



УДК 577.112.088.3

ВЫДЕЛЕНИЕ ЦЕРЕОЛИЗИНА ТИОЛДИСУЛЬФИДНОЙ
ОБМЕННОЙ ХРОМАТОГРАФИЕЙ И ЕГО ХАРАКТЕРИСТИКА*Бицаев А. Р., Езепчук Ю. В., Сковрцов В. Т.,
Красильников О. В.***Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи
Академии медицинских наук СССР, Москва;*** Институт биохимии Академии наук УзССР, Ташкент*

Предложен двухэтапный метод выделения и очистки цереолизина, включающий тиолдисульфидно-обменную хроматографию и хроматографию на DEAE-целлюлозе. Молекулярная масса очищенного белка составляет $68 \pm 1,5$ кДа. Установлена более высокая эффективность цереолизина при интраназальном его введении по сравнению с внутривенным введением (опыты на белых беспородных мышах). Показана способность цереолизина образовывать ионпроницающие каналы в бислоиных липидных мембранах, сформированных из окисленного холестерина. Каналоформерные свойства данного белка рассматриваются как основа его цитолитического действия.

Цереолизин, продуцируемый *B. cereus*, относится к группе тиолзависимых цитотоксинов. Общими чертами, характерными для всех представителей данной группы токсинов, секретируемых грамположительными бактериями семейств *Bacillaceae*, *Streptococcaceae*, *Lactobacillaceae*, являются: 1) их белковая природа; 2) активация под действием тиолвосстанавливающих реагентов; 3) способность нарушать мембранную проницаемость эукариотических клеток, содержащих холестерин в плазматических мембранах; 4) способность вызывать кардиотоксический и летальный эффект при введении *in vivo*; 5) свойство давать перекрестную нейтрализацию с гипериммунными лошадиными антисыворотками. Несмотря на высокую биологическую активность тиолзависимых токсических белков, их конкретный вклад в патогенез инфекций, вызванных бактериями, которые их продуцируют, до сих пор мало изучен [1]. Одна из причин заключается в трудности выделения активных препаратов этих токсинов. Наличие сульфгидрильных групп в молекулах данных белков — необходимое условие для проявления ими биологической активности, однако часто процесс очистки сопровождается окислением тиольных групп с образованием дисульфидных связей, их взаимодействием с ионами тяжелых металлов либо другими модификациями, приводящими к инактивации токсинов. Все это обосновывает необходимость разработки таких методов выделения тиолзависимых токсинов, которые бы обеспечивали получение высокоочищенных препаратов с сохранением у них биологической активности. Наиболее обладающими в этом отношении являются методы аффинной хроматографии, в частности метод, основанный на тиолдисульфидном обмене, успешно примененный для извлечения и очистки альвеолизина [2]. В настоящем исследовании мы использовали принципы тиолдисульфидного обмена для выделения цереолизина, что позволило создать простую и воспроизводимую схему очистки этого белка.

В качестве исходного материала применяли культуральную жидкость, в которой титр гемолитической активности составлял в среднем 127 ГЕ*/мл. Данный уровень активности наблюдается после 5–6 ч культивирования (рис. 1). При этом гемолитическая активность коррелирует с летальной, максимум которой также приходится на указанное время.

* ГЕ — единица гемолитической активности (см. «Экспер. часть»).

Характеристика этапов очистки цереолизина

Этап очистки	Объем, мл	Общий белок, мг	Гемолитическая акт. $\cdot 10^{-4}$, ГЕ*	Уд. акт. $\cdot 10^{-4}$, ГЕ/мг	Коэффициент активации**
1. Культуральный супернатант	4000	520	50,8	0,098	1,0
2. Концентрирование в присутствии гексаметафосфата натрия, рН 4,0	100	40,4	10,2	0,25	2,0–3,0
3. Аффинная хроматография	60	2,4	9,0	3,75	2,0–2,5
4. Хроматография на DEAE-целлюлозе	15	1,1	12,0	10,9	1,0

* Тест в отсутствие дитиотреита (см. «Экспер. часть»).

