

ЗАКОНОМІРНОСТІ УТВОРЕННЯ І ФУНКЦІОНУВАННЯ ІОНПРОВІДНИХ КАНАЛІВ ЦИТОЛІТИЧНИХ ПРОТЕЇНІВ ПРИ РЕКОНСТРУКЦІЇ У ШТУЧНИХ ЛІПІДНИХ БІШАРАХ

О. Я. ШАТУРСЬКИЙ

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ

E-mail: olegshatursky@biochem.kiev.ua

Особливу роль за патологій, які виникають унаслідок утворення цитолітичними протеїновими токсинами іонних каналів у плазматичній мембрані уражених клітин, відіграє пасивне транспортування каналами токсинів неорганічних іонів та органічних сполук, які беруть участь в обміні речовин або є важливими складовими клітини. Тому дослідження процесу утворення і функціонування іонних каналів цитолітичними токсинами є важливим для визначення будови каналного олігомера в плазматичній мембрані клітини-мішені та механізмів лізису клітини.

Цитолітична дія розглянутих у роботі протеїнових токсинів реалізується шляхом збільшення безпосереднього транспортування неорганічних іонів через нативні мембрани уражених клітин і вивільнення їхніх внутрішніх складових (протеїнів, органічних кислот тощо). Це пов'язано з утворенням токсинами іонпровідних олігомерів — каналів у ліпідному бішарі плазматичної мембрани. Реконструкція іонних каналів цитолітичних протеїнів у штучних бішарових ліпідних мембранах і ліпосомах дає можливість досліджувати їх утворення і функціонування, що важливо для визначення структури іонпровідного олігомера і механізму його токсичної дії для лікування токсичних уражень шляхом блокування струму іонів через канали токсинів. Основну увагу в огляді приділено обговоренню закономірностей утворення і властивостей нещодавно реконструйованих іонпровідних олігомерів нейро- і дерматоксичного β -токсину бактерії *Clostridium perfringens* та гемолітичних θ -токсину бактерії *Clostridium perfringens* і RTX-токсину актинії *Radianthus macrodactylus*.

Ключові слова: бішарова ліпідна мембрана, іонні канали, β - і θ -токсин *Clostridium perfringens*, токсин RTX *Radianthus macrodactylus*.

Основну увагу в цьому огляді приділено визначенню структури і властивостей іонпровідних олігомерів цитолітичних β - і θ -токсинів *Clostridium perfringens* та RTX-токсину актинії *Radianthus macrodactylus* [1] методом їх реконструкції у штучних ліпідних бішарах плоских бімолекулярних мембран (БЛМ) або ліпосом. Оскільки предметом досліджень є іонпровідні канали, які утворюються за олігомеризації непровідних мономерів цитотоксичних протеїнів у ліпідному бішарі, зазначений метод можна вважати типовим прикладом нанотехнології [2], призначеної для використання у фундаментальних біологічних дослідженнях класичної та медичної біохімії або біофізики.

Враховуючи те, що β -токсин бактерії *Clostridium perfringens* реалізує свій токсичний ефект, впливаючи на епітеліальні тканини та нервову систему хребетних, що призводить до появи некрозів [3, 4], підвищення кров'яного тиску, зниження ритму серцебиття, спастичних судом та раптової смерті жертви [5], а θ -токсин бактерії *Clostridium perfringens* є основним вірулентним чинником, який спричиняє гангрену [6], вибір зазначених об'єктів досліджень також видається досить актуальним для прикладного розділу біомедичних наук.

В останні 10-річчя для реконструкції дедалі ширше застосовують рекомбінантні форми цитолітичних токсинів, тому можна

вважати, що науковці, зокрема біохіміки, біофізики та молекулярні біологи, мають справу не лише з процесами, які відбуваються в просторових ділянках нанометрових розмірів, але й шляхом генетичного мутагенезу маніпулюють окремими атомами і молекулами для побудови іонпровідних структур із наперед заданими властивостями. Серед таких властивостей слід зазначити утворення олігомерних протеїнових структур з різними іонпровідними характеристиками в штучних ліпідних шарах завтовшки в дві молекули, що певною мірою відтворює реальні процеси в плазматичних мембранах уражених токсинами клітин.

Незважаючи на те, що технологію реконструкції іонних каналів у ліпідних бішарах було в основному впроваджено й модифіковано в 60–80-х роках ХХ ст., сучасні науковці дедалі частіше здійснюють дослідження каналів, які утворені окремими протеїнами в ході складних ліпідно-протеїнових взаємодій, адже ще й дотепер не з'ясовано низку ключових питань стосовно будови і функціонування окремих каналів. До них можна віднести питання про конформаційну перебудову розчиненого у водному середовищі протеїну в разі проникнення в ліпідний бішар мембрани та формування іонного каналу, структуру водної порожнини каналів, вплив різних природних і штучних чинників на утворення каналів та їхні іонпровідні властивості тощо. Окрім цього, використання БЛМ або ліпосом для реконструкції очищених каналоформерів дає змогу створювати особливі умови проведення наноекспериментів з окремим типом каналів, які не завжди є можливими під час роботи з біологічними мембранами, а саме: симетричність ліпідного складу і водно-сольового оточення по обидва боки ліпідного бішару, заданий склад мембрани, постійний мембранний потенціал, відсутність інших інтегральних протеїнів мембран тощо, чим досягається зменшення кількості неврахованих чинників впливу на об'єкти дослідження й індуковану ними провідність мембрани. Значення іонних каналів для біохімічних процесів, залежних від пасивного транспортування речовин *in vivo*, підтверджується порівняльним аналізом властивостей каналів у штучних ліпідних бішарах з безпосереднім транспортуванням речовин та зв'язаними з ним процесами на різних рівнях структурної організації живих організмів.

Загальні властивості RTX-токсину актинії *Radianthus macrodactylus* та β - і θ -токсинів бактерії *Clostridium perfringens*

Токсин актинії RTX належить до високомолекулярних актинопоринів *Radianthus*, які виявляють цитолітичну активність. Показано, що мішенями для RTX та інших каналоформуєвальних цитотоксинів актинії є цитоплазматичні мембрани клітин еукаріотів [1]. Згідно з поділом на основі ліпідної специфічності та деяких фізико-хімічних властивостей RTX належить до групи цитолізинів актинії, які інгібуються сфінгомеліном (СМ). У даному разі гемолітична активність актинопоринів цієї групи інгібується преінкубацією з екзогенним СМ. RTX, подібно до інших актинопоринів із фракції отрути морської актинії з високою гемолітичною активністю є поліпептидом з молекулярною масою близько 20 кДа. Для амінокислотного складу RTX характерний високий вміст основних і гідрофобних амінокислот, тирозину, а також наявність чотирьох залишків триптофану, як і для більшості інших актинопоринів. Відсутність цистеїну в складі високомолекулярних *Radianthus*-цитолізинів вказує на їх належність до актинопоринів. Серед токсинів цієї групи тільки *Radianthus* RTX має N-кінцевий залишок аланіну, що зумовило наявність ще однієї назви (RTX-A) для цього токсину. Інші *Radianthus*-токсини з високою гемолітичною активністю, наприклад RTX-S або RTX-G, мали N-кінцеві залишки серину чи гліцину, відповідно [1]. Амінокислотні послідовності, визначені для вивчених *Radianthus*-актинопоринів, досить подібні. Ідентичність послідовностей RTX та іншого актинопорину RTX-S становить 89%, а з урахуванням консервативних замінів — 95%. Такий самий високий ступінь гомології було виявлено між послідовностями актинопоринів актинії *Radianthus macrodactylus*, *Hetaractis magnifica* і *Stichodactyla helianthus*, що можна пояснити належністю їх до однієї родини *Stichodactylidae*. Результати порівняльного аналізу стрічкових діаграм просторових структур різних актинопоринів також свідчать про високий ступінь їх подібності.

