 нМ (O, ●) или 20 нМ (□, ■) токсина. Свободную концентрацию EqII в растворе рассчитывали из скорости гемолиза второй порции эритроцитов, как показано на рис. 1, используя калибровочную кривую, приведенную на рис. 2. Пунктирные линии показывают интервал времени, соответствующий полному гемолизу, индуцированному 20 нМ и 5 нМ токсина соответственно.

Это коррелирует с большей скоростью гемолиза нагруженных кальцием клеток (см. ниже). Во всех случаях кинетические кривые хорошо описываются экспоненциальной функцией вида $C_{\text{free}} = C_0 \exp(-kt)$, где C_0 и C_{free} – начальная и текущая концентрации EqII в растворе и k – константа скорости. Для нативных клеток константа скорости не зависела от начальной концентрации EqII и в обоих случаях равнялась $0,010 \pm 0,001 \text{ с}^{-1}$, тогда как для обработанных клеток константа увеличилась до $k = 0,015 \text{ с}^{-1}$. Это показывает, что увеличение внутриклеточной концентрации кальция увеличивает способность клеток связывать EqII, что может быть базисом для объяснения активирующего эффекта этих катионов на EqII-индуцируемый гемолиз (Masek, Lebez, 1981; Masek et al., 1994). Мы установили, что скорость гемолиза, определяемая данным методом, не является максимальной при заданной концентрации токсина в среде. Рис. 4 иллюстрирует этот факт в эксперименте, в котором гемолиз был сначала ингибирован 1 мМ Cd^{2+} и затем стимулирован эквимольной EDTA. Как видно, скорость гемолиза увеличилась в несколько раз, если клетки инкубировали в присутствии токсина в течение до 8 минут.

Эти данные можно объяснить тем, что Cd^{2+} , ингибируя токсин-индуцированный гемолиз, не предотвращает связывание токсина, приводя к увеличению его концентрации в мембране. Следовательно, нарастание чувствительности эритроцитов к гемолизу, запускаемому EDTA (рис. 4), также отражает кинетику связывания токсина с мембраной. Интересно, что видимая константа скорости в этих экспериментах имеет порядок $0,004 \text{ с}^{-1}$, что близко к соответствующей константе, полученной выше. Тот факт, что тени эритроцитов, полученные в результате токсин-индуцированного гемолиза, связывают токсин аналогично клеткам, предполагает, что связывание происходит неспецифично, т.е. большая доля молекул токсина прямо не участвует в гемолизе. Для того чтобы оценить минимальное количество связанного токсина, который способен вызывать гемолиз, клетки инкубировали в TBS, содержащем 30 мМ PEG 4000, который осмотически протектировал эритроциты

против гемолиза, и необходимой концентрации токсина, чтобы получить определенное количество молекул токсина на клетку в предположении полного связывания. Рис. 5 показывает, что эритроциты лизируют в среде, свободной от токсина, после предварительной инкубации в среде, содержащей EqтII. Динамика этого процесса также демонстрирует насыщение, указывающее на время-зависимое связывание. Однако в противоположность предыдущим случаям, видимая константа скорости в присутствии PEG 4000 намного меньше (порядка $0,0014 \text{ с}^{-1}$) и увеличивается при увеличении концентрации EqтII.

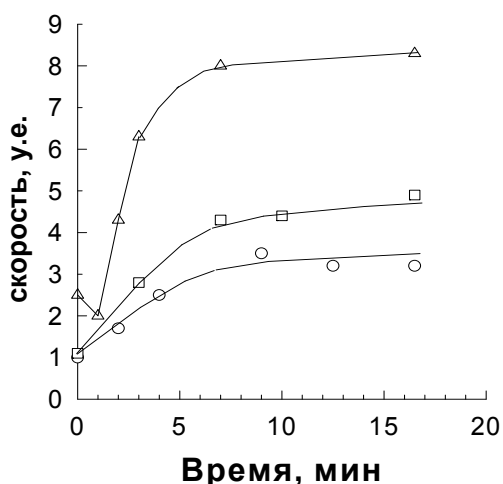


Рис. 4. Влияние длительности периода инкубации эритроцитов на гемолиз, индуцированный 1 мМ EDTA

Примечания: эритроциты в концентрации $0,8 \cdot 10^6$ кл/мл инкубировали в кювете в присутствии 0,5 (O), 0,75 (□) или 3 нМ (Δ) токсина и 1 мМ CdCl_2 , который полностью протектировал клетки от гемолиза. EDTA добавляли для стимуляции гемолиза и его скорость определяли, как указано в методах исследования.

