

УДК 577.2+577.29+57.021

## ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ТРАНСПОРТ РИБОСОМ-ИНАКТИВИРУЮЩИХ БЕЛКОВ ЗАВИСИТ ОТ АННЕКСИНА 13

© 2020 г. Д. В. Мальцева<sup>1,2,3,\*</sup>, М. П. Райгородская<sup>2</sup>, В. Г. Згода<sup>4</sup>,  
Е. А. Тоневицкий<sup>5</sup>, Е. Н. Князев<sup>1,\*\*</sup>

Представлена академиком РАН А.В. Лисицей

Поступило 19.03.2020 г.

После доработки 06.04.2020 г.

Принято к публикации 06.04.2020 г.

В настоящей работе исследовалась роль мембраносвязывающего белка аннексина 13 (ANXA13) во внутриклеточном транспорте везикул, содержащих рибосом-инактивирующие белки второго типа (РИБ-II) – рицин и вискумин. Была использована модифицированная клеточная линия эпителия кишечника человека HT29, в которой экспрессия ANXA13 была значительно снижена. Цитотоксическое действие рицина и вискумина оценивали по модификации 28S РНК рибосом. Обнаруженное различие в активности токсинов на исходной и модифицированной линиях HT29 указывают на то, что ANXA13 играет разную роль во внутриклеточном транспорте везикул, содержащих исследуемые РИБ-II.

**Ключевые слова:** ANXA13, HT29, MLI, аннексин 13, вискумин, рибосом-инактивирующий белок, рицин, внутриклеточный транспорт, эндоцитоз, эпителий кишечника

**Список сокращений:** ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция с детекцией продукта в режиме реального времени, РИБ – рибосом-инактивирующий белок второго типа, рРНК – рибосомная РНК, ЭПР – эндоплазматический ретикулум

**DOI:** 10.31857/S2686738920040149

Эндоцитоз, механизм везикулярного транспорта различных молекул от плазматической мембраны эукариотических клеток в цитоплазму, участвует в широком спектре физиологических процессов [1]. В эукариотических клетках описано несколько различных путей эндоцитоза. Однако, несмотря на многолетнее изучение, множе-

ство деталей этого процесса остаются не выясненными [1]. Рибосом-инактивирующие белки второго типа (РИБ-II) являются классическим инструментом для выявления новых и более глубокого понимания уже известных путей внутриклеточного транспорта [1, 2]. К числу широко используемых РИБ-II относятся рицин и вискумин, которые обладают одинаковым механизмом действия и являются структурными гомологами [2–4], но цитотоксическая активность их значительно различается [5–8]. Оба белка состоят из двух цепей каталитической (А-цепи) и связывающей (В-цепи), соединенных дисульфидной связью. В-цепь связывается с гликозилированными белками и липидами, содержащими концевой остаток галактозы, на поверхности клетки. Часть связавшихся с мембраной молекул РИБ-II подвергается эндоцитозу в составе мембранных везикул и последующему ретроградному транспорту в эндоплазматический ретикулум, где происходит восстановление дисульфидной связи и транслокация А-цепи в цитоплазму. А-цепь является N-гликозидазой и необратимо модифицирует 28S РНК рибосом, что приводит к остановке белкового синтеза. Важной особенностью работы с РИБ-II является возможность количественной оценки

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup> Научно-технический центр “БиоКлиникум”, Москва, Россия

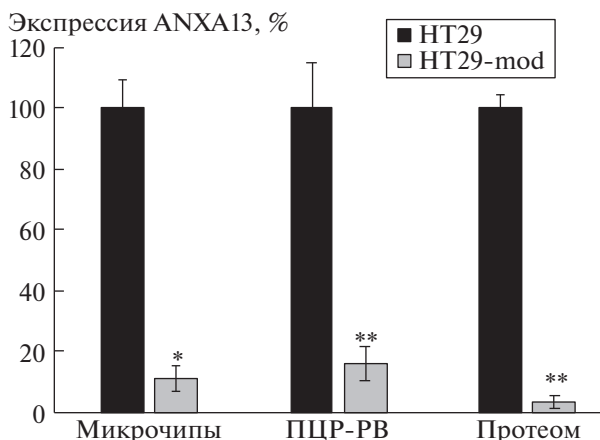
<sup>3</sup> Факультет биологии и биотехнологии, Национальный исследовательский университет “Высшая школа экономики”, Москва, Россия

<sup>4</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича”, Москва, Россия

<sup>5</sup> Фонд развития инновационного научно-технологического центра “Долина Менделеева”, Москва, Россия

\*e-mail: dmaltseva@gmail.com

\*\*e-mail: knyazevevg@gmail.com



**Рис. 1.** Сравнение экспрессии ANXA13 в клеточных линиях HT29 и HT29-mod по данным микрочипов, ПЦР-РВ и протеома. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

доли инактивированных в клетке рибосом с помощью ПЦР-РВ [5].