Показано, що молекула RTX складається з жорстко сформованого β -кору, утвореного за допомогою 12 антипаралельних ланцюжків β -складчастостей і двох коротких α -спіралей, розташованих на протилежних боках β -кору. На петлі, яка з'єднує 6-й і 7-й β -ланцюжки на C-кінцевій спіралі, розташована

ділянка, збагачена залишками триптофану і тирозину, що входить до складу сайту зв'язування актинопорину з мембраною. Основні розбіжності у візуалізованих просторових структурах актинопоринів можна побачити в частково спіралізованих N-кінцевих фрагментах молекул. Унікальний механізм токсичної дії актинопоринів, спрямований на руйнування мембран клітин-мішеней через процес утворення каналів, зумовлений специфічною комбінацією структурних елементів актинопоринів — N-кінцевої мелітиноподібної амфифільної α -спіралі та складки β -сендвіча з ароматичним кластером [1].

Слід зазначити, що до сьогодні процес утворення каналного олігомера актинопоринів, включно з RTX, остаточно не встановлено і тому невідомо, які саме фрагменти мономера токсину беруть участь у процесі олігомеризації. Не існує також одностайності серед дослідників стосовно кількості мономерів RTX, які формують каналний олігомер. Згідно з найбільш прийнятними даними у формуванні актинопоринового каналу беруть участь щонайменше чотири окремих мономери протеїну [1, 7].

Токсична дія актинопоринів базується на їхній мембранолітичній активності, в основі якої лежить здатність RTX та інших цитолізинів *Radianthus* до специфічного зв'язування з ліпідним матриксом мембран, унаслідок чого формуються потенціалзалежні катіонселективні іонні канали. Показано, що швидкість утворення RTX-каналів у мембрані залежить від присутності в її ліпідному складі СМ. Навіть дуже високі концентрації RTX та інших актинопоринів не спричиняють помітного збільшення проникності мембран, що не мають у своєму складі СМ, тоді як введення лише 5% СМ до складу мембран значно підсилює спроможність RTX до утворення каналів, а відтак й іонну проникність мембран. Існує багато різних припущень щодо специфічності впливу СМ на швидкість утворення каналів RTX та каналів інших актинопоринів, серед яких можна окремо виділити два напрями: особливий вплив СМ на плинність ліпідного бішару та специфічне протеїно-ліпідне розпізнавання у разі взаємодії RTX з СМ.

Вихід K^+ із ліпосом, модифікованих RTX, залежить від рН середовища. Збільшення виходу K^+ із ліпосом при рН вище 4 може бути пов'язано з протонуванням негативно заряджених карбоксильних груп у порожнині каналів RTX та нейтралізацією позитивно заряджених залишків лізину й аргініну, які також експоновані всередину

сформованої даним каналом водної порожнини.

Зв'язування RTX та інших високомолекулярних актинопоринів з мембраною незворотне, на відміну від низькомолекулярних цитолізинів *Radianthus*, взаємодія яких з мембраною має зворотний характер, а каналформувальна активність виявляється за концентрацій, у 100 раз вищих за діючі концентрації RTX та інших високомолекулярних актинопоринів [1].

Отвори каналів, які формує RTX в ліпідному бішарі штучних мембран та мембран еритроцитів, мають діаметр від 0,6 нм до 1,0 нм [8]. Серед інших фізіологічно важливих іонів такі канали є проникними переважно для K^+ та Na^+ . Варто зазначити, що окрім ліпідно-протеїнових взаємодій, які призводять до утворення RTX-каналів у мембранах, фармакологічна дія RTX та інших актинопоринів *Radianthus* може бути зумовлена протеїн-протеїновими взаємодіями цих токсинів з компонентами біологічних мембран і цитоскелета клітин-мішеней [1]. Можливо, загальний механізм формування каналного олігомера RTX, а також його структура неістотно відрізняються від описаного раніше для родини каналформувальних цитолізинів, до яких належить β -токсин бактерії *Clostridium perfringens* [9, 10], що робить RTX зручною моделлю для досліджень утворення і функціонування каналів у мембрані.

Відомо, що β -токсин є основним летальним фактором у штамів типу С, який вражає більшість сільськогосподарських тварин на початкових стадіях їхнього розвитку, хоча дорослі тварини також можуть бути інфіковані. Вважають, що β -токсин вражає кишечник молодих тварин на стадіях розвитку, коли його мікрофлора ще остаточно не сформувалась [5]. Порівняльним аналізом первинних структур β -токсину з іншими токсинами показано, що амінокислотна послідовність β -токсину виявляє 28% гомологічності з такою α -токсину *Staphylococcus aureus* [11]. Беручи до уваги високу ідентичність первинних структур цих токсинів, деякі дослідники вважають, що їхні мономери та олігомери також подібні між собою [3, 12]. Молекулярна маса мономера β -токсину становить 35–38 кДа [3, 13]. Функціональний олігомер β -токсину, утворений у мембранах культури клітин HL 60 має молекулярну масу 228 кДа і складається переважно із семи субодиниць, хоча може також існувати у формі гексамера (191 кДа) в рафтах клітинних мембран [3].

За допомогою кристалографічного аналізу було показано, що олігомер α -токсину складається із чотирьох доменів [10] і в поперечному перетині нагадує за формою грибок. Перший домен утворює «капельшок» гриба, складений із семи β -сендвічів та N-термінального регіону. Другий домен міститься в «ніжці» гриба, яка утворює трансмембранний іонний канал. Третій домен формує так званий обідок, який звисає з «капельшка» гриба і частково проникає у верхній шар бішарового ліпідного матриксу мембрани з позаклітинного боку. Четвертий домен утворений трикутним регіоном, через який відбувається зв'язування протомерів, з яких сформовано каналний олігомер протеїну. Відповідно до розташування консервативних амінокислотних послідовностей, характерних для α - та β -токсинів, β -токсин також має домени, тотожні за структурою і функціями з тими, що їх було описано для α -токсину [3].

Подібно до токсинів родини холестеролзалежних цитолізінів (ХЗЦ), до яких належить θ -токсин бактерії *Clostridium perfringens*, β -токсин також має тільки один цистеїновий залишок у позиції 265 [14], хоча, на відміну від θ -токсину, заміна цього залишку не впливала на активність β -токсину [15]. Більш того, послідовність амінокислот первинної структури β -токсину в проміжку між позиціями 255–276, де міститься цистеїн-265, гомологічна консервативній послідовності амінокислот α -токсину між залишками в позиціях 245–267, яка бере участь у зв'язуванні окремих протомерів α - і β -токсинів у олігомерну структуру [3]. Показано, що тирозин-266 та лейцин-268, які належать цій ділянці, також беруть участь у зв'язуванні β -токсину з рецептором. Рецептором β -токсину виступає тахікінін НК₁ [16]. Зв'язування β -токсину із цим рецептором може спричинити появу дерманекрозу дорзальної шкіри тварин.

Вважають, що основну роль в реалізації токсичності β -токсину, який ще недостатньо досліджений, відіграє його олігомерна структура [3, 12]. Олігомери β -токсину можуть утворюватися на нативних і штучних мембранах. Формування олігомерів β -токсину на мембранах клітин ендотелію ініціює вивільнення арахідонової кислоти та інозитулу [12].

Беручи до уваги те, що дотепер ще дуже мало відомо про механізм формування олігомерів β -токсину та взаємозв'язок між їх утворенням і біологічною активністю, можна припустити, що використання модельних систем

зі штучними ліпідними мембранами для вивчення олігомеризації і можливого утворення каналів та порівняльний аналіз цих результатів з тими, які вже наявні в літературі, може дати важливу інформацію про зв'язок летальної активності токсину з утворенням каналних олігомерів у мембранах клітин.