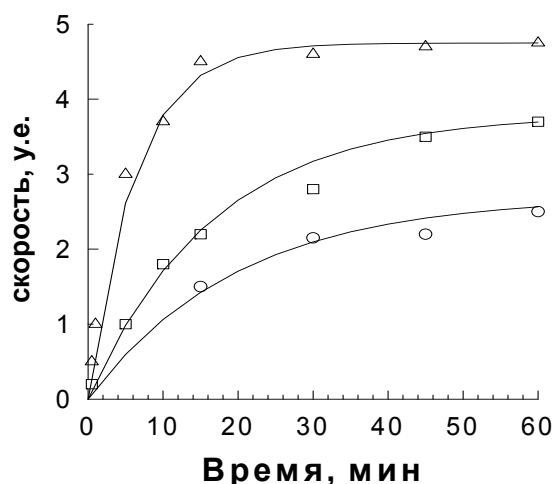


Рис. 5. Зависимость скорости гемолиза в среде, свободной от токсина, от времени эквипирации эритроцитов с EqтII

Примечания: эритроциты в концентрации $1,5 \cdot 10^8$ кл/мл инкубировали в среде, содержащей 30 мМ PEG 4000 и количество EqтII для того, чтобы получить 120 (O), 160 (□) и $200 \cdot 10^3$ (Δ) молекул токсина на одну клетку. В указанное время аликвоту клеточной суспензии добавляли в кювету для определения скорости гемолиза. Линии представляют собой аппроксимацию данных с помощью экспоненциальной функции.

Эти результаты трудно сравнивать между собой непосредственно, ввиду различий в экспериментальных условиях, относящихся к концентрации клеток и токсина и присутствия PEG 4000. Возможно, высокая концентрация эритроцитов и наличие в среде PEG по отдельности или в комбинации могут уменьшить скорость связывания или скорость последующих стадий распределения EqтII в пределах мембраны, которые ведут к формированию пор после его первоначального связывания. Примечательно, однако, что довольно ограниченное количество молекул EqтII, связанных с мембраной, способно инициировать гемолиз. Например 200000 молекул токсина на клетку вызывают гемолиз с той же скоростью, что и ~ 7 нМ свободного EqтII в растворе, т.е. около $4 \cdot 10^6$ молекул токсина на клетку в предположении полного связывания.

Влияние Ca^{2+} на токсин-индуцируемый гемолиз. Как было установлено ранее, Ca^{2+} является активатором токсин-индуцированного гемолиза (Masek, Lebez, 1981; Masek et al., 1994), однако механизм его действия остается не определенным. Результаты, полученные выше, показывают, что это может быть связано с большей степенью связывания токсина с мембраной в присутствии Ca^{2+} , поскольку эритроциты, обработанные A23187, связывают токсин сильнее. Для уточнения этого вопроса мы сравнили зависимости доза-ответ для нативных и обработанных A23187 клеток, претерпевающих гемолиз в присутствии и отсутствии Ca^{2+} . Данные, приведенные на рис. 6, показывают, что Ca^{2+} значительно активирует гемолиз особенно при низких концентрациях EqтII. Такой же, но менее выраженный эффект был получен для модифицированных клеток.

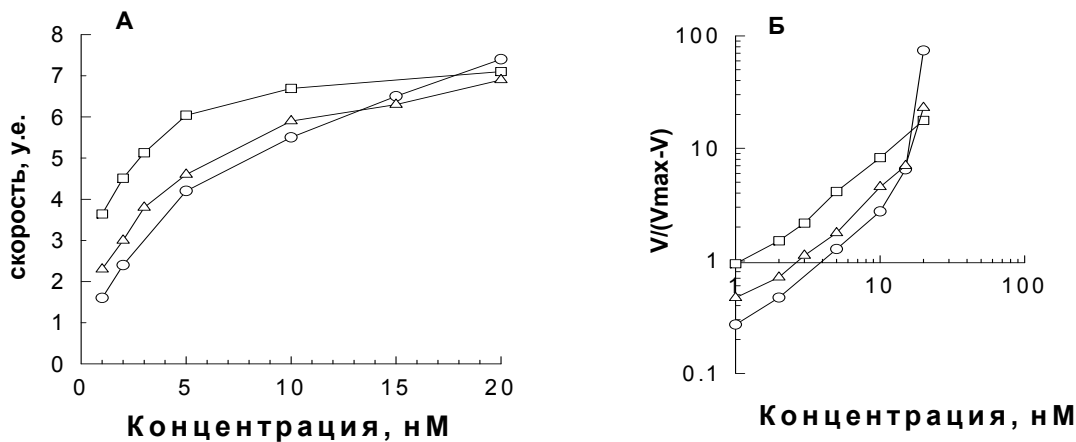


Рис. 6. Зависимость скорости гемолиза от концентрации EqtII

Примечание: (А) и соответствующие графики Хилла (Б) для нативных клеток (О), клеток, обработанных А23187 (Δ) и нативных клеток, гемолизировавших в присутствии 5 мМ CaCl₂ (□).

Несмотря на то, что скорость гемолиза в присутствии Ca²⁺ была выше, все соответствующие зависимости Хилла имели одинаковый вид, что указывает на то, что порядок литической реакции во всех случаях не изменяется. В диапазоне концентраций EqtII до 10 нМ коэффициент Хилла близок к единице, но при дальнейшем увеличении концентрации приближается к двум. Это можно интерпретировать как то, что функциональной единицей гемолиза является мономер токсина, тогда как димеризация, возможно, имеет место при больших концентрациях токсина.

Другой тип зависимостей доза-ответ показан на рис. 7. Этот график соответствует равновесным порам, сформированным после продолжительной инкубации эритроцитов под протекцией PEG 4000 в среде, содержащей или не содержащей 1 мМ CaCl₂.

