

СОВРЕМЕННОЕ ПОНИМАНИЕ ОРГАНИЗАЦИИ МОЛЕКУЛ ТОКСИНОВ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ И ПОДХОДЫ К БЛОКИРОВАНИЮ ИХ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ

В.В. Фирстова, И.Г. Шемякин, И.А. Дятлов

ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, п. Оболенск, Московская область, Россия

Резюме. В обзорной статье приводятся результаты разносторонних исследований механизмов ингибирования цитотоксического действия сибиреязвенного токсина на клетки иммунной системы. Рассмотрены различные формы заболевания, иммунопатогенез и современные методы лечения сибирской язвы. Описан сибиреязвенный токсин *Bacillus anthracis*. Детально описана структурно-функциональная организация протективного антигена, летального и отечного факторов. Представлен механизм ассоциации протективного антигена и летального фактора, приводящий к образованию летального токсина, а также описан процесс образования комплекса протективный антиген — отечный фактор, формирующего отечный токсин. Рассмотрено участие доменов протективного антигена в процессе взаимодействия с рецепторами на поверхности иммунокомпетентных клеток и охарактеризованы особенности связывания протективного антигена с летальным фактором и отечным фактором. Описаны механизмы интернализации комплексов токсинов в эндосому и последующая транслокация эффекторных молекул в цитозоль. Проанализированы направленность действия летального и отечного факторов на структуры эукариотических клеток, механизмы цитотоксичности. На основании описанной последовательности проявления цитотоксической активности токсинами *B. anthracis* проанализированы подходы к блокированию их действия на различных стадиях токсикоемии. Описаны полученные к настоящему времени химерные и гуманизированные моноклональные антитела, способные нейтрализовать токсины *B. anthracis* на разных этапах сборки. В частности, рассмотрены препараты, ингибирующие: межрецепторные взаимодействия протективного антигена с рецепторами эукариотической клетки; фуриноподобные ферменты, активирующие сборку препоры; олигомеризацию протективного антигена; связывание летального или отечного факторов с протективным антигеном; транслокацию летального или отечного факторов сибирской язвы в цитозоль клетки; транскрипцию протективного антигена с летальным или отечным факторами из эндосом; ферментативную активность летального или отечного факторов. Рассмотрены препараты, утвержденные для профилактики и лечения сибирской язвы в России и за рубежом. Описаны имеющиеся недостатки используемых препаратов и направления по их совершенствованию. В состав перспективных направлений входят ингибирование ферментативной активности летального фактора, препятствие ассоциации компонентов токсинов, блокирование взаимодействия токсических комплексов с рецепторами клеток иммунной системы.

Ключевые слова: протективный антиген, летальный фактор, отечный фактор, токсин, иммунопатогенез.

Адрес для переписки:

Фирстова Виктория Валерьевна
142279, Россия, Московская область, п. Оболенск,
ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии.
Тел.: 8 (4967) 36-00-03. Факс: 8 (4967) 36-00-10.
E-mail: firstova@obolensk.org

Contacts:

Victoria V. Firstova
142279, Russian Federation, Moscow Region, Obolensk,
State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology.
Phone: +7 (4967) 36-00-03. Fax: +7 (4967) 36-00-10.
E-mail: firstova@obolensk.org

Библиографическое описание:

Фирстова В.В., Шемякин И.Г., Дятлов И.А. Современное понимание организации молекул токсинов сибирской язвы и подходы к блокированию их цитотоксического действия // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 5–6. С. 639–647. doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-639-647

Citation:

Firstova V.V., Shemyakin I.G., Dyatlov I.A. Current understanding of Bacillus anthracis toxin molecules organization and approaches for blocking their cytotoxic action // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 5–6, pp. 639–647. doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-639-647

CURRENT UNDERSTANDING OF *BACILLUS ANTHRACIS* TOXIN MOLECULES ORGANIZATION AND APPROACHES FOR BLOCKING THEIR CYTOTOXIC ACTION

Firstova V.V., Shemyakin I.G., Dyatlov I.A.