Попри те, що β -токсин і θ -токсин продукуються й виділяються назовні однією й тією самою бактерією *Clostridium perfringens* і належать до токсинів, здатних утворювати іонні канали у мембранах клітин-мішеней, їхня структура та механізм токсичної дії відрізняються. θ -токсин бактерії *Clostridium perfringens* належить до родини холестеролзалежних цитолізінів, які продукуються багатьма іншими грампозитивними патогенними бактеріями. Первинна структура ХЗЦ виявляє близько 40–70% гомологічності, що свідчить про високий ступінь ідентичності членів цієї родини токсинів. Виділені бактеріями назовні, ХЗЦ легко розчиняються у водних розчинах, де існують переважно у формі мономерів. Мономери ХЗЦ здатні швидко утворювати великі гомоолігомерні асоціати в матриксі ліпідного бішару клітин-мішеней та штучних мембран. Токсини родини ХЗЦ є першорядним об'єктом структурних досліджень, тому що їх вже досить повно охарактеризовано за допомогою біохімічних та молекулярнобіологічних методів. Однією з найважливіших причин такої уваги є те, що ХЗЦ виділяють таксономічно різні види бактерій, які можуть спричинити смертельні захворювання. Дотепер охарактеризовано близько 20 представників родини ХЗЦ [17]. Найбільш дослідженими з них є лістеріолізін O, суттєвий вірулентний фактор *Listeria monocytogenes*, який спричинює менінгіт і може призвести до передчасного припинення вагітності, θ -токсин, вірулентний фактор *Clostridium perfringens*, що зумовлює газову гангрену, та пневмолізін, основний вірулентний фактор *Streptococcus pneumoniae*, який може викликати пневмонію і менінгіт. Кожен із мономерів токсинів складається з одного поліпептидного ланцюжка з молекулярною масою від 50 кДа до 80 кДа. Високий ступінь гомологічності їхніх первинних структур дає підстави припустити, що всі ці протеїни мають дуже подібні тривимірні структури. θ -токсин *Clostridium perfringens* є високомолекулярним поліпептидом з молекулярною масою 53 кДа, який складається з 500 амінокислотних залишків [17]. За геометричною будовою θ -токсин є незвичайно видовженою молекулою

у вигляді палички. Мономер θ -токсину у водному розчині збагачений β -складчастими структурами. У складі мономера θ -токсину також є дев'ять α -спіралей. Загалом, молекула цього токсину складається із чотирьох доменів. Перший домен містить α - та β -структури; другий домен має чотири β -структури; третій домен, подібно до першого, складається з α -спіралей та β -складчастостей; четвертий домен складений у компактний сандвіч, який має тільки ланцюжки β -структур.

Відомо, що холестерол є високоспецифічним рецептором для θ -токсину та інших ХЗЦ ($K_{\text{дис}} = 10^{-9}$ М), дію якого пов'язують з концентруванням мономерів токсину навколо збагачених на холестерол ділянок мембран клітин-мішеней, що полегшує процес взаємодії мономерів та утворення каналного олігомера [18]. Це припущення підтверджується тим, що ступінь зв'язування мономерів та кількість їх в олігомерній структурі залежать від концентрації холестеролу в мембрані. Незважаючи на те, що дотепер серед дослідників існують протилежні точки зору щодо локалізації в молекулі θ -токсину сайту, відповідального за зв'язування з холестеролом, є досить переконливі докази того, що холестерол зв'язується зі збагаченою на триптофан консервативною послідовністю амінокислотних залишків четвертого домену. У четвертому домені θ -токсину також міститься єдиний на всю молекулу консервативний залишок цистеїну в позиції 459, заміна або хімічна модифікація якого викликає інактивацію токсину. Згідно з результатами досліджень кристалічної структури мономера θ -токсину, цистеїн-459 розташований між одним із β -стрендів та збагаченою триптофаном петлею, що належить до четвертого домену. Заміна або хімічна модифікація цистеїну-459 руйнує укладку щільно упакованих β -структур, серед яких він міститься, що призводить до зміни конформації петлі, збагаченої триптофаном. Такі зміни ведуть до втрати здатності цієї петлі взаємодіяти з холестеролом. Таким чином, мономер θ -токсину втрачає можливість зв'язуватись із холестеролом, що не дозволяє мономерам токсину концентруватись у збагачених на холестерол ділянках мембран та формувати каналний олігомер. Той факт, що залишок цистеїну та збагачена на триптофан С-термінальна послідовність є консервативними, свідчить про те, що аналогічні зміни відбуваються з усіма представниками родини ХЗЦ. Процес олігомеризації θ -токсину передуює лізису

клітин-мішеней і є його необхідною передумовою. Багато олігомерів різних ХЗЦ продукують подібні арко- та кільцеподібні структури, які близькі за розміром і кількістю субодиниць [18]. За результатами електронно-мікроскопічних досліджень було запропоновано унітарну модель каналу, утвореного різними ХЗЦ. Згідно з нею зовнішній діаметр вбудованого в мембрану олігомера лежить у межах від 30,0 нм до 45,0 нм залежно від кількості мономерів у структурі, яка може налічувати 40–50 одиниць. Товщина стінки олігомера становить близько 6,5 нм. Олігомер має два домени. Один із них — це компактний внутрішній домен, у якому один мономер формує контакти з відповідними ділянками іншого, а другий — видовжений зовнішній домен зі значно меншою кількістю контактів між еквівалентними ділянками сусідніх мономерів. Внутрішній домен повторюється кожні 2,4 нм уздовж внутрішньої стінки каналу. У поперечному розтині олігомер θ -токсину має форму гриба заввишки 9,0–10,0 нм. Ніжка гриба, до якої належить четвертий домен з холестеролзв'язувальними структурами, пронизує ліпідний матрикс бішару і функціонально відповідає за процес лізису клітин. Перший домен кожного мономера утворює контакт з аналогічним доменом сусіднього мономера назовні мембрани та, разом з другим і четвертим доменами, розташовується у циліндричній ніжці гриба, а третій домен розміщений у капелюшку [19]. Показано, що 50 мономерів θ -токсину утворюють гомоолігомерну іонпровідну структуру з радіусом отвору 15,0 нм [17, 18]. Таким чином, утворення каналів з великим розміром отвору в плазматичній мембрані клітин-мішеней, найімовірніше, є основною причиною токсичної дії всіх ХЗЦ.

Слід зазначити, що існують альтернативні припущення, згідно з якими θ -токсин формує отвори значно меншого внутрішнього діаметра — такого, як діаметр каналів, утворених поліеновими антибіотиками амфотерицином В, ністатином і філіпіном, що становить близько 0,6–0,8 нм [19]. Беручи до уваги те, що на електронних мікрофотографіях олігомери θ -токсину та інших ХЗЦ окрім замкнутих кільцевих структур також формують незамкнені аркоподібні утворення, можна припустити, що порожнини каналів θ -токсину відрізняються від водних порожнин на зразок щільного β -барильця, внутрішня поверхня якого з усіх боків вистелена ланцюжками β -складок протеїну. Натомість, порожниною каналу

θ -токсину може бути вузька щілина між β -складками, що пронизують клітинну мембрану, та молекулами матриксу її ліпідного бішару.

Механізми токсичної дії актинопорину RTX та бактеріальних β - і θ -токсинів *Clostridium perfringens*

Для цитолітичних токсинів, до яких належать токсин актинії *Radianthus macrodactylus*, а також β - і θ -токсини бактерії *Clostridium perfringens*, цитотоксична функція здійснюється переважно через зв'язування токсину з плазматичною мембраною клітин-мішеней і наступним формуванням трансмембранного каналного олігомера. Лізис клітинної мембрани і смерть клітини відбуваються завдяки протіканню іонів, води й інших фізіологічно важливих речовин всередину і назовні клітини через водні порожнини каналних олігомерів, які утворились у мембрані.