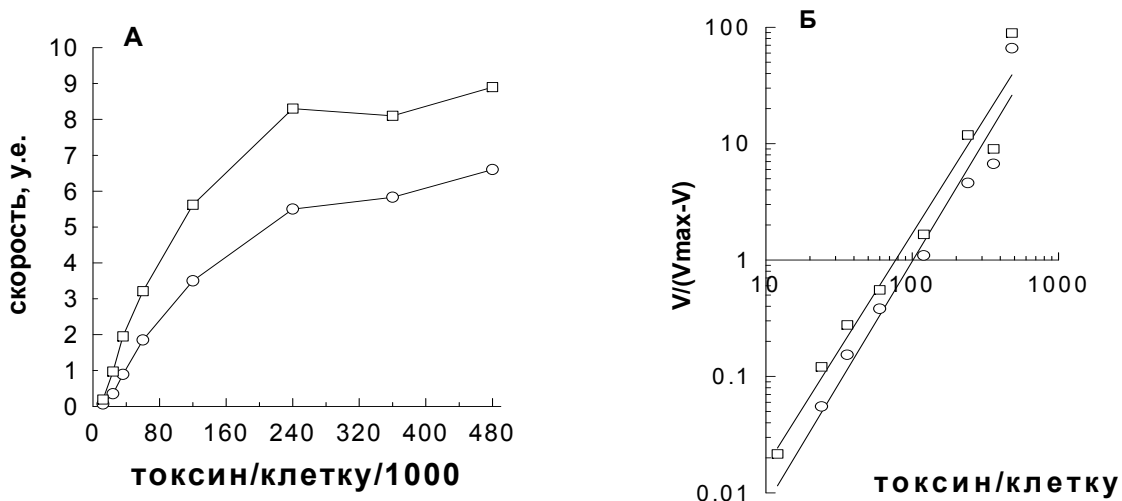


Рис. 7. Зависимости доза-ответ (А) и соответствующие графики Хилла (Б) для нативных клеток (О) и эритроцитов, обработанных токсином в присутствии 1 мМ CaCl₂ (□)

Примечания: эритроциты обрабатывали токсином в течение 2 часов под защитой PEG 4000 и затем переносили в кювету для определения скорости гемолиза. Показан типичный график из 4 независимых экспериментов.

Как видно, в обоих случаях эти зависимости хорошо описываются зависимостью Хилла с коэффициентом, равным 2. Это показывает, что здесь функциональной единицей является димер

токсина. Из графиков Хилла можно рассчитать количество токсин-связывающих участков на мембране эритроцита, которое оказалось равным $(180 \pm 35) \times 1000$ (среднее \pm ст.откл., $n=4$) на одну клетку. Очевидно, что Ca^{2+} , хотя и увеличивает скорость гемолиза при заданной концентрации токсина в мембране, тем не менее, не изменяет числа связывающих сайтов и порядка литической реакции. Это предполагает, что функциональные свойства пор, формируемых в присутствии Ca^{2+} , отличаются от тех, которые образуются в отсутствие катионов по отношению, например, к их размеру или проводимости.

Сравнение свойств динамических и равновесных токсин-индуцированных пор. Для того чтобы установить природу влияния Ca^{2+} на активацию EqtII-индуцированного гемолиза, мы сравнили влияние ингибиторов Cd^{2+} и трегалозы, а также осмотического протектора раффинозы на подавление гемолиза, индуцированного динамическими или равновесными порами. Термин «динамические поры» означает, что они формируются в условиях, когда клетки непосредственно инкубируют в среде с токсином: этот многоступенчатый процесс, включающий связывание мономера токсина с мембраной, олигомеризацию мономеров, образование проницаемых для катионов пор, набухание эритроцитов, образование литических пор и выход гемоглобина из эритроцитов, регистрируется спектрофотометрически. Равновесные поры – означает, что гемолиз был ингибирован PEG 4000, что позволяет молекулам токсина перераспределяться в плоскости мембраны и формировать функциональные, но заблокированные поры. В этом случае, за счет того, что размер молекул PEG больше, чем эффективный гидродинамический диаметр пор, последней стадии, т.е. выхода гемоглобина не происходит.

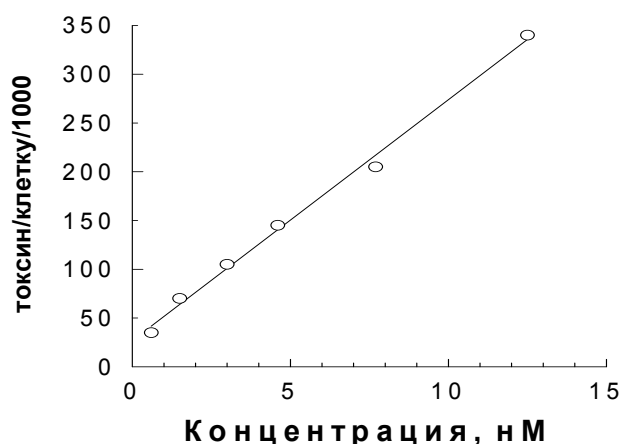


Рис. 8. Взаимозависимость между количеством токсина, связанного с мембраной, и концентрацией свободного токсина в растворе, которые вызывают гемолиз эритроцитов с одинаковой скоростью

Примечание: данные рассчитаны из результатов, представленных на рис. 2 и 7.