** Отношение гемолитической активности, тестируемой в присутствии дитиотреита, к гемолитической активности, тестируемой без добавления восстанавливающего реагента (указаны средние значения пяти экспериментов).

Этап концентрирования культуральной жидкости в присутствии гексаметафосфата натрия при низких значениях рН (3,5–4,0) позволил освободиться от значительного количества балластных белковых компонентов (таблица). Выход по гемолитической активности при этом был неполным, даже в случае тестирования ее в присутствии дитиотреита, который, как известно, активирует цереолизин [3]. Однако возможно, что на данном этапе очистки величина гемолитической активности не отражает истинного количества цереолизина из-за присутствия в материале различных фосфолипаз. Экранирующее действие фосфолипаз на эритроциты (в условиях концентрированного материала) можно объяснить гидролизом в их присутствии мембранных фосфолипидов, которые, как было показано, необходимы для адекватной ориентации холестерина в качестве сайта связывания тиолзависимого токсина [4, 5].

Для отмывки аффинного сорбента от неспецифически связавшегося белка мы использовали растворы с различными значениями рН и ионной силы, включая растворы 6 М мочевины. Однако, как показали данные электрофореза, во всех случаях состав элюированных фракций был приблизительно одинаковым. Кроме зоны цереолизина, как правило, наблюдалась еще одна менее выраженная полоса и ряд минорных компонентов (см. ниже — рис. 4а, полоса 2), что свидетельствует о ковалентном присоединении к данному аффинному носителю за счет тиолдисульфидного обмена не только цереолизина, но и других белков или продуктов их протеолитического расщепления, несущих SH-группы. Этап элюции материала с аффинного сорбента отражен на рис. 2. Аномально высокая величина поглощения при 280 нм фракций 6–10, по-видимому, обусловлена присутствием в них образовавшегося в процессе тиолдисульфидного обмена 5-сульфидо-2-нитро-бензоата. Активные фракции объединяли и подвергали дальнейшей очистке на DEAE-целлюлозе (рис. 3).

Результаты всех этапов очистки цереолизина представлены в таблице. Удельная активность конечного продукта составляла в среднем $1 \cdot 10^6$, а не $4 \cdot 10^6$ ГЕ/мл [3]. Причиной этому может быть, с одной стороны, меньшая чувствительность применяемой нами тест-системы, с другой — использование в нашей работе консервированной крови для определения гемолитической активности. Выход по гемолитической активности составлял в среднем 20–25%, и, как правило, с 4 л культурального материала получали 1–1,5 мг чистого цереолизина. Эти данные свидетельствуют о преимуществе использованной схемы очистки по сравнению с предложенной ранее, где выход составлял 5–7% [3]. По данным диск-электрофореза в ПААГ, молекулярная масса цереолизина равна $(68 \pm 1,5) \cdot 1000$ (рис. 4).

При внутривенном введении цереолизина в дозе 2 мкг белым беспородным мышам отмечалась гибель животных. В случае интраназального