Основними мішенями для RTX є цитоплазматичні мембрани клітин евкаріотів. Найбільш специфічне зв'язування з RTX відбувається за присутності СМ у ліпідному шарі зовнішньої мембрани клітин-мішеней [1]. Згідно із сучасними поглядами на роль СМ у процесі взаємодії RTX з ліпідним бішаром мембран уведення цього ліпиду до складу мембран, які містять холестерол (що характерно для евкаріотів), має призводити до щільнішого упакування ліпідів і формування ліпідних мікродоменів, рафтів, що сприяють розділенню фаз у мембрані. Існує припущення, що утворені при цьому дефекти ліпідного бішару мембрани полегшують контакт токсину з ліпідом, унаслідок чого концентрація поліпептиду, необхідна для формування каналного олігомера, може знижуватися. Окрім цього, за допомогою калориметричних досліджень було показано, що й СМ також здатен до специфічного неопосередкованого зв'язування з молекулою RTX. В експериментах з модифікації тіней еритроцитів людини і собаки шляхом оброблення з RTX показано, що крім ліпідів цей токсин ще зв'язується з протеїновими компонентами еритроцитарної мембрани [20]. Залежна від процесу денатурації певних мембранних протеїнів форма кривих, які було одержано на калориметрі від препаратів тіней еритроцитів собак і людини, змінювалась після оброблення цих препаратів цитолізином RTX. Одним з протеїнів, для якого було визначено денатурацію, є актин, струк-

турний протеїн еритроцитарного цитоскелета. Можливо, локальні деформації ліпідного бішару, які мають місце в процесі утворення каналів RTX у мембранах еритроцитів, призводять до змін в організації їхнього ліпідного матриксу, в результаті чого відбувається порушення зв'язку актину з мембраною. Не виключено, що вбудовування RTX в еритроцитарну мембрану прискорює трансмембранну міграцію амінофосфоліпідів із внутрішнього шару в зовнішній, що також призводить до порушення зв'язку актину з мембраною. Це порушення та поява локальних дефектів у матриксі ліпідного бішару мембран є факторами, які доповнюють деструкцію мембран евкаріотів, зумовлену утворенням водних порожнин актинопорину, що є основою його токсичної дії. Згідно з результатами, одержаними на штучних і нативних мембранах, канал RTX має діаметр близько 0,6–1,0 нм [1, 8]. Вольт-амперна характеристика одиничного каналу в асиметричних умовах, за яких вхідний струм утворювали іони калію, а вихідний — іони натрію, має лінійний характер, що свідчить про близьку для K^+ і Na^+ селективність RTX-каналу.

Таким чином, після зв'язування RTX з біологічною мембраною утворюються довгоживучі іонпровідні канали, що призводить до зникнення градієнта K^+ на мембрані. Наслідком цього процесу є те, що червона кров'яна клітина-мішень втрачає потенціал спокою і стає проникною для гемоглобіну, і це стає причиною деструкції плазматичної мембрани.

θ -токсин бактерій *Clostridium perfringens* є іншим цитолізином, який також вражає клітини евкаріотів. Подібно до актинопоринів основою токсичної дії θ -токсину є формування каналів у плазматичній мембрані клітин-мішеней [17]. Слід зазначити, що холестерол, який виступає однією з основних характерних складових мембран евкаріотів, у випадку θ -токсину відіграє багатофункціональну роль. Окрім того, що цей ліпід визнано високоспецифічним рецептором для θ -токсину і всіх інших представників родини ХЗЦ, він ініціює олігомеризацію та вбудовування каналного олігомера в мембрану, а також стабілізує структуру трансмембранного каналу, сформованого токсином. Відомо, що всі ХЗЦ, до яких належить θ -токсин, мають схожі механізми токсичної дії. Після взаємодії з холестеролом, що міститься в плазмалемі клітин-мішеней, відбувається олігомеризація мономерів токсину з наступним вбудовуванням сформованого

на мембрані каналного олігомера в товщу матриксу її ліпідного бішару, супроводжуваним утворенням трансмембранного іонпровідного каналу, що призводить до ушкодження мембрани. Первинне зв'язування мономерів токсину з мембраною відбувається в збагачених на холестерол ділянках, що ініціює процес зближення протомерів і їх взаємодію з утворенням олігомерної структури на поверхні мембрани. Причому ступінь взаємодії мономерів токсину та розмір утвореного ними олігомера залежить від концентрації холестеролу в ліпідному бішарі мембрани [18, 19]. Отвори каналів θ -токсину та інших ХЗЦ мають діаметри, які перевищують 15 нм, що дозволяє широко використовувати ці токсини як мембрано-пермеалізуючі агенти для потреб клітинної біології [17].

Слід зазначити, що дотепер не існує одностайності серед дослідників стосовно структури водної порожнини каналу θ -токсину та її розмірів. За даними електронної мікроскопії внутрішній діаметр кільцеподібних структур, утворених олігомером θ -токсину в мембранах ліпосом, які містять холестерол, становить близько 20 нм [19], що підтверджується високою іонною провідністю одиничних каналів θ -токсину в плоских бішарових мембранах аналогічного ліпідного складу [21]. Натомість, діаметр провідних структур, утворених θ -токсином у мембранах фібробластів людини, не перевищує той, що його було визначено для каналів полієнових антибіотиків, амфотерицину В та ністатину, — 0,6–0,8 нм, що приблизно дорівнює розміру молекули сахарози [19]. Беручи до уваги явну розбіжність провідностей θ -токсинових каналів, визначену на нативних мембранах фібробластів і плоских бішарових мембранах, а також наявність незамкнених аркоподібних олігомерів, які виявляються разом з кільцевими на електронних мікрофотографіях, можна припустити, що окрім великих водних порожнин, утворених цим токсином, існує й інший тип іонпровідних структур, у яких трансмембранний струм іонів проходить через щілини в матриксі ліпідного бішару на межі ліпідів і β -складчастостей трансмембранного домену θ -токсину.

Цитотоксичний механізм β -токсину, який також продукує бактерія *Clostridium perfringens*, дотепер остаточно не визначено. Більш того, незрозуміло, чи β -токсин взагалі діє як цитолізін для всіх типів біологічних мембран, які він може модифікувати. До 2003 р. існувала лише одна публікація,

в якій висловлювалось припущення про те, що вплив β -токсину на клітини 407 кишечника хребетних може бути результатом його цитолітичної дії [12]. Деякі дослідники вважають, що така дія β -токсину насправді є результатом незначних домішок у його препараті й не пов'язана із самим токсином [5]. Думка про те, що β -токсин, подібно до цитолізину, здатен до каналотворення, висловлювались на підставі досить слабкої 10% -ї ідентичності його первинної структури з такою, що була визначена для α - і γ -гемолізіну та лейкоцидину із *Stafilococcus aureus* [10, 11].

Нещодавно було показано, що β -токсин зумовлює вивільнення арахідонової кислоти та інозитолу із клітин ендотелію людини, що супроводжується утворенням різного розміру отворів трансмембранних каналів у плазматичній мембрані клітин-мішеней [12]. Беручи до уваги невизначеність більшості дослідників щодо цитолітичної активності β -токсину, а також те, що із впливом β -токсину пов'язують некроз певних тканин людей і хребетних тварин, у пізніших роботах було досліджено дію токсину на культуру клітин HL 60 [3]. Виявилось, що β -токсин спричинює набрякання і лізис цих клітин. Оброблення клітин β -токсином призводило до витоку K^+ назовні, натомість іони Ca^{2+} , Na^+ і Cl^- надходили всередину клітин. Зазначені події досягали свого максимального розвитку перед лізисом плазмалеми. За допомогою інкубації клітин HL 60 з β -токсином було доведено утворення двох типів олігомерів — гептамеру і гексамеру — в ділянках плазматичних мембран, які задовольняли критеріям рафтів. Блокування зв'язування β -токсину з мембранними рафтами з використанням метил- β -циклодекстрану або холестеролоксидази унеможливило появу вхідного струму K^+ , індукованого β -токсином, і наступне розбухання та лізис зовнішньої мембрани клітин HL 60. Таким чином, зв'язування β -токсину з рафтами клітинних мембран і вбудовування його каналного олігомеру в плазматичну мембрану є необхідними умовами цитолітичної дії. Високоспецифічна взаємодія β -токсину з нативною мембраною відбувається опосередковано через механізм, в якому задіяний тахікініновий рецептор НК₁ [16]. Зважаючи на те, що вхідний потік Ca^{2+} всередину клітин-мішеней повністю блокувався молекулами поліетиленгліколю 600 і 1 000, було зроблено висновок, що діаметр отвору каналу, утвореного β -токсином у мембрані клітин HL 60, становить близько

1,3 нм. Показано, що з двох типів олігомерів, які β -токсин утворює в рафтах цих клітин, тільки гептамер здатен формувати функціональний іонний канал у біологічній мембрані [3].