Рис. 8, полученный из данных, представленных на рис. 2 и 7, показывает линейную зависимость между количеством связанного EqtII, который формирует равновесные поры, и концентрацией свободного EqtII в растворе, которая приводит к той же скорости гемолиза. Это дополнительно подтверждает, что только часть молекул EqtII прямо участвуют в формировании динамических пор, тогда как другая часть связывается с мембраной не специфически.

Данные, приведенные на рис. 9 и 10, показывают другие различия между двумя типами пор как разницу в ингибирующей способности Cd^{2+} и трегалозы в отношении пор, формируемых в присутствии и отсутствии кальция. Равновесные поры, сформированные в присутствии Ca^{2+} , немного менее чувствительны к действию кадмия и трегалозы по сравнению с порами без кальция. Эта взаимосвязь выражена в большей степени для динамических пор.

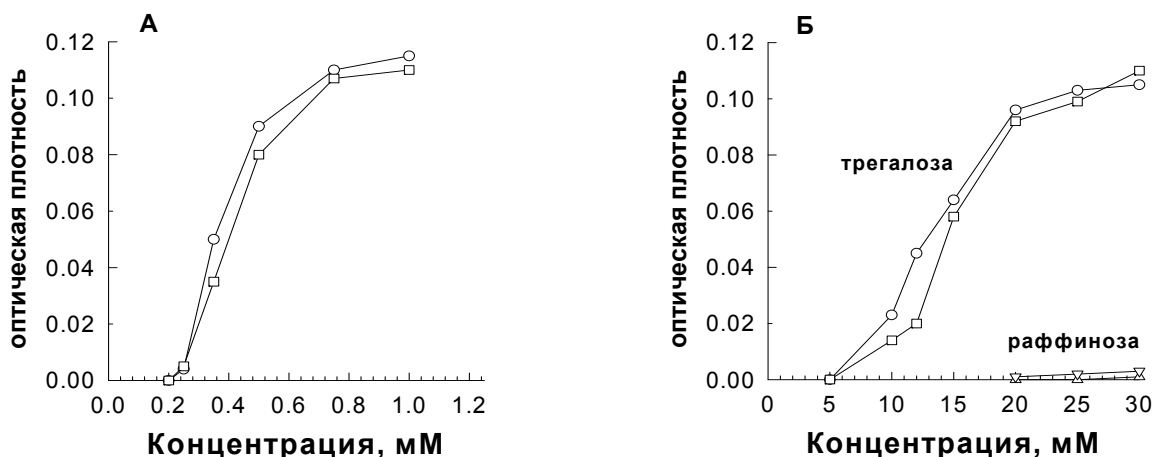


Рис. 9. Ингибирование равновесных EqII-индуцированных пор ионами Cd²⁺ (А), трегалозой и раффинозой (Б)

Примечания: эритроциты насыщали токсином в количестве 400 000 молекул на одну клетку под протекцией 30 мМ PEG 4000 в течение 2 часов в отсутствие (O, Δ) и присутствии 1 мМ CaCl₂ (□, ▽) и затем переносили в среду, свободную от токсина, но содержащую ингибиторы. Указанные значения оптической плотности суспензии эритроцитов измеряли через 150 с после их инкубации в TBS. Начальная величина ОП 0,12 для нативных клеток соответствует нулевому гемолизу. Величина ОП, равная нулю, соответствует 100% гемолизу.

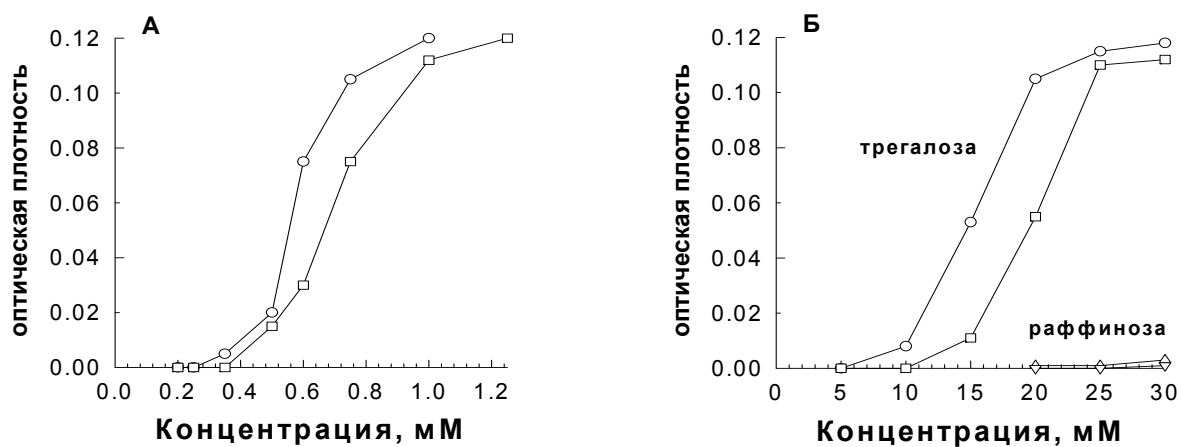


Рис. 10. Ингибирование динамических EqII-индуцированных пор ионами Cd²⁺ (А), трегалозой и раффинозой (Б)

Примечания: эритроциты добавляли в среду, содержащую 10 нМ EqII и ингибиторы в отсутствие (O, Δ) и присутствии 1 мМ CaCl₂ (□, ▽). Указанные значения оптической плотности суспензии эритроцитов измеряли через 150 с после их инкубации в TBS. Начальная величина ОП 0,12 для нативных клеток соответствует нулевому гемолизу. Величина ОП, равная нулю, соответствует 100% гемолизу.