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation

Abstract. Here, we review the data on mechanisms inhibiting cytotoxic effect of anthrax toxin on the immune system cells. Various disease forms, immunopathogenesis and contemporary methods for anthrax treatment are discussed. In addition, an anthrax toxin was outlined, whereas structural and functional organization of the protective antigen, lethal and edema factors was detailed. A mechanism for association of a protective antigen and lethal factor, protective antigen and edema factor leading to formation of a lethal toxin and edema toxin, respectively, was described. Participation of protective antigen domains in the process of interaction with surface receptors of immunocompetent cells as well as features of binding a protective antigen with lethal factor and edema factor are discussed. A mechanism of endosomal toxin complex internalization and subsequent transfer of effector molecules to the cytosol are described. Effects of the lethal factor and the edema factor on components of eukaryotic cells as well as cytotoxicity mechanisms are analyzed. The approaches to block anthrax toxin action at various stages of toxicoemia have been analyzed based on previously uncovered sequential signs of cytotoxic activity for *Bacillus anthracis* toxins. Currently available chimeric and humanized monoclonal antibodies are capable of neutralizing *B. anthracis* toxins at diverse assembly stages, particularly considering the drugs inhibiting: inter-receptor interaction between protective antigen with eukaryotic cells; furin-like enzymes activating prepore assembly; protective antigen oligomerization; binding of the lethal factor or edema factor to the protective antigen; translocation of the lethal factor or the edema factor into cell cytosol; transport of protective antigen with lethal factor or edema factor from endosomes; enzymatic activity of lethal factor or edematous factor. The anti-toxin agents approved for anthrax prevention and treatment in Russia and worldwide are discussed. The limitations of anti-toxin agents and perspectives for their improvement are also described including inhibition of lethal factor activity, interference with integration of toxin components, blockade of interactions between toxic complexes and immune cell receptors.

Key words: *B. anthracis*, protective antigen, lethal factor, edema factor, toxin, immunopathogenesis.

Современное понимание организации молекул токсинов сибирской язвы

Сибирская язва — особо опасная инфекция, которая в зависимости от пути проникновения возбудителя развивается в кожной, аэрогенной или гастроэнтеральной формах. У людей наиболее распространенной формой заболевания сибирской язвой является кожная при которой появляются язвы и отечность в местах проникновения патогена. При кожной форме сибирской язвы даже в отсутствие лечения летальность составляет 10–20%, а при проведении антибиотикотерапии снижается до минимума. Кишечная форма, возникающая при проглатывании спор, вызывает более серьезное системное заболевание, приводящее к поражению желудочно-кишечного тракта, лимфадениту, отеку внутренних органов и, в конечном счете, к заражению крови. На поздних стадиях заболевания эта форма сибирской язвы не поддается лечению. И, наконец, самая опасная форма сибиреязвенной инфекции — легочная, которая, как и кишечная, имеет системный характер, но характеризуется крайне быстрым развитием и высоким процентом летальности (до 80% заболевших). Даже при своевременно начатой терапии на ранних этапах заболевания сибирской язвой при кишечной, легочной или менингеальной формах — прогноз неблагоприятный.

При проникновении в легкие большая часть спор фагоцитируется макрофагами и дендритными клетками. После поглощения спор фагоциты устремляются в ближайшие лимфатические узлы для презентации антигена лимфоцитам. Однако часть спор выживает и прорастает (вегетативная форма) в фагоцитах и, таким образом, дендритные клетки и макрофаги выполняют роль системы доставки возбудителей сибирской язвы в лимфатические узлы. Вегетативные бактерии *B. anthracis* лизируют оболочку фагоцитов, размножаются в лимфатической системе, а затем мигрируют в кровоток.

В течение первых недель после инфицирования организма симптомы заболевания могут отсутствовать, а затем появляется кашель и поднимается температура. Бактерии проникают в кровь и, когда количество бактерий достигает критического уровня, у больного затрудняется дыхание, развивается шоковое состояние и обширные кровоизлияния, зачастую сопровождающиеся припадками. Проявление таких симптомов обуславливают летальный и отечный токсины *B. anthracis*. После достижения критической стадии терапия антибиотиками становится неэффективной, и в течение 24 ч в преобладающем большинстве случаев больной погибает. Это связано с тем, что даже после уничтожения бактерий антибиотиками типа ципрофлоксацина и/или доксициклина [9, 20], летальный и отечный токсины продол-

жают циркулировать в крови и проявлять цитотоксичность. Поврежденные токсином макрофаги синтезируют в большом количестве провоспалительные цитокины, которые приводят к развитию шокового состояния и, как следствие, к смерти. Единственным решением для предотвращения летального исхода у больного на поздней стадии сибиреязвенной инфекции может быть специфическая терапия, направленная против токсинов. Для создания средств антитоксинной терапии необходимо сконструировать высокоэффективный ингибитор избранной мишени, а это возможно только при полном понимании механизмов проникновения токсинов и действия их в организме.