Дослідження іонних каналів природних або рекомбінантних цитолітичних токсинів та їхньої можливої ролі у лізисі уражених токсинами клітин за допомогою реконструкції в штучних ліпідних бішарах

Оскільки дія всіх розглянутих в цьому огляді цитотоксинів може бути опосередкованою через утворення іонних каналів у плазматичних мембранах клітин-мішеней, для перевірки цього припущення і визначення впливу низки фізіологічно важливих чинників на вбудовування та функціонування іонпровідних каналів зазначених токсинів у ліпідному бішарі мембрани досліджували їхню взаємодію зі штучними ліпідними бішарами БЛМ і ліпосом. З огляду на те, що утворення катіонних каналів у ліпідному бішарі плазматичної мембрани є одним з необхідних етапів, які передують лізису враженої токсинами клітини, особливий інтерес становлять дослідження іонселективних властивостей каналів, реконструйованих у плоску бімолекулярну ліпідну мембрану, — БЛМ. Дослідження іонпровідних властивостей модифікованих токсинами БЛМ є простим та інформативним методом визначення утворення і властивостей різних іонпровідних протеїнових олігомерів. Для дослідження взаємодії плоского ліпідного бішару з очищеними каналоформерами часто використовують електронейтральні БЛМ, сформовані з розчину фосфатидилхоліну в суміші з холестеролом у співвідношенні 2:1, відповідно. Суміш ліпідів розчиняють у неполярному розчиннику, наприклад в декані або *n*-гептані, а потім наносять на отвір діаметром 0,18–0,6 мм у тефлоновому або делриновому стаканчику, розміщеному в комірці зі скла чи плексигласу. Окрім зазначеного типу БЛМ дослідники також використовують так звану «суху» БЛМ, сформовану із двох ліпідних моношарів по різні боки отвору стаканчика [22]. Для запобігання ефекту поляризації у водно-солевих розчинах провідність мембрани вимірюють хлоросрібними електродами, які занурені у водний розчин 2 М KCl з агаровими містками, розміщеними з різних боків БЛМ. Потенціал зовні тефлонового або делринового

стаканчика (цис-сторона) зазвичай задається відносно потенціалу внутрішнього об'єму (транс-сторона), який приймають рівним віртуальному 0 мВ (рис.).

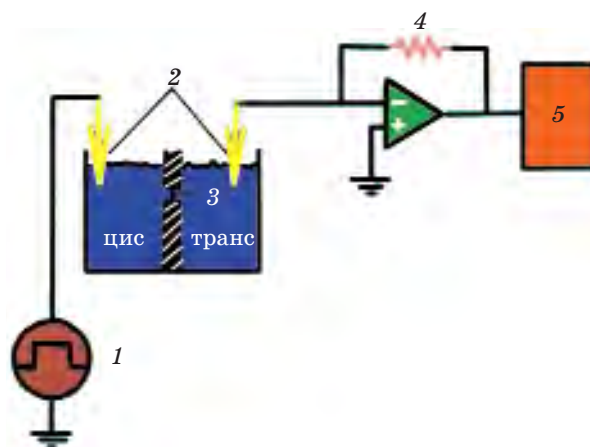


Рис. Схема експериментального приладу для визначення провідності плоских бішарових мембран, модифікованих каналоформувальними сполуками:

- 1 — джерело напруги;
- 2 — електроди;
- 3 — бішарова мембрана у водно-солевому розчині;
- 4 — прилад для електричних вимірів;
- 5 — самописець

Для досліджень будови зв'язаного з мембраною олігомера θ -токсину використовують також штучний бішар ліпосом, утворених обробленням ультразвуком або пропусканням суміші ліпідів через мембранні фільтри з певним розміром пор, що зумовлює уніфікований розмір отриманих на ньому ліпосом [18]. Враховуючи те, що в разі плоского бішару БЛМ або шароподібного замкнутого бішару ліпосом молекули цитолітичних протеїнів вбудовуються і потім функціонують у нанопросторі ліпідного бішару, можна вважати, що модифіковані олігомерами цитолітичних токсинів ліпосоми, як і БЛМ, є об'єктами порівняльних методів досліджень.

Хоча більшість досліджень гемолітичного RTX-токсину проводили на препаратах токсину, ізольованих із гомогенату тканин актинії *Radianthus macrodactylus* [1, 7], у випадках β - і θ -токсинів бактерії *Clostridium perfringens* досить часто дослідники послуговуються рекомбінантними формами цих протеїнів. Так, у роботах [23–25] рекомбінантні β - і θ -токсини бактерії *Clostridium perfringens* отримували експресією в електрокомпетентних клітинах бактерії *Escherichia coli*. Для цього у разі досліджень будови

зв'язаного з мембраною олігомеру θ -токсину ген його безцистеїнового похідного, в якому цистеїн-459 було замінено на аланін, клонували у вектор експресії pTrcHisA (Invitrogen, США) з використанням сайтів *Bam*HI та *Eco*RI. Похідні θ -токсину, у яких методом точкового мутагенезу досліджувану амінокислоту заміняли на цистеїн, мітили флуоресцентним барвником йодоацетамід-N,N'-диметил-N-(йодоацетил)-N'-(7-нітробенз-2-оксо-1,3-діазоліл)етилендіамін — NBD (Molecular probes, Eugene, США), який утворював ковалентні зв'язки з цистеїном. Якщо після вбудовування в бішар ліпосом замінена на цистеїн амінокислота міченого барвником мутанта θ -токсину містилась поза ліпідним оточенням, флуоресценція барвника знижувалась під дією молекул водно-сольового оточення мембрани. У протилежному разі, коли досліджувана амінокислота була в товщі бішару, флуоресценція, навпаки, збільшувалась. Таким чином, метод точкового мутагенезу давав змогу визначати структурні перетворення певних ділянок розчиненого у водному середовищі мономера рекомбінантного θ -токсину під час взаємодії з ліпідним бішаром мембрани ліпосом.

Ще одним прикладом поєднаного використання точкового мутагенезу і БЛМ було розглянуте в роботі дослідження іонпровідних властивостей рекомбінантного β -токсину бактерії *Clostridium perfringens*, для якого зменшення здатності до каналотворення після заміни залишку аргініну-212 на аспартат супроводжувалось значним збільшенням LD^{50} , визначеної на мишах. У цьому разі поєднання двох наукових методів дослідження допомогло дійти висновку про тісний зв'язок іонпровідної спроможності досліджуваного протеїну з його токсичністю [25].

Вбудовування іонних каналів цитолітичних токсинів у ліпідний бішар і фактори впливу на каналотворення

Окрім важливого значення для подальших досліджень будови і функцій каналу, факт реконструкції є також досить інформативним сам по собі. Так, уперше проведена реконструкція каналів RTX-токсину актинії *Radianthus macrodactylus* та β -токсину бактерії *Clostridium perfringens* у БЛМ довела здатність цих токсинів до утворення іонних каналів у ліпідному бішарі плазматичних мембран і дозволила припустити, що утворення каналів може бути причиною токсичної дії цих протеїнів [8, 25]. Це припущення

дістало подальше підтвердження у вже розглянутому вище випадку з реконструкцією рекомбінантного β -токсину в БЛМ, для якого заміна аргініну 212 на аспартат в гені β -токсину зумовила значне підвищення LD^{50} рекомбінантного токсину в мишей і майже позбавляла його здатності формувати канал [25]. Таким чином, хімічний склад β -токсину є важливим чинником впливу на його каналотворення і токсичну дію.

Збіг форми найбільшого піку провідностей гістограми одиничних каналів θ -токсину *Clostridium perfringens* з формою піку на денситометричній трасі розподілу його олігомерів, одержаних на SDS-агарозному гелі, дає підстави вважати, що іонпровідним є саме олігомер токсину, а не розчинені у воді мономери або невеликі олігомери на зразок димерів [18]. Причому, з огляду на те, що олігомер θ -токсину *Clostridium perfringens* збільшував провідність БЛМ стрибкоподібно, а не поступово, було зроблено висновок, що олігомеризація цього токсину на поверхні мембрани передуює вбудовуванню готового олігомеру через всю товщу бішару, яке супроводжується появою мембранного струму.

Виходячи з одержаних результатів можна стверджувати, що двовалентні катіони значно прискорюють підвищення трансмембранного струму переважно через збільшення швидкості вбудовування в БЛМ каналів, утворених RTX- та β -токсинами [8, 25]. Оскільки іонпровідні структури цих токсинів утворені олігомерами, можна припустити, що двовалентні катіони сприяють змінам структури непровідних мономерів, які полегшують процес утворення четвертинної структури в ліпідному бішарі мембрани. Також можливо, що двовалентні катіони здатні індукувати або підсилювати розділення фаз у ліпідному бішарі. При цьому зростає кількість динамічних дефектів, чим може полегшуватися вбудовування протеїну в мембрану. Враховуючи отримані на БЛМ дані, активуючим впливом двовалентних катіонів на утворення каналів можна пояснити сприяння вивільненню арахідонової кислоти з клітин HUVEC, яке відбувалось під впливом β -токсину в середовищі з Ca^{2+} [12], та активацію двовалентними катіонами гемолізу еритроцитів токсином RTX [25].

Ще одним чинником істотного впливу на швидкість утворення RTX-каналів є наявність сфінгомеліну (СМ) у ліпідному складі бішару. Оскільки відомо, що мембрани, які містять СМ, характеризуються вираженим

розділенням фаз, то вважають, що в основі дії двовалентних катіонів і СМ на вбудовування RTX у мембрану лежать подібні процеси [8].

Іншим фактором, який впливав як на швидкість вбудовування поодиноких каналів цитолітичних токсинів, так і на їхню провідність, був мембранний потенціал. β -Токсин значно інтенсивніше вбудовувався в мембрану за негативного потенціалу [25], що може свідчити про існування в трансмембранному домені цього протеїну негативно зарядженої іоногенної групи, яка стимулює процес залежного від потенціалу утворення каналів.

Ріст провідності БЛМ, індукованої утворенням каналів RTX, відбувається незалежно від знака потенціалу, хоча кількість каналів, вбудованих в БЛМ за одиницю часу, збільшувалась зі зниженням абсолютної величини потенціалу [8].

Молекулярний механізм вбудовування в бішарову мембрану і формування каналу для θ -токсину бактерії *Clostridium perfringens* досить детально було показано на ліпосомах [17]. Для безпосереднього визначення оточення, в якому міститься та чи інша амінокислота у зв'язаному з мембраною олігомері цього токсину, залишок досліджуваної амінокислоти було заміщено на цистеїн і ковалентно модифіковано, щоб з'єднати сульфгідрильну групу цистеїну з флуоресцентним барвником NBD [23]. Такий підхід вимагав безцистеїнового мутанта θ -токсину. Тому в таких роботах використовували рекомбінантний протеїн — безцистеїнове похідне, у якому єдиний природний цистеїн-459 замінено на аланін, що не спричинило змін у функціональному стані протеїну. NBD було вибрано як флуоресцентний зонд тому, що інтенсивність його емісії і тривалість життя суттєво зростає в переходом з водного оточення в гідрофобне середовище ліпідного бішару. Після порівняння інтенсивності флуоресценції зв'язаних з мембраною і мічених NBD мутантів θ -токсину і їхніх водорозчинних мономерів було виявлено палітру значень інтенсивності, які узгоджуються з розгортанням α -спіралі ділянки у проміжку між залишками 288 і 311 в амфіпатичну β -шпильку в матриксі ліпідного бішару мембрани холестеролвмісних ліпосом [24]. Отримані результати дають підстави вважати, що амінокислоти зазначеної ділянки утворюють у мембрані амфіпатичну β -складчастість, один бік якої повернутий у водне середовище порожнини каналу, а другий — у ліпідний бішар. Більш

того, ці результати збігалися з результатами аналогічних експериментів, проведених раніше з іншою ділянкою θ -токсину між серином-190 і аспарагіном-217 [23], що свідчить про участь обох цих ділянок у процесі утворення трансмембранних шпильок. Отже, мономер θ -токсину розгортає дві пари α -спіралей у дві пари β -складок при вбудовуванні в ліпідний бішар мембрани, на відміну від відомих дотепер каналоформувальних токсинів інших родин, у трансмембранному домені яких міститься лише одна пара амфіпатичних α -спіралей [26] або одна β -шпилька [27]. Оскільки основні властивості, характерні для амфіпатичної β -шпильки, є консервативними у всіх ХЗЦ зі встановленою первинною структурою, вірогідно, що наявність двох β -шпильок, що пронизують бішар мембрани, буде показано для усіх представників цієї родини токсинів.

Іонпровідні властивості цитотоксинових каналів і чинники, які на них впливають

Відомо, що механізм дії багатьох каналоформувальних токсинів залежить від іонпровідних властивостей каналів, утворених цими токсинами в плазматичній мембрані клітин-мішеней. Тому наступним етапом досліджень цитолітичних токсинів після вбудовування було визначення іонпровідних властивостей утворених в ліпідному бішарі каналів під дією різних факторів середовища і штучних чинників впливу. Для з'ясування ролі токсинів каналів у біохімічних процесах, які відбуваються на різних рівнях структурної організації враженого токсином організму, особливу увагу приділяли впливу змін хімічного складу токсинів, що досліджувалось за допомогою рекомбінантних форм токсинів на модифікованих токсинами біологічних і штучних мембранах та тваринах.

Дослідження залежності провідності каналів RTX-токсину від температури навколишнього водно-сольового середовища показали, що енергія активації провідності каналів RTX у БЛМ, оточеній розчином 100 мМ KCl, практично не залежала від співвідношення компонентів мембрани і були близькі до такої для провідності каналів α -латроінсектотоксину із отрути каракурта [28, 29]. Останній факт може свідчити про схожі розміри отворів каналів, утворених RTX та α -латроінсектотоксином в БЛМ, що дістало подальше підтвердження при визначенні

впливу коркових блокаторів метонієвого ряду та новітнього блокатора пасивного транспортування іонів — хлориду 3-децилоксикарбонілметил-4-метил-5-(β-гідроксіетил)гіазолію (ДМГТ) [28].

Безпосереднє транспортування іонів каналами RTX- та β-токсину залежало від мембранного потенціалу та іонного складу середовища навколо модифікованого токсинами БЛМ. Гемолітичний токсин актинії RTX утворював у мембрані катіонні канали, переважно селективні до K^+ та Na^+ , що може мати наслідком збільшення пасивного транспортування цих іонів через плазматичні мембрани еритроцитів у разі вбудовування RTX-каналів [8]. Деякі дослідники вважають, що вихід іонів калію з еритроцитів каналами RTX-токсину спричинює значне збільшення осмотичного тиску на плазматичну мембрану ураженої клітини, що призводить до її розриву і є основною причиною індукованого RTX гемолізу [1].

Безпосереднє транспортування іонів β-токсिनними каналами також є вибірковою тільки для одновалентних катіонів (Na^+ , K^+), що може спровокувати незворотну деполяризацію збудливої мембрани автономних і периферичних нервово-м'язових сполучень хребетних після утворення в них каналів β-токсину. Як і в разі з RTX-токсином, утворення β-токсिनних каналів у плазматичній мембрані клітин культури HL 60 також збільшувало трансмембранні потоки K^+ і Na^+ і призводило до набрякання та лізису клітини, що може бути причиною некротичного ентериту у свійських тварин [3].

Той факт, що на відміну від RTX та низки інших токсинів β-токсिनний канал можна було заблокувати лише іонами цинку [25], свідчить про певну відмінність структури катіонселективного сайту цього каналу від інших.

Окрім цього, причиною певних розбіжностей вибіркової до іонних блокаторів і провідності токсинних каналів у БЛМ можуть бути різні геометричні розміри їхніх водних порожнин. Тому важливу роль відігравали дослідження впливу різних молекул неелектролітів (поліетиленгліколі, сахароза тощо) на провідність каналів цитолітичних токсинів з метою визначення і порівняння розміру отворів іонпровідних олігомерів у мембрані.

Препарати β-токсину утворювали в БЛМ два основних піки провідності — при 110 і 60 пСм [25]. Було показано, що пасивне транспортування K^+ через пори β-токсинних каналів з провідністю 110 і 60 пСм най-

краще блокувалось молекулами поліетиленгліколів з приблизними гідродинамічними радіусами 1,27 і 1,11 нм [25] відповідно або, згідно з іншими джерелами, 1,3 і 1,6 нм [3]. Це свідчить про утворення двох типів каналних олігомерів (гепта- і гексамерів), характерних для цитолітичних токсинів на зразок α-гемолізину. Причому, лише більший за розміром гептамер з молекулярною масою 228 кДа вбудовується в ліпідний бішар клітин внутрішнього епітелію хребетних HL 60, тоді як менший за молекулярною масою і, ймовірно, розміром отвору каналу гексамер (191 кДа) не функціональний через те, що залишається в ліпідному рафті клітини [3]. Варто зазначити, що досить великі розміри отворів обох олігомерів β-токсину дозволяють відбуватись не лише деполяризації плазматичної мембрани вражених клітин завдяки безпосередньому транспортуванню іонів (K^+ , Na^+), але також і вивільненню з них вторинних посередників арахідонової кислоти та інозиту, що може впливати на зміну внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} і внаслідок цього на нервову передачу в автономній і периферійній нервових системах хребетних [5, 25]. Серед симптомів враження β-токсином нервової системи хребетних, що пов'язані з деполяризацією нервових тканин або дефіцитом інозиту, — раптові передсмертні скорочення м'язів у мишей, зміна артеріального тиску і ритму серцебиття. Окрім цього, нестача арахідонової кислоти та інозиту, що в зміненому вигляді входять до складу фосфоліпідів клітинної мембрани, порушує обмін ліпідів і може спричинити порушення цілісності епітеліальних клітин, викликаючи появу різних некрозів.

Радіус вхідного отвору каналу RTX було визначено шляхом аплікації блокаторів метонієвого ряду на індукований токсинним трансмембранний потік K^+ . Оскільки з усього ряду використаних алкіламоніїв тетрабутиламоній з радіусом молекули 0,55 нм був найефективнішим, можна вважати, що внутрішній радіус каналу RTX такий самий [8]. Паралельно проведене визначення розмірів отвору α-латроінсектотоксिनного каналу (0,53 нм) [28] підтвердило зроблене раніше припущення про те, що іони калію долають однаковий активаційний бар'єр у порожнинах каналів α-латроінсектотоксину і RTX через подібний розмір їхнього внутрішнього діаметра. З огляду на розмір молекули гемоглобіну ефективний радіус отвору каналу, здатного забезпечити вихід гемоглобіну з еритроцита через внутрішню порож-

нину каналу, має бути не меншим, ніж 3,35 нм [8], що набагато перевищує визначений розмір отвору каналу RTX. Дані про розмір отвору каналу RTX підтверджують гіпотезу про те, що спричинений RTX лізис еритроцитів, найімовірніше, пов'язаний з осмотичним шоком внаслідок виходу K^+ із враженої клітини [1] або руйнуванням плазматичної мембрани в результаті вбудовування багатьох каналів [8], що також порушує цитоскелет клітини [1].

Натомість, іонні канали ще одного гемолітичного протеїну — θ -токсину бактерії *Clostridium perfringens* утворювали в плоскій фосфоліпідній мембрані з холестеролом майже не вибірково одиничні канали дуже високої провідності — 4–6 нСм [18, 21], що свідчить про великий розмір їхніх отворів. Останнє припущення підтверджувалось даними електронної мікроскопії, згідно з якими радіус внутрішнього отвору кільцеподібної гомоолігомерної іонпровідної структури становить приблизно 15 нм [17, 18]. Той факт, що каналний олігомер θ -токсину складений з багатьох (50) мономерів, також свідчить про утворення цим токсином іонних каналів з великим розміром отвору, який згідно з даними [17, 18] у 5 разів більший за розмір молекули гемоглобіну. Імо-

вірно, значний розмір отвору θ -токсिनного каналу і є основною причиною його цитолітичної дії. Останнє припущення підтверджується тим, що цей протеїн може значно ефективніше за гемолітичні токсини з меншим розміром отворів каналу руйнувати еритроцити, спричинюючи порушення кровообігу, внаслідок чого швидше утворюються глибокі некротичні зміни уражених тканин, які можуть стати причиною хірургічного втручання [17].

Таким чином, реконструкція або відтворення процесів побудови і функціонування іонних каналів природного токсину RTX активності *Radianthus macrodactylus* та рекомбінантних, генетично змінених шляхом внесення точкових мутацій, β - і θ -токсинів бактерії *Clostridium perfringens* дала можливість визначити механізми утворення цими протеїнами каналів у ліпідному бішарі мембрани, їхню структуру та можливу роль у процесах, що зумовлюють лізис клітин або впливають на нервово-м'язову передачу. Окрім цього, реконструкція іонних каналів цитолітичних токсинів, є важливим етапом, що необхідний для створення засобів лікування токсичних уражень шляхом блокування струму іонів через канали токсинів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Монастырская М. М. Исследование структуры и мембранолитического действия пороформирующих токсинов актиний: Автореф. дис. докт. хим. наук.: 02. 00. 10 / Тихоокеанский ин-т биоорг. химии, Владивосток, 2006. — 51 с.
2. Хартманн У. Очарование нанотехнологии. — Бином: Лаборатория знаний, 2010. — 173 с.
3. Nagahata M., Hayashi S., Shinsuke M. et al. Biological activities and pore-formation of *Clostridium perfringens* beta toxin in HL 60 cells // J. Biol. Chem. — 2003. — V. 278, N 38. — P. 36934–36941.
4. Vidal J. E., McClane B. A., Saputo J. et al. Effects of *Clostridium perfringens* Beta-Toxin on the Rabbit Small Intestine and Colon // Infect. Immun. — 2008. — V. 76. — P. 4396–4404.
5. Tweten R. K. *Clostridium perfringens* beta toxin and *Clostridium septicum* alpha toxin: their mechanisms and possible role in pathogenesis // Veterinary Microbiology. — 2001. — V. 82. — P. 1–9.
6. Flanagan J. J., Tweten R. K., Johnson A. E., Heuck A. P. Cholesterol Exposure at the Membrane Surface Is Necessary and Sufficient to Trigger Perfringolysin O Binding // Biochemistry. — 2009. — V. 48, N 18. — P. 3977–3987.
7. Клышко Е. В., Ильина А. П., Лихацкая Г. Н. Актинопорины: структура и функция // Вестник ДВО РАН. — 2004. — № 3. — С. 45–53.
8. Чантурия А. Н., Шатурский О. Я., Лушко В. К. и др. Взаимодействие токсина морской актинии *Radianthus macrodactylus* с бислойнными фосфолипидными мембранами // Биол. мембраны. — 1990. — Т. 7. — С. 763–769.
9. Anderluh G., Macek P. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (*Anthozoa: Actiniaria*) // Toxicon. — 2002. — V. 40, N 2. — P. 111–124.
10. Gouaux E. alpha-Hemolysin from *Staphylococcus aureus*: an archetype of beta-barrel, channel-forming toxins // J. Struct. Biol. — 1998. — V. 121, N 2. — P. 110–122.
11. Hunter E. S., Brown J. E., Oyston P. C. F. et al. Molecular genetics analysis of beta-toxin

- of *Clostridium perfringens* reveals sequence homology with alpha-toxin, gamma-toxin, and leukocidin of *Staphylococcus aureus* // *Infect. Immun.* — 1993. — V. 61, N 9. — P. 3958–3965.
12. *Steinthorsdottir V., Halldorsson H., Andersson O. S.* *Clostridium perfringens* beta-toxin forms multimeric transmembrane pores in human endothelial cells // *Microb. Pathog.* — 2000. — V. 28. — P. 45–50.
 13. *Carvalho A. V. A., Heneine L. G. D., Assis R. A. et al.* Production and purification of beta-toxin from *Clostridium perfringens* type C // *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* — 2006. — V. 58, N 2. — P. 276–278.
 14. *Hunter E. S., Brown J. E., Oyston P. C. F. et al.* Molecular genetics analysis of beta-toxin of *Clostridium perfringens* reveals sequence homology with alpha-toxin, gamma-toxin, and leukocidin of *Staphylococcus aureus* // *Infect. Immun.* — 1993. — V. 61, N 9. — P. 3958–3965.
 15. *Steinthorsdottir V., Fridriksdottir V., Gunnarsson E. et al.* Site-directed mutagenesis of *Clostridium perfringens* beta-toxin — expression of wild type and mutant toxins in *Bacillus subtilis* // *FEMS Microbiol. Lett.* — 1998. — V. 158. — P. 17–23.
 16. *Nagahama M., Morimitsu S., Kihara A. et al.* Involvement of tachykinin receptors in *Clostridium perfringens* beta-toxin-induced plasma extravasation // *Br. J. Pharmacol.* — 2003. — V. 138. — P. 23–30.
 17. *Tweten R. K.* Cholesterol-dependent cytolysins, a family of a versatile pore — forming toxins // *Infect Immun.* — 2005. — V. 73, N 10. — P. 6199–6209.
 18. *Shepard L. A., Shatursky O., Johnson A. E. et al.* The mechanism of pore assembly for a cholesterol-dependent cytolysin: formation of a large prepore complex precedes the insertion of the transmembrane β -hairpins // *Biochemistry.* — 2000. — V. 39. — P. 10284–10293.
 19. *Rossjohn J., Feil S. C., McKinstry W. J. et al.* Structure of a cholesterol-binding, thiol-activated cytolysin and a model of its membrane form // *Cell.* — 1997. — V. 89, N 5. — P. 685–692.
 20. *Monastyrnaya M. M., Kozlovskaya E. P., Elyakov G. B.* Hemolysins from sea anemones: investigation of mechanism of action // *J. Toxicol.* — 1990. — V. 9, N 1. — P. 82.
 21. *Menestrina G., Bashford C. L., Pasternak C. A.* Pore-forming toxins: experiments with *S. aureus* alpha-toxin, *C. perfringens* theta-toxin and *E. coli* haemolysin in lipid bilayers, liposomes and intact cells // *Toxicon.* — 1990. — V. 28, N 5. — P. 477–491.
 22. *Ide T., Ichikawa T.* A novel method for artificial lipid-bilayer formation // *Biosensors and Bioelectronics.* — 2005. — V. 21, N 4. — P. 672–677.
 23. *Rossjohn J., Shepard L. A., Heuck A. P. et al.* Identification of a membrane-spanning domain of the thiol-activated pore-forming toxin *Clostridium perfringens* perfringolysin O: an alpha-helical to beta-sheet transition identified by fluorescence spectroscopy // *Biochemistry.* — 1998. — V. 37, N 41. — P. 14563–14574.
 24. *Shatursky O. Ya., Heuck A. P., Shepard L. A. et al.* The mechanism of membrane insertion for a thiol-activated cytolysin: a new paradigm for pore-forming toxins // *Cell.* — 1999. — V. 99. — P. 293–299.
 25. *Shatursky O. Ya., Bayles R., Rogers M. et al.* *Clostridium perfringens* beta-toxin forms potential-dependent, cation-selective channels in lipid bilayers // *Infect. Immun.* — 2000. — V. 68, N 10. — P. 5546–5551.
 26. *Oh K. J., Zhan H., Cui C. et al.* Organization of diphtheria toxin T domain in bilayers: a site-directed spin labeling study // *Science.* — 1996. — V. 273, N 5276. — P. 810–812.
 27. *Benson E. L., Huynh P. D., Finkelstein A. et al.* Identification of residues lining the anthrax protective antigen channel // *Biochemistry.* — 1998. — V. 37, N 11. — P. 3941–3948.
 28. *Shatursky O. Ya., Volkova T. M., Romanenko O. V., Grishin E. V.* Vitamin B₁ thiazole derivative reduces transmembrane current through ionic channels formed by toxins from black widow spider venom and sea anemone in planar phospholipids membranes // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2007. — V. 1768. — P. 207–217.
 29. *Shatursky O. Ya., Pashkov V. N., Bulgacov O. V., Grishin E. V.* Interaction of α -latroinsectotoxin from *Latrodectus mactans* venom with bilayer lipid membranes // *Ibid.* — 1995. — V. 1233. — P. 14–20.

**ЗАКОНОМЕРНОСТИ ОБРАЗОВАНИЯ
И ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ
ИОНПРОВОДЯЩИХ КАНАЛОВ
ЦИТОЛИТИЧЕСКИХ ПРОТЕИНОВ
ПРИ РЕКОНСТРУКЦИИ
В ИСКУССТВЕННЫХ
ЛИПИДНЫХ БИСЛОЯХ**

О. Я. Шатурский

Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев

E-mail: olegshatursky@biochem.kiev.ua

Особую роль при патологиях, возникающих вследствие образования цитолитическими токсинами протеинов ионных каналов в плазматической мембране пораженных клеток, играет пассивная транспортировка каналами токсинов неорганических ионов и органических соединений, которые принимают участие в обмене веществ или являются важными составляющими клетки. Поэтому исследование процесса образования и функционирования ионных каналов цитолитическими токсинами является важным для определения строения канального олигомера в плазматической мембране клетки-мишени и механизмов лизиса клетки.

Цитолитическое действие рассмотренных в работе протеиновых токсинов осуществляется путем увеличения непосредственной транспортировки неорганических ионов через нативные мембраны пораженных клеток и высвобождения их внутренних компонентов (протеинов, органических кислот и т. п.). Это связано с образованием токсинами ионпроводящих олигомеров — каналов в липидном бислое плазматической мембраны. Реконструкция ионных каналов цитолитических протеинов в искусственных бислоидных липидных мембранах и липосомах дает возможность исследовать их образование и функционирование, что важно для определения структуры ионпроводящего олигомера и механизма его токсического действия с целью лечения токсических поражений путем блокирования тока ионов через каналы токсинов. Основное внимание в обзоре уделено обсуждению закономерностей образования и свойств сравнительно недавно реконструированных ионпроводящих олигомеров нейро- и дерматотоксичного β -токсина бактерии *Clostridium perfringens*, а также гемолитических θ -токсина бактерии *Clostridium perfringens* и RTX-токсина *Radianthus macrodactylus*.

Ключевые слова: бислоидная липидная мембрана, ионные каналы, β - и θ -токсины *Clostridium perfringens*, RTX-токсин *Radianthus macrodactylus*.

**CHANNEL FORMATION
AND FUNCTIONING REGULARITIES
FOR CYTOTOXIC PORE-FORMING
PROTEINS UNDER RECONSTRUCTION
INTO ARTIFICIAL LIPID BILAYERS**

O. Ya. Shatursky

Palladian Institute of Biochemistry
of the National Academy of Sciences
of Ukraine, Kyiv

E-mail: olegshatursky@biochem.kiev.ua

Passive transporting of inorganic ions and organic compounds, that take part in metabolism or are the important cell constituents plays a special role in pathologies resulting from cytotoxic proteins channel creation into a target cells plasma membrane. Therefore, research of cytotoxic proteins channel creation and functioning is important for determination of a channel oligomer structure in a target cells plasma membrane and the mechanisms of cell destruction.

Cytolytic effect of protein toxins reviewed is carried out via direct transporting increase of inorganic ions through the native membranes of the target cells and release of their interior components (toxic protein channels). It is associated with formation of ion-conducting oligomers — channels in lipid bilayer of plasma membrane — by toxins. These pore-forming proteins reconstruction into bilayer lipid membranes and liposomes allows to research their channel formation and functioning that provides a possibility to investigate the cytolytic protein pore structure and action mode aiming cells lysis prevention via blocking of ionic current across toxin channels. Most of the review is focused on regularity of creation and properties for relatively recent reconstructed ion-conductive oligomers of neuro- and dermatotoxic β -toxin from bacteria *Clostridium perfringens*, another haemolytic θ -toxin of *Clostridium perfringens* and actoporine RTX of *Radianthus macrodactylus*.

Key words: bilayer lipid membrane, ion channel, *Clostridium perfringens* β - and θ -toxin, *Radianthus macrodactylus* RTX toxin.