Кроме этого, все типы динамических пор менее чувствительны к ингибиторам по сравнению с соответствующими равновесными порами. Из этого можно заключить, что молекулярная структура пор, формируемая EqII в присутствии Ca²⁺, отличается от той, которая формируются без Ca²⁺. Следовательно, Ca²⁺ принимает непосредственное участие в молекулярной организации пор. Прямые доказательства того, что Ca²⁺ влияет на процесс формирования пор только на ранних стадиях этого процесса, представлены на рис. 11.

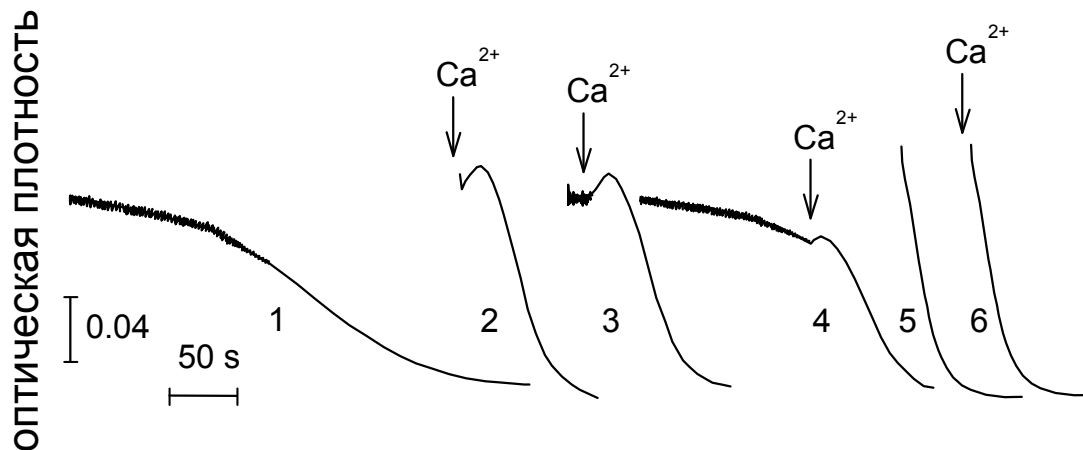


Рис. 11. Влияние Ca^{2+} на стимуляцию EqtII-индуцированного гемолиза

Примечания: эритроциты в концентрации $1,5 \cdot 10^8$ кл/мл инкубировали в среде, содержащей 30 мМ PEG 4000 и 200 нМ токсина (400 000 молекул на одну клетку) в течение 15 с (треки 1–4) или 2 часа (треки 5 и 6) и затем переносили в кювету для регистрации динамики гемолиза. Стрелки показывают момент добавления CaCl_2 в конечной концентрации 5 мМ из концентрированного раствора.

Оказалось, что инкубация эритроцитов с EqtII в течение только 15 с уже достаточно для того, чтобы вызвать гемолиз в среде, свободной от токсина, но с малой скоростью (трек 1). Примечательно, что его динамика в принципе напоминает таковую, индуцированную свободным токсином (см. рис. 1), которая включает выраженный лаг-период, несмотря на то, что свободный токсин в среде отсутствует. Если Ca^{2+} добавляли в среду до клеток, он значительно (до 6 раз) увеличивал скорость гемолиза. Активирующий эффект Ca^{2+} несколько снижался по мере увеличения интервала времени между добавлением клеток и катионов (треки 2–4). Наконец, клетки становились полностью не чувствительными к Ca^{2+} после длительной инкубации с токсином (треки 5 и 6). Эти данные показывают, что Ca^{2+} существенно увеличивает способность EqtII, уже связанного с мембраной, формировать функциональные поры, предположительно, за счет увеличения скорости ассоциации токсина с мембранным рецептором. Однако когда поры уже сформировались, Ca^{2+} теряет свою активирующую способность. Из этих данных становится ясным, почему кинетика связывания EqtII не соответствует кинетике формирования равновесных пор, приведенной на рис. 3 и 5. Это происходит потому, что скорость-ограничивающей стадией в формировании равновесных пор является перераспределение молекул EqtII в плоскости мембраны, а не связывание само по себе. Как следует из рис. 11, связывание является относительно быстрым процессом по сравнению с последующим формированием пор.

Полученные данные показывают, что кинетика связывания EqtII с мембраной эритроцитов подчиняется моноэкспоненциальной зависимости с постоянной времени порядка $0,01 \text{ с}^{-1}$. Это означает, что связывание начинается немедленно после смешивания токсина с клетками. Тем не менее, гемолиз эритроцитов начинается только после достаточно продолжительного лаг-периода, который зависит от концентрации EqtII. В этом состоит его значительное отличие от процесса высвобождения маркеров из липосом, который начинается без видимой задержки (Belmonte et al., 1993; Masek et al., 1995), что показывает, что механизм пермеабилзации эритроцитов и липосом не является одинаковым, как обычно предполагается (Belmonte et al., 1993; Masek et al., 1994, 1995). Иное объяснение различий в кинетике гемолиза и лизиса может заключаться в том, что гемолиз эритроцитов может быть задержан за счет перераспределения катионов калия и натрия между клеткой и средой, которое должно происходить перед началом гемолиза, чем и может объясняться наблюдаемый лаг-период. Однако мы установили, что кинетика гемолиза не изменяется, если весь внеклеточный натрий заменить на калий – не изменяется ни скорость гемолиза, ни длительность лаг-периода. Кроме этого, связывание EqtII с липосомами происходит быстрее, чем с эритроцитами (Belmonte et al., 1993; Masek et al., 1995). Тот факт, что титры, полученные в результате гемолиза, вызванного EqtII, связывают его подобно нативным клеткам (рис. 1 и 2), линейная зависимость между количеством связанного и концентрацией свободного EqtII, вызывающих равную скорость гемолиза

(рис. 8), и ограниченное количество связанного EqtII, требуемое для инициации гемолиза, подтверждают существование нелитических сайтов для токсина на мембране эритроцитов.

Количество этих сайтов, по крайней мере, на порядок больше, чем количество литических сайтов. Используя эксперимент с протекцией, мы получили верхнюю оценку количества токсин-связывающих сайтов, как $(180 \pm 35) \times 1000$ на одну клетку. Зависимость доза-ответ, полученная в случае динамических пор, т.е. тех, которые формируются в условиях относительно высоких концентраций EqtII в среде (рис. 6), указывает на то, что функциональной единицей, ответственной за гемолиз в данных условиях, является мономер токсина. Следовательно, мономер EqtII, в принципе, достаточен для инициации гемолиза. Это не соответствует стехиометрии EqtII-индуцированного порообразования в случае липидных везикул, где необходимо было наличие трех, четырех или более копий EqtII, чтобы вызвать лизис (Belmonte et al., 1993; Hong et al., 2002), но хорошо согласуется с тем, что ПААГ обнаруживал наличие димеров EqtII в мембране эритроцитов только после химического поперечного сшивания (Masek et al., 1994).

Функциональной единицей равновесных пор является димер токсина, что следует из графика Хилла с коэффициентом $n=2$ (рис. 7). Эта разница в размере функциональной единицы для динамических и равновесных пор может быть объяснена на основе ассоциации двух молекул EqtII с одним рецептором, что происходит в условиях равновесия. Это предполагает, что вышеприведенная величина количества токсин-связывающих сайтов в два раза завышена. По-видимому, реальное количество рецепторов EqtII еще меньше, чем эта величина, поскольку трудно исключить возможность того, что даже в условиях равновесия некоторое количество EqtII связывается неспецифически с нелитическими сайтами. Тем не менее, данная оценка свидетельствует в пользу того, что для обеспечения литического действия EqtII на мембране эритроцитов должен существовать специфический рецептор. Это дополнительно подтверждается данными, что такое низкое количество токсина, связанного с мембранами липидных везикул, не вызывает никакой утечки их содержимого (Belmonte et al., 1993), что показывает, что молекулярная основа гемолиза и лизиса липосом различна.

Наличие специфического рецептора представляет собой хорошую основу для объяснения этих различий. Наши данные и данные, полученные ранее (Masek et al., 1994), показывают, что Ca^{2+} является активатором EqtII-индуцированного гемолиза. Исходя из наших данных, механизм его действия состоит в следующем. Ca^{2+} играет две главные роли в гемолизе. Во-первых, он значительно увеличивает скорость связывания EqtII с мембраной эритроцитов, таким образом, увеличивая количество пор и, соответственно, увеличивая скорость гемолиза. По-видимому, Ca^{2+} действует изнутри клетки, поскольку нагрузка клеток Ca^{2+} с использованием ионофора A23187 делает их более чувствительными к гемолизу по сравнению с нативными. Кальций может поступать в клетку через токсин-индуцированные каналы, поскольку они проницаемы для этих ионов (Zogec et al., 1990). Интересно, что в случае EqtII-индуцированного гемолиза увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} не приводит к активации канала Гардоша, поскольку мы не наблюдали фазы сжатия клеток, которая регистрируется в похожих условиях, если клетки обрабатывали альфа-гемолизином. В последнем случае эта фаза блокировалась блокаторами канала Гардоша (Skals et al., 2010). Выраженное сжатие и ингибирование всего гемолитического процесса наблюдалось, однако, если мы увеличивали концентрацию сахарозы в изотонической среде свыше 70 мМ, даже при номинальном отсутствии кальция (не опубликованные данные). Это говорит о том, что эффекты кальция в данном случае не могут быть напрямую объяснены известной ролью этих катионов как вторичных мессенджеров ряда внутриклеточных процессов, ведущих к дегидратации клетки, активации скрамблаз, модуляции везикуляции мембран и т.д. С другой стороны, Ca^{2+} сам по себе не изменяет ни количества, ни порядка гемолитической реакции, как для динамических, так и для равновесных пор (рис. 6 и 7). Более того, все равновесные поры являются не чувствительными к Ca^{2+} . Это показывает, что Ca^{2+} проявляет свой эффект только на ранних стадиях формирования пор, облегчая взаимодействие EqtII с рецептором. Данные рис. 11 прямо подтверждают это предположение, показывая, что Ca^{2+} существенно стимулирует перераспределение EqtII, уже связанного с мембраной, что ведет к образованию функциональной поры. Универсальное объяснение всех этих эффектов состоит в том, что Ca^{2+} сильно увеличивает аффинность рецептора к EqtII, таким образом, облегчая латеральное или/и трансмембранное перераспределение EqtII между литическими и нелитическими сайтами. Дополнительное, не прямое подтверждение этого заключения состоит в том, что Ca^{2+} вызывает быструю трансформацию формы эритроцитов перед началом гемолиза, что следует из начального увеличения в ОП и уменьшения ее флуктуаций (рис. 11) (Rudenko, Nipot, 1996; Rudenko et al., 1998). Во-вторых, ионы Ca^{2+} непосредственно принимают участие в структуре образующихся пор. В результате образуются поры с различными свойствами. Основной эффект Ca^{2+}

на структуру пор состоит в том, что поры, сформированные в его присутствии, менее чувствительны к действию ингибиторов кадмия и трегалозы, а также осмотического протектора раффинозы. Это указывает на больший размер этих пор, что справедливо как в отношении динамических, так и равновесных пор. В свою очередь, данные показывают, что сами по себе динамические поры больше, чем равновесные, и хуже блокируются ингибиторами. Этот факт подтверждается тем, что только PEG 4000, молекулы которого имеет большой размер, протектировал эритроциты против гемолиза в условиях, используемых для внедрения EqII в мембрану, а именно при высоких концентрациях токсина. Cd^{2+} и трегалоза, размер которых меньше, чем PEG 4000, были не эффективными при данных обстоятельствах.

Остается неясным, почему динамические поры, основанные на мономере EqII и формируемые как в присутствии, так и в отсутствии Ca^{2+} , имеют больший размер по сравнению с равновесными, которые образуются димером токсина. Можно ожидать, что большая функциональная единица должна вести к появлению более крупных пор, как это происходит в случае других токсинов (Menestrina et al., 1994). Вероятно, что в данном случае динамические поры представляют собой переходные структуры, которые уменьшают свой размер после димеризации в равновесных условиях. EqII-индуцированные поры очень чувствительны к действию специфических ингибиторов – кадмия и трегалозы. Оба реагента ингибировали гемолиз с высокой кооперативностью в относительно узком диапазоне концентраций (0,2–0,3 мМ для Cd^{2+} и 10–25 мМ для трегалозы). Тот факт, что данный тип ингибирования осуществляется за счет их специфических и обратимых взаимодействий с порой, подтверждается нашими данными о слабой способности (по крайней мере, слабее, чем раффинозы) схожего соединения – сахарозы и другого аналога трегалозы – α, α -трегалозы фирмы Pfanstiehl Laboratories Inc. (Waukegan, IL) ингибировать гемолиз. Таким образом, блокирующее свойство трегалозы зависит еще и от структуры самой ее молекулы, – факт, который требует дальнейшего изучения. Было отмечено, что трегалоза является уникальным соединением, способным стабилизировать мембраны нативных клеток и липидных бислоев (Crowe et al., 2001, 2003; Satpathy et al., 2004; Wolkers et al., 2001). Настоящие данные показывают эффективность D(+)-трегалозы как сильного неосмотического протектора в отношении гемолиза, индуцированного EqII.

Список литературы

- Alvarez C., Mancheno J.M., Martinez D. et al. Sticholysins, two pore-forming toxins produced by the Caribbean Sea anemone *Stichodactyla helianthus*: their interaction with membranes // *Toxicon*. – 2009. – Vol.54 (8). – P. 1135–1147.
- Batista U., Macek P., Sedmak B. The cytotoxic and cytolytic activity of equinatoxin II from the sea anemone *Actinia equina* // *Cell Biol. Int. Rep.* – 1990. – Vol.14 (11). – P. 1013–1024.
- Belmonte G., Pederzoli C., Macek P., Menestrina G. Pore formation by the sea anemone cytolysin equinatoxin II in red blood cells and model lipid membranes // *J. Membr. Biol.* – 1993. – Vol.131 (1). – P. 11–22.
- Bunc M., Drevensek G., Budihna M., Suput D. Effects of equinatoxin II from *Actinia equina* (L.) on isolated rat heart: the role of direct cardiotoxic effects in equinatoxin II lethality // *Toxicon*. – 1999. – Vol.37 (1). – P. 109–123.
- Crowe J.H., Crowe L.M., Oliver A.E. et al. The trehalose myth revisited: introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state // *Cryobiology*. – 2001. – Vol.43 (2). – P. 89–105.
- Crowe J.H., Tablin F., Wolkers W.F. et al. Stabilization of membranes in human platelets freeze-dried with trehalose // *Chem. Phys. Lipids*. – 2003. – Vol.122 (1-2). – P. 41–52.
- Duche D., Parker M.W., Gonzalez-Manas J.M. et al. Uncoupled steps of the colicin A pore formation demonstrated by disulfide bond engineering // *J. Biol. Chem.* – 1994. – Vol.269 (9). – P. 6332–6339.
- Hewlett E.L., Gray L., Allietta M. et al. Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. Conformational change associated with toxin activity // *J. Biol. Chem.* – 1991. – Vol.266 (26). – P. 17503–17508.
- Hong Q., Gutierrez-Aguirre I., Barlic A. et al. Two-step membrane binding by Equinatoxin II, a pore-forming toxin from the sea anemone, involves an exposed aromatic cluster and a flexible helix // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol.277 (44). – P. 41916–41924.
- Lafranconi W.M., Ferlan I., Russell F.E., Huxtable R.J. The action of equinatoxin, a peptide from the venom of the sea anemone, *Actinia equina*, on the isolated lung // *Toxicon*. – 1984. – Vol.22 (3). – P. 347–352.
- Macek P., Belmonte G., Pederzoli C., Menestrina G. Mechanism of action of equinatoxin II, a cytolysin from the sea anemone *Actinia equina* L. belonging to the family of actinoporins // *Toxicology*. – 1994. – Vol.87 (1–3). – P. 205–227.
- Macek P., Lebez D. Kinetics of hemolysis induced by equinatoxin, a cytolytic toxin from the sea anemone *Actinia equina*. Effect of some ions and pH // *Toxicon*. – 1981. – Vol.19 (2). – P. 233–240.

- Macek P., Zecchini M., Pederzoli C. et al. Intrinsic tryptophan fluorescence of equinatoxin II, a pore-forming polypeptide from the sea anemone *Actinia equina* L., monitors its interaction with lipid membranes // *Eur. J. Biochem.* – 1995. – Vol.234 (1). – P. 329–335.
- Mally M., Majhenc J., Svetina S., Zeks B. Mechanisms of equinatoxin II-induced transport through the membrane of a giant phospholipid vesicle // *Biophys. J.* – 2002. – Vol.83 (2). – P. 944–953.
- Menestrina G., Schiavo G., Montecucco C. Molecular mechanisms of action of bacterial protein toxins // *Mol. Aspects. Med.* – 1994. – Vol.15 (2). – P. 79–193.
- Pasternak C.A., Alder G.M., Bashford C.L. et al. Cell damage by viruses, toxins and complement: common features of pore-formation and its inhibition by Ca^{2+} // *Biochem. Soc. Symp.* – 1985. – Vol.50. – P. 247–264.
- Rudenko S.V., Crowe J.H., Tablin F. Determination of time-dependent shape changes in red blood cells // *Biochemistry (Mosc.)*. – 1998. – Vol.63 (12). – P. 1385–1394.
- Rudenko S.V., Nipot E.E. Protection by chlorpromazine, albumin and bivalent cations against haemolysis induced by melittin, [Ala-14]melittin and whole bee venom // *Biochem. J.* – 1996. – Vol.317 (Pt 3). – P. 747–754.
- Satpathy G.R., Torok Z., Bali R. et al. Loading red blood cells with trehalose: a step towards biostabilization // *Cryobiology*. – 2004. – Vol.49 (2). – P. 123–136.
- Skals M., Jensen U.B., Ousingsawat J. et al. *Escherichia coli* alpha-hemolysin triggers shrinkage of erythrocytes via K(Ca)3.1 and TMEM16A channels with subsequent phosphatidylserine exposure // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol.285 (20). – P. 15557–15565.
- Tang G.Q., Iida T., Yamamoto K., Honda T. A mutant toxin of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin which has lost hemolytic activity but retains ability to bind to erythrocytes // *Infect. Immun.* – 1994. – Vol.62 (8). – P. 3299–3304.
- Tejuca M., Dalla S.M., Potrich C. et al. Sizing the radius of the pore formed in erythrocytes and lipid vesicles by the toxin sticholysin I from the sea anemone *Stichodactyla helianthus* // *J. Membr. Biol.* – 2001. – Vol.183 (2). – P. 125–135.
- Teng C.M., Lee L.G., Lee C.Y., Ferlan I. Platelet aggregation induced by equinatoxin // *Thromb. Res.* – 1988. – Vol.52 (5). – P. 401–411.
- Wolkers W.F., Walker N.J., Tablin F., Crowe J.H. Human platelets loaded with trehalose survive freeze-drying // *Cryobiology*. – 2001. – Vol.42 (2). – P. 79–87.
- Zorec R., Tester M., Macek P., Mason W.T. Cytotoxicity of equinatoxin II from the sea anemone *Actinia equina* involves ion channel formation and an increase in intracellular calcium activity // *J. Membr. Biol.* – 1990. – Vol.118 (3). – P. 243–249.

Представлено: Н.Є.Узленкова / Presented by: N.Ye.Uzlenkova

Рецензент: В.В.Мартиненко / Reviewer: V.V.Martynenko

Подано до редакції / Received: 30.05.11