Целью настоящего исследования было оценить роль аннексина 13 (ANXA13) во внутриклеточном транспорте везикул, содержащих рибин и вискумин. ANXA13 принадлежит к семейству мембраносвязывающих белков аннексинов, которые принимают участие в везикулярном внутриклеточном транспорте и является специфическим маркером клеток эпителия кишечника [9]. Недавно с помощью стабильного нокдауна гена белка внеклеточного матрикса  $\alpha 5$  цепи ламининов нами была получена модификация клеточной линии колоректальной аденокарциномы HT29 (HT29-mod) [10], в которой наблюдалось сниженная экспрессия ANXA13 как на уровне мРНК (в 9.3 и в 6.3 раза по данным микрочипов и ПЦР-РВ, соответственно), так и на уровне белка (в 30.6

раза) (рис. 1). Анализ экспрессии генов с помощью микрочипов проводили также, как описано в [11], с помощью ПЦР-РВ – как описано в [12], анализ протеома – как описано в [10].

Клетки обрабатывались рибцином или вискумином в течение 1 ч. Затем проводилась замена культуральной среды на свежую, не содержащую РИБ-П. Оценку доли инактивированных рибосом проводили через 1 ч после замены среды с помощью ПЦР-РВ по методу, разработанному нами ранее [5]. Приведем основные моменты, лежащие в основе этого метода: 1) А-цепь РИБ-П гидролизует *N*-гликозидную связь аденозина в положении A4324  $\alpha$ -сарцин-рициновой петли 28S рРНК, формируя AP-сайт; 2) обратная транскриптаза в процессе синтеза кДНК встраивает напротив AP-сайт аденин, в результате чего в последовательности происходит замена тимина на аденин;

**Таблица 1.** Инактивация рибосом вискумином и рибцином в клетках HT29 и HT29-mod

РИБ, М	Доля инактивированных рибосом, %*	
	HT29	HT29-mod
Вискумин		
$1 \times 10^{-9}$	<0.001	0.002
$1 \times 10^{-8}$	0.02	0.07
$1 \times 10^{-7}$	0.4	1.2
Рибин		
$1 \times 10^{-9}$	0.8	0.07
$1 \times 10^{-8}$	6.1	1.1
$1 \times 10^{-7}$	30	8.4

\* Для всех указанных значений погрешность определения (SD) не превышала 10%.

3) используя специфические праймеры, 3'-конец которых комплементарен либо исходной либо модифицированной последовательности, можно детектировать накопление сигнала модифицированных 28S рРНК; 4) для нормирования используется сигнал накопления фрагмента 28S рРНК, удаленного от места модификации. Полученные результаты показали, что в клетках линии HT29-mod при обработке вискумином для всех используемых концентраций через 2 ч детектировалось в 3–3.5 раза больше инактивированных рибосом по сравнению с исходной линией (табл. 1). Однако, при обработке клеток ризином доля инактивированных рибосом в клетках линии HT29-mod была, наоборот, ниже, как минимум в 3.6 раза, чем в исходной линии HT29.

Одна из известных функций ANXA13 в клетках эпителия кишечника — участие в anterogradном транспорте везикул от аппарата Гольджи к плазматической мембране. Полученные результаты свидетельствуют о том, что снижение экспрессии ANXA13 оказывает разнонаправленное влияние на действие вискумина и ризицина. ANXA13 обладает предпочтением для связывания с участками мембраны обогащенными сфинголипидами и холестеринем [9], это может определять специфичность транспорта внутриклеточных везикул, содержащих исследуемые РИБ-II [6, 13]. Аннексины, связываясь с мембраной, задают радиус кривизны образующихся везикул [9], что влияет на скорость их транспорта в цитоплазме [14]. Снижение экспрессии ANXA13 приводит к увеличению размера образующихся везикул и замедлению их транспорта. В случае вискумина, это приводит к снижению anterogradного транспорта везикул и увеличению доли молекул токсина, достигших ЭПР и цитоплазмы.

В случае ризицина ANXA13, по-видимому, играет минорную роль, в anterogradном транспорте везикул, содержащих токсин, однако, может принимать участие в retrogradном транспорте. Изменение размера везикул, содержащих ризин, приводит к уменьшению доли молекул токсина, достигших ЭПР и цитоплазмы. Важно указать, что по данным протеома в клетках HT29-mod также снижается экспрессия таких белков, вовлеченных в процесс внутриклеточного транспорта, как Rab1a, Rab21 и TMED2 (в 5.6, 4.4 и 11.5 раза соответственно). Нокаун генов этих белков приводит к снижению чувствительности клеток к действию ризицина [15]. Нами впервые показано, что в случае вискумина изменение экспрессии этих белков, по-видимому, играет минорную роль в транспорте везикул, содержащих токсин.