К главным факторам вирулентности *B. anthracis* относятся капсульный антиген и сибиреязвенный токсин, которые начинают синтезироваться сразу после прорастания споры. Сибиреязвенный токсин представляет собой трехкомпонентную систему, стоящую из протективного антигена (ПА), летального фактора (ЛФ) и отежного фактора (ОФ), кодирующимися генами плазмиды *pOX1*. ЛФ и ОФ являются ферментами, которые модифицируют внутриклеточные сигнальные пути, а ПА обеспечивает транслокацию ЛФ и ОФ в цитозоль клетки. Каждый из компонентов токсина отдельно нетоксичен. Эти компоненты относятся к широкому классу токсинов, именуемых АБ токсинами. Отежный и летальный факторы относятся к компоненту А, а протективный антиген — к компоненту Б. Бинарные комбинации этих секретируемых белков составляют два токсина сибирской язвы: ПА в комбинации с ЛФ образуют летальный токсин (ЛТ), а ПА в комбинации с ОФ — отежный токсин (ОТ). Протективный антиген присоединяется к рецепторам клетки хозяина и способствуют проникновению в ее цитозоль ОФ или ЛФ, формируя пору на поверхности клетки. ЛТ и ОТ препятствуют формированию клеточного ответа на бактериальную инфекцию, разрушают систему иммунитета клетки и, таким образом, способствуют распространению бактерий [3]. По мере развития болезни токсины накапливаются в кровотоке и на поздних этапах являются главной причиной патологии. Это подтверждено в экспериментах на мышинной модели: внутривенное введение ЛТ вызывает гибель экспериментальных животных. Гибель мышей от внутривенного введения ЛТ ассоциирована с шоком, разрушением сосудов и общей гипоксией. Действие ОТ приводит к повреждению тканей, дисфункции различных органов, кровоизлияниям и понижению давлению.

Протективный антиген (ПА) массой 83 kDa является центральным компонентом токсинов

сибирской язвы. ПА характеризуется ярко выраженными иммуногенными свойствами и поэтому ПА является основным компонентом при разработке вакцин.

Мономерный ПА представляет собой белок, состоящий из 735 аминокислотных остатков, разделенный на 4 структурных домена (рис. 1, вклейка). Основные функции 1-го домена ПА (с 1 по 258 аминокислотный остаток) заключаются в связывании ЛФ и ОФ, 2-го домена (с 259 по 487) — в связывании ПА₆₃ мономеров и формировании петли, которая встраивается в мембрану лейкоцита и формирует катион-селективный канал [36], 3-го домена (с 488 по 595) — в олигомеризации и/или связывании ЛФ и ОФ, 4-го домена (с 596 по 735) — в связывании с рецепторами на поверхности эукариотических клеток [27].

Протективный антиген связывается с рецепторами, которые встречаются на поверхности многих типов клеток организма человека. В частности, ПА способен связываться с рецептором TEM8 (tumor endothelium marker 8), CMG2 (capillary morphogenesis protein 2), β 1-интегрином и с участием других белков проникать внутрь эукариотической клетки путем рецептор-зависимого эндоцитоза [28, 32, 21]. TEM8 еще называют рецептором сибирской язвы 1 (Anthrax Toxin Receptor — ATR1), CMG2 — рецептором сибирской язвы 2 (ATR2). Основные функции белков TEM8 и CMG2 заключаются в том, что они являются молекулами клеточной адгезии и вовлечены в ангиогенез [4, 16]. Экспрессия CMG2 наблюдается в большинстве человеческих тканей, а TEM8 экспрессируется главным образом на опухолевых эндотелиальных и раковых клетках [16, 22]. CMG2, TEM8 и β 1-интегрин относятся к трансмембранным белкам типа 1, имеющим высококонсервативный внеклеточный домен фактора фон Виллебранда типа А, который связывается непосредственно с ПА. Рецепторы CMG2, TEM8 и β 1-интегрин имеют структурные отличия в основном в своих цитоплазматических доменах, которые не влияют на связывание и транслокацию токсинов сибирской язвы [18].

После связывания с TEM8, β 1-интегрином и/или CMG2 клеточным рецептором полноразмерный ПА₈₃ подвергается процессингу фуриноподобными протеазами клетки-хозяина с отщеплением 167 N-концевых аминокислотных остатков протективного антигена молекулярной массой около 20 kDa (ПА₂₀), располагающихся в домене 1. Оставшаяся часть первого домена обозначается 1' (аминокислотные остатки 168–258), а вся оставшаяся часть ПА массой 63 kDa — ПА₆₃. Домен 1' взаимодействует с двумя ионами Ca²⁺, содержит сайт расщепления фурина и предотвращает олигомеризацию полноразмерного ПА [44].

Активированный ПА₆₃ спонтанно образует гептамерные или октамерные структуры, называемые препорами (рис. 2, вклейка). Анализ кристаллографической структуры гептамерной препоры показал, что она построена на основании мономер-мономерного контакта между поверхностями доменов 1' и 4 ПА₆₃. Наличие или отсутствие ПА20 практически не влияет на формирование препоры. Обязательным участником в формировании препоры является домен 3, который участвует в олигомеризации ПА, и домен 2, формирующий большую гибкую петлю, вовлеченную во взаимодействие с мембраной и в связывание с рецептором на поверхности эукариотической клетки [34].

Домены 1', 3, 4 формируют венчик, а домен 2 — чашевидную структуру 2с (из аминокислотных остатков 259–274 и 354–487) и стельку 2s (275–353) поры ПА (рис. 1). Домены 1' и 2с формируют компактную структуру протеина, ответственную за связывание с отечным и летальным факторами и обеспечивает их эндоцитоз. Диаметр образованной в мембране лейкоцита препоры составляет 20–30 Å вначале, сужаясь далее до 6 Å, что позволяет предположить прохождение ЛФ и ОФ внутрь клетки в нефолдированном состоянии [23].

После протеолитического отщепления части домена 1 ПА (рис. 2, синий цвет) оставшаяся часть (ПА₆₃) олигомеризуется и связывается с ЛФ (красный цвет). Образованный летальный токсинный комплекс связывается с рецептором клеточной поверхности (желтый) и захватывается клеткой путем эндоцитоза. В процессе созревания содержимое эндосомы закисляется, что способствует превращению препоры ПА в истинную пору. Летальный фактор в кислой среде разворачивается и транслоцируется через канал ПА.

Важно отметить, что сайт связывания на поверхности ПА для эффекторных субъединиц ЛФ и/или ОФ формируется только при олигомеризации ПА. В верхней части рисунка 2 показаны два возможных варианта стехиометрии летального токсина, что обусловлено разным соотношением мономеров ПА и ЛФ: PA7-LF3 и PA8-LF4. Каждые две ПА-субъединицы создают сайт привязки для одного ЛФ. В результате гептамер ПА содержит три ЛФ и имеет пустой полусайт, в котором контакты ЛФ-ЛФ прерываются. Октамер содержит четыре молекулы ЛФ, которые полностью образуют контакты ЛФ-ЛФ вокруг кольца [24].

Процесс олигомеризации ПА ускоряется в присутствии ЛФ и/или ОФ, вероятно за счет стабилизирующего действия мультимерных комплексов ЛФ и ОФ. Быстрая агрегация ПА с ЛФ или ОФ обеспечивает эффективную транслокацию энзиматических субъединиц токсинов

внутри клетки и сводит к минимуму вероятность интернализации пустых гептамеров ПА [11]. Олигомерные комплексы ПА вызывают кластеризацию рецепторов на поверхности эукариотической клетки, усиливая эффективность связывания ПА с поверхностью клетки.

После связывания ПА с ЛФ или ОФ, образованный комплекс захватывается клеткой путем клатрин-зависимого эндоцитоза. Для интернализации токсинов сибирской язвы рецепторы CMG2, TEM8 и β1-интегрин должны связаться с рецептор-подобным белком LRP6 (LRP-receptor related protein), который является необходимым участником для эффективного эндоцитоза [28, 37, 43]. Образованный комплекс проникает внутрь клетки. Интернализация комплексов токсинов сибирской язвы стимулируется за счет кальпаин-зависимого разрушения талина, который связывает интегрины с активным цитоскелетом, что способствует эндоцитозу токсина (рис. 3, вклейка). Ингибирование кальпаина не снижает уровень адгезии ПА к рецепторам эукариотической клетки, но снижает эндоцитоз [8, 21].

После образования эндосомы начинается ее созревание в процессе которого происходит закисление среды. При снижении pH в структуре ПА происходят конформационные изменения в результате которых второй домен ПА внедряется в мембрану эндосомы, формируя истинную пору. Закисление pH среды эндосомы приводит также к конформационным изменениям ЛФ и ОФ, которые разворачиваются и транслоцируются через истинную пору, сформированную ПА, в цитозоль клетки [7]. Попав в цитозоль, ЛФ и ОФ катализируют реакции, нарушающие нормальное физиологическое состояние клетки.

Летальный фактор представляет собой высокоспецифичную Zn²⁺-зависимую металлопротеазу, которая расщепляет вблизи N-конца последовательности киназ семейства MAPKK (mitogen activated protein kinase kinases — митоген-активируемые протеинкиназные киназы). Анализ трехмерной структуры этой протеазы указывает на то, что, по-видимому, эволюционно ген ЛФ появился в результате процессов дупликаций, мутаций и слияния различных генов, что привело к появлению протеазы с крайне высокой специфичностью. Летальный фактор — крупный белок весом 94 kDa, который состоит из 4 доменов [31] (рис. 4, III обложка). Домен 1 ЛФ (аминокислотные остатки 1–263) связывает ПА, он необходим для проникновения ЛФ внутрь клетки. При связывании с ПА N-концевая α-спираль ЛФ отходит от основного корпуса и перемещается в область α-зажима ПА [30]. Домен 2 (аминокислотные остатки 264–299 и 386–550) вовлечен в узнавание C-терминальной части субстратного

пептида. Домен 3 (остатки 300–385), так называемый «спиральный пучок», встроен в домен 2, и вовлечен в узнавание субстрата P1-P5'. Домен 4 (остатки 551–776) является каталитическим центром связывания иона Zn^{2+} . Общая структура каталитического домена уникальна и не имеет гомологов.

Летальный фактор совместно с ПА образует ЛТ, который проявляет цитотоксичность по отношению к макрофагам. Действие ЛФ направлено на семейство сигнальных молекул МАРКК. В результате цепи последовательных фосфорилирований нескольких различных протеинкиназ активируется одна из МАР (митоген-активируемый протеин) протеинкиназ. Действие ЛФ направлено на МАРКК 5, семейство белков, участвующих в передаче сигналов, необходимых для нормального роста и дифференцировки клеток. Протеолиз N-конца МАРКК под влиянием ЛФ блокирует сигналы необходимые для активации и рекрутинга других иммунных клеток с целью уничтожения возбудителя инфекции. Гибель клеток макрофагального звена может происходить как через МКК (Protein Kinase Kinase)-зависимые, так и с МКК-независимые механизмы. Механизм цитотоксичности определяется особенностями клеточной культуры и наличием или отсутствием воспалительных стимулов.

Отечный фактор является кальмодулин-зависимой аденилатциклазой молекулярной массой 89 kDa. Уровень активности аденилатциклазы ОФ примерно в 1000 раз выше, чем уровень активности аденилатциклазы млекопитающих. Используя кальмодулин и АТФ эукариотических клеток, отечный фактор повышает в них концентрацию цАМФ. За счет увеличения концентрации цАМФ развивается отек в очаге инфекции и подавляется хемотаксис нейтрофилов. С увеличением уровня клеточного цАМФ нарушается водный баланс, что препятствует нормальному функционированию сигнальных каскадов в клетке. Отечный фактор состоит из N-концевого ПА-связывающего домена, центрального каталитического домена и C-концевого спирального домена (рис. 5, III обложка). По структуре и функциям N-концевой домен гомологичен 1 домену ЛФ. Каталитический домен структурно сходен с доменами других аденилатциклаз бактериальных токсинов (например, токсинов *Bordetella pertussis* СуаА, *Pseudomonas aeruginosa* ExoY). Спиральный домен ОФ располагается напротив каталитического домена в инактивированном состоянии. Кальмодулин, встраиваясь между спиральным и каталитическим доменами ОФ, раздвигает их, что приводит к повороту одного домена относительно другого примерно на 30 градусов. Такое взаимодействие между

кальмодулином и ферментом приводит к активации ОФ за счет конформационных изменений в линкере, соединяющем каталитический и спиральный домены [31].

Разработка антитоксических препаратов с учетом механизмов проникновения энзиматических единиц токсина в цитозоль клетки

Для получения эффективного антитоксического препарата необходимо учитывать ключевые звенья механизма действия токсина. Принимая во внимание механизмы активации сибиреязвенного токсина становится понятным, что потенциальные антитоксические препараты должны ингибировать: 1) связывание ПА с рецептором клетки; 2) активность внеклеточного фурина, разрезающего ПА на две части массой 20 и 63 kDa; 3) образование олигомерной препоры из мономеров ПА массой 63 kDa; 4) связывание ЛФ или ОФ с ПА; 5) эндоцитоз токсина; 6) превращение олигомерных ПА препор в истинные поры; 7) транслокацию из эндосом ЛФ или ОФ; 8) ферментативную активность ЛФ и ОФ (рис. 6, III обложка) [31].

Разработка препаратов, способных нейтрализовать токсины сибирской язвы, проводится по нескольким направлениям. Одним из подходов к разработке пептидных ингибиторов металлопротеиназы ЛФ является конъюгирование хелатирующих групп металлов с пептидными субстратами, обеспечивающее высокое сродство к активному сайту протеазы. Другим вариантом разработки антитоксических препаратов является проведение скрининга низкомолекулярных органических соединений с целью выявления ингибиторов сибиреязвенных токсинов, эффективность которых улучшают в дальнейшем методами комбинаторной химии [13]. Еще одним направлением является получение моноклональных антител, способных нейтрализовать токсины *B. anthracis*, поиск которых проводят с использованием технологии фагового дисплея [14].

К настоящему времени получено большое количество химерных и гуманизированных моноклональных антител, способных нейтрализовать токсины *B. anthracis*. Действие разработанных моноклональных антител направлено против разных антигенов (ПА, ЛФ, ОФ) и против разных антигенных доменов токсинов. Эпитопная специфичность моноклонального антитела определяет его способность ингибировать ЛТ на этапе сборки, межрецепторных взаимодействий ПА и клетки-мишени, транслокации или проявления ферментативной активности ОФ или ЛФ.

Набольшее количество работ связано с получением антител против ПА *B. anthracis*. Это объясняется тем, что ЛФ и ОФ без ПА не способны проявлять токсический эффект. Кроме того, именно связывание ПА с рецепторами на поверхности эукариотической клетки (TEM8/ANTXR1, CMG2/ANTXR2) является первым событием многоэтапного внутриклеточного проникновения токсина сибирской язвы. Поэтому препараты, ингибирующие межрецепторные взаимодействия ПА с рецепторами эукариотической клетки, будут, вероятно, проявлять особо выраженную эффективность при терапии на ранних стадиях инфекции. Значительная доля ПА связывается с CMG2 рецепторами, поэтому предполагается, что для нейтрализации сибиреязвенного токсина можно заблокировать именно их [29]. В качестве примера можно привести препарат, ингибирующий домен Ville Willebrand фактор А (vWA) сигнального пептида, в сайте которого связывается ПА. Препарат представляет собой растворимые фрагменты домена vWA CMG2 (sCMG2), ингибирующих связывание ПА-рецептора [1, 41]. Однако длительность циркуляции в организме такого рода препарата была незначительной (у крыс период полувыведения препарата всего 10 мин) [42]. Поэтому для решения этой проблемы был сконструирован слитный белок, состоящий из растворимого sCMG2 и Fc-фрагмента человеческого иммуноглобулина — CMG2-Fc, что позволило увеличить период полувыведения препарата до 30 ч [26]. На наш взгляд такого времени циркулирования препарата также недостаточно, однако он может использоваться в целях экстренной профилактики.

На начальных этапах сборки токсина сибирской язвы за счет проявления активности фуриноподобных ферментов происходит отрезание части 1 домена ПА, что запускает следующий этап — сборку препоры. Для ингибирования этого процесса можно получить антитела, блокирующие сайт, на который направлено действие фуриноподобных ферментов. Кроме того, для блокирования сборки токсина можно использовать химические вещества. Например, ярко выраженным ингибирующим действием на фурин обладает 4-гуанидинометилфенил-Arg-Tle-Arg-4-амидинобензиламид (MI-1148). В присутствии ингибиторов фурина значительный защитный эффект наблюдается не только против токсина сибирской язвы, но также и против дифтерийного токсина [17], так как оба токсина имеют схожие стадии проникновения в цитозоль. Возможно ингибирование фурина и является многообещающей стратегией лечения, но, вероятно, только острых инфекционных заболеваний и только в начальном периоде.

Еще одна из стратегий, направленных на ингибирование сборки сибиреязвенных токсинов заключается в ингибировании олигомеризации ПА₆₃. Путем имитации ключевых остатков ПА₆₃, необходимых для межмолекулярных взаимодействий, стабилизирующих гептамер, были синтезированы молекулярные соединения SAVEAT, способные ингибировать олигомеризацию ПА₆₃ и, в итоге, снижать токсичность ЛТ и ОТ [38].

Для ингибирования следующего этапа сборки токсинов — транслокации ЛФ или ОФ сибирской язвы в цитозоль клетки — было получено химерное моноклональное антитело против ПА — sAb29, продуцируемое в генетически модифицированных клетках CHO. Химерное моноклональное антитело sAb29 способно связываться с мономерной или гептамерной формой ПА, предотвращая образование трансмембранной поры ПА. Связывание sAb29 с препорой предотвращает ее переход в истинную пору внутри эндосомы при понижении pH среды, тем самым ингибируя процесс транслокации ЛФ или ОФ в цитоплазму эукариотической клетки. В экспериментах на кроликах было показано, что введение антител sAb29 через 12 ч после заражения *B. anthracis* оказывало терапевтический эффект и все животные выживали [33]. Особенно эффективными оказались антитела к домену 1 ЛФ, способные ингибировать связывание ЛФ и ПА и прохождение в цитозоль ЛФ [10].

Для повышения эффективности моноклональных антител в лечении сибиреязвенной инфекции были проведены эксперименты с использованием коктейля антител против разных эпитопов и разных антигенов *B. anthracis*. Пассивная иммунизация антикапсульными моноклональными антителами защищала животных от инфекции даже при условии введения антител через 20 ч после заражения спорами *B. anthracis* [5].

Активные работы по получению токсин-нейтрализующих моноклональных антител позволили получить препарат Raxibasumab, который в 2012 г. был утвержден FDA в качестве препарата для лечения легочной формы сибирской язвы в сочетании с противомикробными средствами. Raxibasumab является полностью гуманизированным моноклональным антителом к ПА, предотвращающим связывание ПА с клеточным рецептором. Эффективность Raxibasumab (ABthrax) проявляется только на начальных стадиях инфекции, когда ПА находится в растворимой форме, то есть до олигомеризации ПА [25]. Лечебный эффект Raxibasumab был показан на обезьянах, однократное введение препарата которым увеличивало выживаемость до 64% при аэрозольном заражении сибирской

язвой [40]. Безопасность Raxibacumab для людей была подтверждена в клинических испытаниях на 326 здоровых добровольцах. Естественно, тестирование препарата на эффективность у людей не проводилось.

Obiltoxaximab (Anthem[®], ETI-204) является еще одним моноклональным антителом, утвержденным в 2016 г. FDA для профилактики и лечения ингаляционной сибирской язвы. Anthem имеет молекулярную массу около 148 kDa и представляет собой химерное моноклональное антитело к каппа-цепи IgG1 (mAb), которое связывает ПА-компонент токсина *B. anthracis* [15].

Для лечения сибирской язвы в комбинации с антибиотиками используется иммуноглобулин человека «Anthraxil», полученный у доноров, иммунизированных BioThrax (адсорбированной вакциной против сибирской язвы), из плазмы крови с последующей очисткой [12, 19]. По всей видимости, благодаря присутствию антител, способных реагировать с различными эпитопами ПА, такой препарат может ингибировать токсин даже после этапа связывания ПА с рецептором эукариотической клетки.

Получено большое количество гуманизированных и химерных антител против ЛФ. В качестве особо перспективного препарата себя зарекомендовали моноклональные антитела против 1 домена ЛФ, так как они могут ингибировать связывание ПА и ЛФ и таким образом препятствовать проявлению токсического действия. Например, моноклональное антитело IQNLF является полностью человеческим и направлено против 1 домена ЛФ [2]. В экспериментах на мышах было показано, что однократная иммунизация IQNLF в дозе 180 мкг/мышь защищала всех мышей линии A/J от заражения спорами *B. anthracis* Sterne в дозе 24 LD₅₀ [2]. Получены химерные моноклональные антитела шимпанзе/человек LF10E и LF11H также направлены против 1 домена ЛФ, однако результаты исследований показали, что эти антитела не ингибируют связывание с ПА. Тем не менее, LF10E и LF11H обеспечивают 100% защиту крыс Fischer 344 от действия ЛТ [6].

Полученных моноклональных антител против ОФ мало. Это связано, вероятно, с тем, что ОФ в меньшей степени обуславливает летальный эффект. Одним из косвенных тому подтверждений результаты сравнительных исследований способности нейтрализовать ОФ антителами, находящимися в сыворотках доноров, вакцинированных американской вакциной (anthrax vaccine adsorbed — AVA) или английской вакциной (anthrax vaccine precipitated — AVP). AVA представляет собой бесклеточный фильтрат акапсулярного, токсигенного штам-

ма *B. anthracis* V770-NP1-R, который адсорбируется на гидроксиде алюминия, содержит ПА и только следовые количества антигенов ЛФ и ОФ. Вакцина AVP состоит из бесклеточного фильтрата акапсулярного, токсигенного штамма *B. anthracis* Sterne 34F2, который осаждается сульфатом алюминия (Alum). В отличие от вакцины AVA, AVP содержит все три компонента токсина: ПА, ЛФ и ОФ. Анализ антител в сыворотке крови показал, что у доноров, вакцинированных AVP, уровень антител к ОФ был значительно выше, чем у доноров, вакцинированных AVA. Однако антитела сыворотки крови этих двух групп доноров нейтрализовывали ОТ с одинаковой выраженностью. На этом основании был сделан вывод, что решающая роль в нейтрализации ОФ принадлежит ПА [14].

Несмотря на имеющиеся для профилактики и лечения препараты, направленные на ингибирование токсинов сибирской язвы, продолжение работ в этом направлении необходимо. Raxibacumab и Anthem имеют ряд недостатков. Препараты не способны проникать через гематоэнцефалический барьер, а значит не могут быть использованы для лечения менингеальной формы сибирской язвы, которая часто развивается на поздней стадии инфекции. Побочные эффекты Anthem могут проявляться в виде реакций гиперчувствительности и анафилаксии, поэтому препарат рекомендуется использовать только в случае крайней необходимости. Побочные эффекты Raxibacumab также могут проявляться в виде аллергических реакций. Поэтому перед применением Raxibacumab или Anthem пациентам вводят антигистаминные препараты. Оба препарата должны храниться в холодильнике (при температуре от 2 до 8°C) и не попадать под прямые солнечные лучи. Raxibacumab и Anthem вводятся внутривенно, а в случае биотеррористической атаки предпочтительным является внутримышечный путь введения препарата.

Лечение только антибиотиками эффективно в течение четырех дней после аэрогенного проникновения спор *B. anthracis*. Использование антитоксина вместе с противомикробными препаратами расширяет диапазон эффективного лечения до 1 недели после заражения *B. anthracis* [39].

В России для лечения сибирской язвы в качестве антитоксического препарата выпускается токсин сибирязвенный лошадиный, который может вызывать формирование аллергических реакций. Какие-либо другие отечественные препараты, направленные на ингибирование токсинов сибирской язвы отсутствуют.

Несмотря на большое количество исследований, посвященных получению человеческих моноклональных антител, способных

нейтрализовать летальный токсин *B. anthracis*, работы в этом направлении продолжаются. Предполагается использование моноклональных антител не только для лечения, но и для проведения специфической профилактики сибирской язвы.

Источник финансирования

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

Благодарность

Выражаем благодарность Воеводиной Нине Евгеньевне и Щербаковой Анастасии Николаевне за оказание технической поддержки.

Список литературы/References

1. Abrami L., Leppla S.H., van der Goot F.G. Receptor palmitoylation and ubiquitination regulate anthrax toxin endocytosis. *J. Cell Biol.*, 2006, vol. 172, no. 2, pp. 309–320. doi: 10.1083/jcb.200507067
2. Albrecht M.T., Li H., Williamson E.D., LeButt C.S., Flick-Smith H.C., Quinn C.P., Westra H., Galloway D., Mateczun A., Goldman S. Human monoclonal antibodies against anthrax lethal factor and protective antigen act independently to protect against *Bacillus anthracis* infection and enhance endogenous immunity to anthrax. *Infect. Immun.*, 2007, vol. 75, pp. 5425–5433.
3. Benjamin E. Manipulation of host signalling pathways by anthrax toxins. *Turk. Biochem. J.*, 2007, vol. 402, no. 3, pp. 405–417.
4. Chen K.H., Liu S., Leysath C.E., Miller-Randolph S., Zhang Y., Fattah R., Bugge T.H., Leppla S.H. Anthrax toxin protective antigen variants that selectively utilize either the CMG2 or TEM8 receptors for cellular uptake and tumor targeting. *J. Biol. Chem.*, 2016, vol. 291, no. 42, pp. 22021–22029.
5. Chen Z., Moayeri M., Crown D., Emerson S., Gorshkova I., Schuck P., Leppla S.H., Purcell R.H. Novel chimpanzee/human monoclonal antibodies that neutralize anthrax lethal factor, and evidence for possible synergy with anti-protective antigen antibody. *Infect. Immun.*, 2009, vol. 77, pp. 3902–3908. doi: 10.1128/IAI.00200-09
6. Chen Z., Moayeri M., Purcell R. Monoclonal antibody therapies against anthrax. *Toxins*, 2011, vol. 3, pp. 1004–1019. doi: 10.3390/toxins3081004
7. Das D., Krantz B.A. Secondary structure preferences of the anthrax toxin protective antigen translocase. *J. Mol. Biol.*, 2017, vol. 429, no. 5, pp. 753–762. doi: 10.1016/j.jmb.2017.01.015
8. Deu E. Proteases as antimalarial targets: strategies for genetic, chemical, and therapeutic validation. *FEBS J.*, 2017, vol. 284, no. 16, pp. 2604–2628. doi: 10.1111/febs.14130
9. Dixon T.C., Meselson M., Guillemin J., Hanna P.C. