

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 612.017.4-006.6

М. Г. Геворкян, Р. А. Захарян, Н. Г. Азарян, А. Г. Агабалян,
академик НАН Армении Э. К. Африкян

К механизму интерферон индуцирующей активности
дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis*

(Представлено 29/VI 1994)

Культуры *Bacillus thuringiensis* продуцируют белковой природы дельта-эндотоксин, обладающий выраженной энтомоцидной активностью (1-3). В некоторых сообщениях показана противоопухолевая активность этого токсина из разных штаммов данного вида (4,5).

Установлено также, что индуцированный противоопухолевый иммунитет может быть передан сингенным мышам через лимфоциты свободных от опухолей животных, обработанных таким токсином (6).

Одновременно нами показано, что дельта-эндотоксин, полученный из культур серотипов *kurstaki* и *thuringiensis*, является эффективным индуктором синтеза γ -интерферона и 2'-5' олигоаденилата (4,5).

Условия получения очищенного и активированного дельта-эндотоксина описаны ранее (7,8,3). Дельта-эндотоксин был адсорбирован на культуре моноклеарных клеток периферической крови человека. Лейкоциты были выделены из донорской крови в фикал-верографикном градиенте. Определение активности 2-фосфодиэстеразы проводили по известному методу (9,10). Препарат дельта-эндотоксина гидролизовали трипсином до низкомолекулярных пептидных фрагментов, концентрацию цАМФ измеряли по ранее описанному способу (9).

В настоящей работе показано, что инкубация препаратов дельта-эндотоксина из штамма НД-1 серотипа *kurstaki* с лимфоцитами человека индуцирует в последних повышение уровня цАМФ с ингибированием активности 2-фосфодиэстеразы. Преинкубация дельта-эндотоксина с N-ацетил-D-галактозамином и N-ацетилнейраминовой кислотой контролирует активность эндотоксина, что позволяет предположить участие N-Ас-Гал и N-Ас-Нейр в рецепции дельта-эндотоксина на плазматической мембране лимфоцитов человека.

Установлено, что дельта-эндотоксин при взаимодействии с лимфоцитами индуцирует в них значительное повышение уровня цАМФ (табл.1).

Таблица 1

Влияние дельта-эндотоксина на уровень цАМФ в лимфоцитах человека

Доза эндотоксина, мкг/мл	Уровень цАМФ, пкмоль/10 ⁷ клеток	
	нативный дельта-эндотоксин	гидролизированный дельта-эндотоксин
10	6,7	3,2
20	8,8	3,6
30	12,5	5,8
40	16,9	10,3
50	18,9	12,1

В то же время гидролизат дельта-эндотоксина, содержащий низкомолекулярные пептиды, также проявляет высокую активность, индуцируя повышение уровня цАМФ и ингибирование активности 2-фосфодиэстеразы (табл.2).

Таблица 2

Влияние дельта-эндотоксина на активность 2-фосфодиэстеразы в лимфоцитах человека (средние данные 10 экспериментов)

Лимфоциты	Активность 2-фосфодиэстеразы, имп/мин
Интактные	1260
Обработанные эндотоксином (24 ч)	685
Обработанные гидролизированным эндотоксином (24 ч)	582

Полученные данные свидетельствуют о высвобождении в результате гидролиза эндотоксина полипептида, активного в индукции трансмембранного сигнала, аналогично действию интактного эндотоксина.

Наряду с этим показано, что продукты гидролиза эндотоксина активны также в стимуляции синтеза γ -интерферона лимфоцитами человека (табл.3).

В этих опытах токсин был испытан в условиях стационарного культивирования на лимфоцитах. Пробы культуральной жидкости отбирались через каждые 24 часа в течение всего срока наблюдения. О наличии интерферона судили по титрованию на культуре человеческих диплоидных клеток М-19, а также по защитному действию клеток от ЦПД вируса везикулярного стоматита. Активность интерферона выражали в МЕ/мл. Эта часть работы выполнена в Москве в лаборатории онтогенеза вирусов Института вирусологии им. Д.И.Ивановского.

Ранее было показано, что полипептиды с молекулярной массой 1000 дальтон, высвобождаемые из дельта-эндотоксина в результате расщепления, при определенных значениях рН в инкубационной среде сохраняли свою цитопатогенную активность для клеток гусениц шелкопряда (3).

Таблица 3

Продукция γ -интерферона мононуклеарами крови человека

Дельта-эндотоксин	Доза, мкг/мл	Титр интерферона в МЕ/мл спустя			
		24 ч	48 ч	72 ч	96 ч
<i>B.thuringiensis</i>	10	40-80	320	40-80	160
subsp. <i>kurstaki</i>	10	160-320	320	160	320
НД-I	25	320-640	640	80	320
	50	80	640	640	640
<i>B.thuringiensis</i>	1,0	20	80	80	80
subsp. <i>thuringiensis</i>	10	20	320	80	80
	25	160	320	80	40
	50	80	320-640	320	80
<i>B.thuringiensis</i> НД-I предварительно инкуб. с N-Ас-Гал (125 мМ)	25	20	20	20	20

Для многих физиологически активных веществ, в том числе и токсинов, показано, что при сорбции на поверхности плазматической мембраны клетки они специфически связываются с рецепторными молекулами гликопротеиновой или гликолипидной природы.

Предварительная инкубация дельта-эндотоксина и препаратов его расщепления трипсином с N-Ас-Гал и N-Ас-Нейр в течение 60 мин при 37°C выявила, что N-ацетил-D-галактозамин и N-ацетил нейраминная кислота ингибировали способность эндотоксина индуцировать трансмембранный сигнал, сопровождающийся повышением в клетке уровня цАМФ, понижением активности 2-фосфодиэстеразы цАМФ и повышением в клетке 2'-5' олигоаденилата (¹⁰), рассматриваемых как компоненты единой системы вторичных мессенджеров клетки (табл.4).

Таблица 4

Влияние N-Ас-Гал и N-Ас-Нейр на способность эндотоксина индуцировать трансмембранный сигнал (N-Ас-Гал и N-Ас-Нейр использовались в концентрации 125 мМ/мл)

Доза дельта-эндотоксина, мкг/мл	Уровень цАМФ, пкмоль/10 ⁷ клеток		
	Контроль	N-Ас-Гал	N-Ас-Нейр
10	5,1	2,6	2,4
20	7,9	3,0	2,5
30	12,3	3,2	2,5
40	15,1	4,7	2,5

Эти результаты позволяют предположить, что N-Ас-Гал и N-Ас-Нейр, возможно, являются составной частью рецепторной молекулы лимфоцитов, взаимодействие с которой является первым этапом в механизме индукции γ -интерферона дельта-эндотоксином.

Определенный интерес представляет также и то обстоятельство, что те же глюкоконъюгаты на поверхности плазматической мембраны клеток *S.fumiferana* CF-1 предопределяют связывание дельта-эндотоксина с клетками и последующее развитие цитопатического эффекта, выражающегося в лизисе этих клеток.

Институт молекулярной биологии НАН Армении
Институт микробиологии НАН Армении

Մ. Գ. ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ, Ռ. Ա. ՉԱՔԱՐՅԱՆ, Ն. Դ. ԱԶԱՐՅԱՆ, Ա. Ս. ԱՂԱՔԱԼՅԱՆ.

Հայաստանի ԳԱԱ ակադեմիկոս Է. Գ. ԱՅՐԻԿՅԱՆ

Bacillus thuringiensis-ի դելտա-էնդոտոքսինի ինտերֆերոն-խթանող ակտիվության մեխանիզմի վերաբերյալ

Bacillus thuringiensis-ից ստացված դելտա-էնդոտոքսինը, օժտված լինելով ցայտուն էնտոմոցիդային հատկություններով, առաջացնում է հակառուտացբային իմունիտետ և հանդիսանում է γ -ինտերֆերոնի և 2'-5' օլիգ. ադենիլատի արդյունավետ խթանիչ մարդու պերիֆերիկ արյան մոնոնուկլեար բջիջներում:

Դելտա-էնդոտոքսինը առաջացնում է «ԳԱՄՃ»-ի մակարդակի բարձրացում և ճնշում է 2-ֆոսֆոդիէսֆերազային ակտիվությունը լիմֆոցիտներում: Նրա ֆերմենտային հիդրոլիզից ստացված պոլիպեպտիդները նույնպես էֆեկտիվ են γ -ի ինտերֆերոնի և երկրորդային մեսենջերների ակտիվացման պրոցեսում:

Դելտա-էնդոտոքսինի փոխազդեցությունը լիմֆոցիտների հետ հավանաբար իրականացնում է ռեցեպտորային կառուցվածքներում պարունակող «N-ացետիլ-դ-գալակտոզամինը» և «N-ացետիլ-նեյրամինաթթուն»:

ЛИТЕРАТУРА – ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ P.J.Fast, W.J.Martin, FEBS Lets, v.95, №3, p.1314-1320 (1980). ² S.S.Prasad, J.J.Shethna, Indian Journal of Exper. biol., v.14, p.285-289 (1976). ³ D.P.Stahly, D.W.Dingman, L.A.Bulla, BBRC, v.84, p.581-588 (1978). ⁴ А.С.Агабабян, Р.А.Захарян и др., Журн. exper. и клин. медицины, т.85, №6, с.559-562 (1985). ⁵ Р.А.Захарян, А.С.Агабабян и др., Тр. Ереванского зоовет.ин-та, вып. 59 (1986). ⁶ S.S.Pasasad, J.J.Shethna, BBRC, v.62, №3, p.517-523 (1975). ⁷ S.S.Pasasad, J.J.Shethna, BBA, v.363, №4, p.558-566 (1974). ⁸ E.S.Sharpe, F.W.Nickorson, J.N.Aronson Appl. Microbiol., v.30, p.1052-1053 (1975). ⁹ A.V.Itkes, K.T.Turpaev, O.V.Kartacheva, Biochem. Int., v.5, №1, p.15-21 (1982). ¹⁰ B.H. Knowles, H.E. Thomas, D.Y.Ellar, FEBS Lets., v.168, №2, p.191-202 (1984).