Обобщая полученные данные, можно сделать вывод, что anterogradный транспорт вискумина и ризицина различается. Влияние ANXA13 на транспорт мембранных везикул связано как с его

структурными (размер везикул), так и рецепторными свойствами (сортировка везикул). Снижение экспрессии ANXA13, по-видимому, замедляет anterogradный транспорт везикул, содержащих вискумин, что и определяет увеличение доли инактивированных в клетках рибосом. В случае ризицина, роль ANXA13 в anterogradном транспорте представляется минорной. Участие ANXA13 в retrogradном транспорте везикул, содержащих ризин, требует дополнительных исследований. Нельзя также исключать, что снижение экспрессии ANXA13 приводит к компенсаторной активации альтернативного пути внутриклеточного транспорта везикул, который оказывается более специфичным для везикул, содержащих вискумин.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование протеома проводилось с использованием оборудования Центра коллективного пользования “Протеом человека” (ИБМХ).

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (проект № 17-14-01338).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sandvig K., Kavaliauskiene S., Skotland T. // *Histochem. Cell Biol.* 2018. V. 150. № 2. P. 107–118.
2. Sandvig K., van Deurs B. // *EMBO J.* 2000. V. 19. № 22. P. 5943–5950.
3. Tonevitsky A.G., Agapov I.I., Shamshiev A.T., et al. // *FEBS Lett.* 1996. V. 392. № 2. P. 166–168.
4. Agapov I.I., Tonevitsky A.G., Moysenovich M.M., et al. // *FEBS Lett.* 1999. V. 452. № 3. P. 211–214.
5. Nikulin S.V., Mnafski N.A., Shilin S.A., et al. // *Mol. Biol.* 2018. V. 52. № 4. P. 583–589.
6. Moysenovich M., Tonevitsky A., Agapov I., et al. // *Eur. J. Cell Biol.* 2002. V. 81. № 10. P. 529–538.
7. Moysenovich M., Tonevitsky A., Maljuchenko N., et al. // *Histochem. Cell Biol.* 2004. V. 121. № 6. P. 429–439.
8. Maltseva D.V., Krainova N.A., Khaustova N.A., et al. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2017. V. 163. № 4. P. 451–455.
9. Gerke V., Moss S.E. // *Physiol. Rev.* 2002. V. 82. № 2. P. 331–371.
10. Maltseva D.V., Raigorodskaya M.P., Tsygina I.M., et al. // *Biotekhnologiya.* 2019. V. 35. № 6. P. 3–11.
11. Khaustova N.A., Maltseva D.V., Oliveira-Ferrer L., et al. // *Biochimie.* 2017. V. 142. P. 197–206.
12. Kudriaeva A., Galatenko V., Maltseva D., et al. // *Molecules.* 2017. V. 22. № 5. P. 808.
13. Agapov I.I., Tonevitsky A.G., Maluchenko N.V., et al. // *FEBS Lett.* 1999. V. 464. № 1–2. P. 63–66.
14. Saltzman M.W. // *Drug Delivery: Engineering Principles for Drug Therapy.* (Oxford University Press, 2001).
15. Bassik M.C., Kampmann M., Lebbink R.J., et al. // *Cell.* 2013. V. 152. № 4. P. 909–922.

## INTRACELLULAR TRANSPORT OF RIBOSOME-INACTIVATING PROTEINS DEPENDS ON ANNEXIN 13

D. V. Maltseva<sup>a,b,c,#</sup>, M. P. Raigorodskaya<sup>b</sup>, V. Zgodan<sup>d</sup>, E. A. Tonevitsky<sup>e</sup>, and E. N. Knyazev<sup>a,##</sup>

<sup>a</sup> *Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

<sup>b</sup> *Scientific Research Center Bioclinicum, Moscow, Russian Federation*

<sup>c</sup> *Faculty of Biology and Biotechnology, National Research University Higher School of Economics, Moscow, Russian Federation*

<sup>d</sup> *Institute of biomedical Chemistry, Moscow, Russian Federation*

<sup>e</sup> *Development Fund of the Innovation Science and Technology Center "Mendeleev Valley", Moscow, Russian Federation*

<sup>#</sup> *e-mail: dmaltseva@gmail.com*

<sup>##</sup> *e-mail: knyazevevg@gmail.com*

Presented by Academician of the RAS A.V. Lisitsa

**Abstract** –In the present study we assessed the role of annexin 13 membrane-binding protein (ANXA13) in the intracellular transport of vesicles containing ribosome-inactivating proteins of the second type (RIP-II). A modified human intestinal epithelial cell line HT29 was used, in which the expression of ANXA13 was significantly reduced. The cytotoxic effect of ricin and viscumin was evaluated by modification of 28S ribosome RNA. The observed differences in the activity of toxins on the parental and modified HT29 lines indicate that ANXA13 plays a different role in the intracellular transport of vesicles containing the RIP-II.

**Keywords:** ANXA13, HT29, MLI, annexin 13, endocytosis, intestinal epithelium, intracellular transport, ribosome-inactivating protein, ricin, viscumin