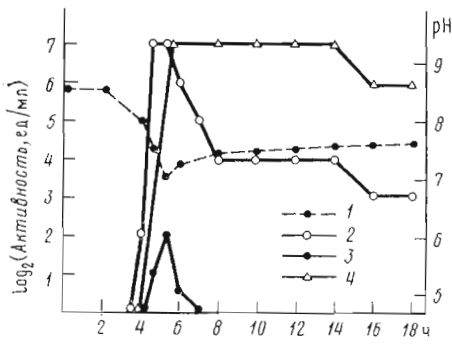


Рис. 1

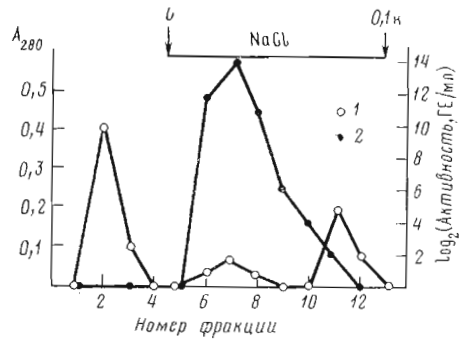


Рис. 3

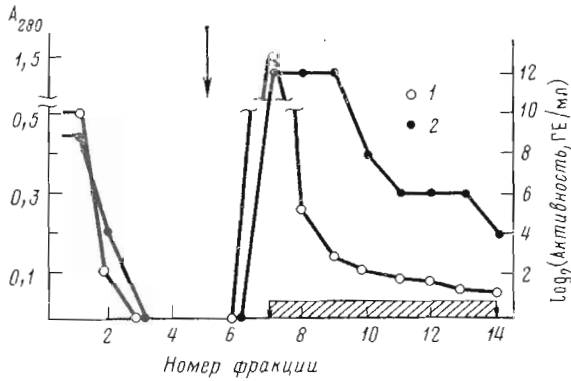


Рис. 2

Рис. 1. Изменения pH (1), гемолитической (2), летальной (3) и фосфолипазной (4) активностей в процессе роста культуры *B. cereus*

Рис. 2. Элюция цереолизина с аффинного сорбента в ходе тиолдисульфидной обменной хроматографии. 1 — поглощение при 280 нм; 2 — гемолитическая активность. Стрелкой указан момент введения 0,025 М цистеина в буферный раствор. Объем фракций 10 мл. Прямоугольником на оси абсцисс обозначены объединенные активные фракции

Рис. 3. Хроматография активных фракций цереолизина (рис. 2) на DEAE-целлюлозе: 1 — поглощение при 280 нм; 2 — гемолитическая активность. Прямой линией обозначен линейный градиент концентраций NaCl в буферном растворе. Объем фракции 5 мл

введения минимальная летальная доза составляла 0,5–0,8 мкг белка. При вскрытии погибших животных в легких наблюдались в основном отчетливые проявления. Большую чувствительность мышей к токсину при интраназальном способе его введения можно, по-видимому, объяснить несколькими причинами: 1) предполагив, что предварительная обработка животных эфиром каким-то образом снижает порог их чувствительности к цереолизину; 2) учитывая кардиотоксичность тиолзависимых токсинов [6], можно допустить, что проникновение цереолизина через легкие в кровяное русло создает более высокие концентрации этого белка в сердечной мышце, чем в случае введения в хвостовую вену; 3) возможно, что цереолизин, как это было предположено в работе [7], обладает повышенным сродством к легочной ткани. Высокая эффективность интраназального способа введения при тестировании летальной активности на мышь о важной роли цереолизина как патогенетического фактора при вызванных инфицированием *B. cereus* пневмониях, которые, как правило, заканчиваются смертельным исходом [8, 9].

Механизм цитолитического действия тиолзависимых токсинов до сих пор остается неизвестным. В этом направлении нами были предприняты

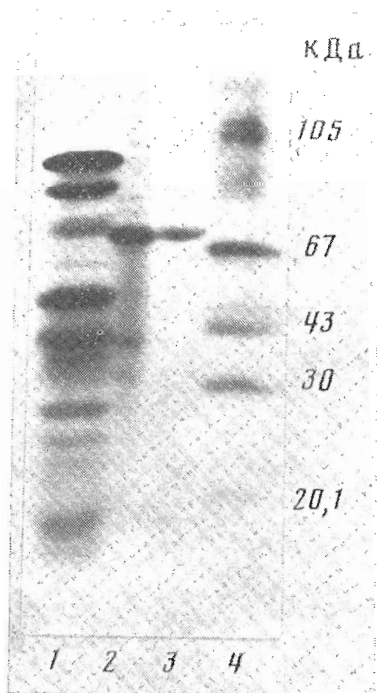


Рис. 4

Рис. 4. SDS-электрофорез в пластине 10% полиакриламидного геля: 1 — после концентрирования в присутствии гексаметафосфата натрия, pH 3,5–4,0; 2 — элюции с аффинного сорбента; 3 — элюции с DEAE-целлюлозы (4–5 мкг цереолизина); 4 — белки-стандарты (см. «Экспер. часть»)

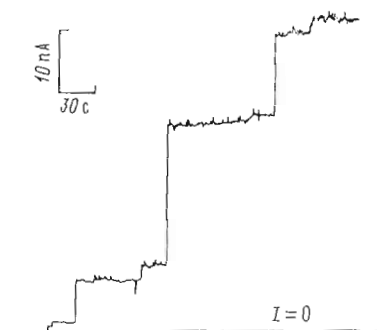


Рис. 5

Рис. 5. Ионная проводимость, индуцированная цереолизином в липидном бислое. БЛМ сформирована из окисленного холестерина. Напряжение фиксации +50 мВ с «цис»-стороны бислоя, к которой был добавлен препарат цереолизина. Среда — 10 мМ трис-цитратный буфер (pH 7,5), содержащий 150 мМ NaCl, 1 мМ EDTA

исследования по изучению действия гомогенных препаратов цереолизина на искусственные бислоиные липидные мембраны (БЛМ). Мы показали, что цереолизин увеличивает проводимость БЛМ, сформированных из окисленного холестерина. При этом ток через мембрану нарастал не монотонно, а отдельными ступенями (рис. 5), т. е. цереолизин обладает способностью образовывать ионпроводящие каналы в БЛМ подобно дифтерийному и α -стафилококковому токсинам [10, 11]. Поскольку цереолизин легко образует каналы в мембранах, сформированных из окисленного холестерина, хуже — в БЛМ из общих липидов мозга быка (30% холестерина) и практически не эффективен на БЛМ из яичного лецитина [12], можно заключить, что вероятность формирования канала зависит от содержания в БЛМ холестерина. Следовательно, холестерин действительно является тем мембранным компонентом, который необходим для формирования цереолизином ионного канала. Аналогичная зависимость каналообразующей способности препаратов от содержания в БЛМ холестерина в настоящее время известна лишь для полиеновых антибиотиков и тритерпеновых гликозидов [13, 14].

Таким образом, цереолизин является первым холестеринзависимым каналоформером белковой природы. Полученные данные согласуются с электронно-микроскопическими наблюдениями, согласно которым тиолзависимые цитолизины, в том числе и цереолизин [15], образуют на холестеринсодержащих бислоях или биологических мембранах кольцевые и аркообразные структуры. Однако, по данным Коуэла с соавт. [15], эти структуры расположены на наружной поверхности плазматической мембраны и не отмечаются на внутренней ее части и, следовательно, образова-

ния отверстия в мембране под действием цереолизина не происходит. В противоположность этому заключению наши исследования показали, что под действием токсина моменту полной дезинтеграции липидной мембраны предшествует стадия образования трансмембранных отверстий — каналов ионной проводимости.

Итак, полученные данные позволяют предположить, что гемолитическое действие холестеринзависимого цереолизина *B. cereus* непосредственно связано с его способностью образовывать в обогащенных холестерином мембранах каналы ионной проводимости.

Экспериментальная часть

Использовали штамм 96 *B. cereus*, выращивание которого производили на питательной среде следующего состава (г/л): Bactopepton (Difco) — 15; KH_2PO_4 — 0,68; K_2HPO_4 — 1,14; CaCl_2 — 0,022; MgSO_4 — 0,0098; MnSO_4 — 0,0012; NaHCO_3 — 9,0; глюкоза — 5,0. В колбы объемом 5 л помещали 1 л среды и засеивали суточной культурой клеток, находящихся в вегетативной форме ($1 \cdot 10^9$ клеток/л). Культивирование проводили на шуттель-аппарате в режиме 110 об/мин при 37°C в течение 5–6 ч. После этого микробные клетки отделяли центрифугированием при $8000g$ в течение 30 мин, а в супернатант вносили гексаметафосфат натрия в количестве 2,5 г/л. После растворения гексаметафосфата натрия рН доводили до значений 3,5–4,0 раствором 5 М HCl . Через 1,5–2 ч образовавшийся осадок отделяли центрифугированием при $12\,000g$ (40 мин). Осадок растворяли в 0,05 М трис- HCl -буфере (рН 8,0), содержащем 0,2 М NaCl , 1 мМ EDTA , в объеме, соответствующем концентрированию исходного супернатанта в 40–50 раз, и повторно центрифугировали для удаления остаточного осадка.

Аффинный сорбент, содержащий смешанный дисульфид, синтезировали по методике, описанной ранее [16]. В качестве матрицы использовали окисленные метапериодатом натрия пористые целлюлозные шарики [17].

Для проведения тиолдисульфидной обменной хроматографии к сорбенту, помещенному в стакан, добавляли раствор, полученный после очистки в присутствии гексаметафосфата натрия, и инкубировали 14 ч при перемешивании при 4°C . Соотношение белок (мг) — сорбент (мл) составляло 4 : 1. После инкубации всю смесь наносили на колонку (2,5×3 см) и проводили отмывку последовательно двумя растворами: 0,2 М NaCl , 1 мМ EDTA в 0,1 М трис- HCl -буфере (рН 8,0) и 1 мМ EDTA в 0,05 М трис- HCl -буфере (рН 8,0). Объем растворов, взятых для промывки, в 20–30 раз превышал объем сорбента. Элюцию осуществляли в колонке 0,05 М трис- HCl -буфером (рН 8,0), содержащим 1 мМ EDTA и 0,025 М солянокислый цистеин, со скоростью 25 мл/ч при 4°C . Активные фракции объединяли и концентрировали ультрафильтрацией в ячейке РМ-10 (Amicon) до объема 2–4 мл. В испытуемый материал добавляли дитиотреит до 0,01 М, инкубировали 10 мин, после чего наносили на колонку (1×2 см) с DEAE-целлюлозой, уравновешенной 0,05 М трис- HCl -буфером (рН 8,0). Для элюции токсина использовали линейный градиент концентраций NaCl .

Гемолитическую активность определяли по ранее описанному методу [18], за исключением того, что концентрация эритроцитов в суспензии составляла 1%. Количество гемолитических единиц (ГЕ), содержащихся в 1 мл, приравнивалось к максимальному 2-кратному разведению, при котором наблюдался полный гемолиз взвеси эритроцитов. Гемолитическую активность в присутствии дитиотреита [3] оценивали таким же способом. Для получения эритроцитов использовали свежую донорскую кровь, которую хранили при 4°C не более 10 сут.

Фосфолипазную (лецитиназную) активность измеряли по методу [19].

Летальную активность на белых беспородных мышах определяли двумя способами: 1) раствор, содержащий активный материал, в объеме, не превышающем 0,5 мл, вводили в хвостовую вену. Разведение с 2-кратным интервалом позволяло установить количество летальных единиц в испы-

туемом образце. Время наблюдения за животными составляло 40 мин с момента введения препарата; 2) материал в объеме 25–30 мкл вводили интраперитонеально по описанному ранее методу [20]. Эффект регистрировали в течение 3 ч наблюдения с момента введения материала.

Окисление холестерина проводили по методу [21]. Формирование бислоевых липидных мембран (БЛМ) и измерение их электрических характеристик осуществляли согласно методике [10]. Раствор, омывающий мембрану, содержал 1 мМ EDTA, 150 мМ NaCl в 5 или 10 мМ трис-HCl-буфере (рН 7,5) либо 150 мМ NaCl в 10 мМ трис-цитратном буфере (при более низких значениях рН). Белок определяли по методу Брэдфорда [22], его молекулярную массу — электрофорезом в ПААГ по методу [23] с использованием белков стандартов: Fab Ig (105 000), сывороточный альбумин быка (67 000), овалбумин (43 000), карбоангидраза (30 000), соевый ингибитор трипсина (20 100).

ЛИТЕРАТУРА

1. Smyth C. J., Duncan J. L. In: Bacterial toxins and cell membranes/Eds Jeljaszewicz J., Wadstrom T. N. Y.: Acad. Press, 1978, p. 129–183.
2. Geoffroy C., Alouf J. E. J. Biol. Chem., 1983, v. 258, № 16, p. 9968–9972.
3. Cowell J. L., Grushoff-Kosyck P. S., Bernheimer A. W. Infect. Immun., 1976, v. 14, № 1, p. 144–154.
4. Delattre J., Badin J., Canal J., Girard M. L. C. r. Acad. Sci., 1975, Ser. D, v. 280, p. 1165–1168.
5. Hase J., Mitsui K., Shonaka E. Jap. J. exp. med., 1975, v. 45, № 6, p. 433–438.
6. Hardegree M. C., Palmer A. E., Duffin N. J. Infect. Dis., 1974, v. 123, № 1, p. 51–60.
7. Bernheimer A. W., Grushoff P. J. Gen. Microbiol., 1967, v. 46, № 1, p. 143–150.
8. Coonrod J. D., Leadley P. J., Eickhoff T. C. Amer. Rev. Respir. Dis., 1971, v. 103, № 5, p. 711–714.
9. Ihde D. C., Armstrong D. Amer. J. Med., 1973, v. 55, № 6, p. 839–845.
10. Красильников О. В., Терновский В. И., Ташмухамедов Б. А. Биофизика, 1981, т. 26, № 2, с. 271–275.
11. Donovan J. J., Simon M. I., Draper R. K., Montal M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, № 1, p. 172–176.
12. Красильников О. В., Усманова А. М., Сабилов Р. Э., Ташмухамедов Б. А., Езерчук Ю. В., Бицаев А. Р. Биол. мембраны, 1985, т. 2, № 3, с. 302–309.
13. Антонов В. Ф. Липиды и ионная проницаемость мембран. М.: Наука, 1982, с. 151.
14. Ермишкин Л. Н., Зильберштейн А. Я. В кн.: Биофизика мембран. Итоги науки и техники. М.: ВИНТИ, 1982, т. 2, с. 82–160.
15. Cowell J. L., Kim K. S., Bernheimer A. W. Biochim. et biophys. acta, 1978, v. 507, № 2, p. 230–241.
16. Скворцов В. Т., Гурвич А. Е. Бюл. эксперим. биологии и медицины, 1984, № 2, с. 179–180.
17. Гурвич А. Е., Лехтцинд Е. В. Бюл. эксперим. биологии и медицины, 1981, № 12, с. 752.
18. Coolbaugh J. C., Wende R. D., Williams R. P. Appl. Microb., 1972, v. 24, № 6, p. 997–998.
19. Macfarlane R. G., Oakley C. L., Anderson C. G. J. Path. Bact., 1941, v. 52, № 1, p. 99–103.
20. Езерчук Ю. В., Bondarenko V. M., Yakovleva E. A., Koryagina I. P. Zbl. Bakt. Hyg., 1. Abt. Orig. A, 1979, B. 244, S: 275–284.
21. Tien H. P., Carbone S., Dawidowicz E. A. Nature, 1966, v. 212, № 5063, p. 718–719.
22. Bradford M. Anal. Biochem., 1976, v. 72, № 1–2, p. 248–254.
23. Weber K., Osborn M. J. Biol. Chem., 1969, v. 244, № 16, p. 4406–4412.

Поступила в редакцию
5.II.1985

После доработки
10.VI.1985

SOME PROPERTIES OF CEREOLYSINE ISOLATED BY THIOLDISULPHIDE-
EXCHANGE CHROMATOGRAPHY

BITSAEV A. R., EZEPCHUK Y. V., SKVORTSOV V. T.,
KRASILNIKOV O. V.*

*N. F. Gamaleya Institute for Epidemiology and Microbiology, Academy of Medical
Sciences of the USSR, Moscow;*

** Institute of Biochemistry Academy of Sciences of the UzbekSSR, Tashkent*

A two-step method of isolation and purification of cereolysine is proposed, consisting of the thioldisulphide-exchange chromatography and chromatography on DEAE-cellulose. A homogeneous preparation of the purified protein with molar mass of $68 \pm 1,5$ KD is obtained. White mice developed a higher sensitivity to cereolysine injected intranasally, as compared with its intravenous injection. Cereolysine is shown capable of producing ion-conducting channels in bilayer lipide membranes composed of oxydized cholesterine. These channel-forming properties of the protein are considered as the base of its cytolytic action.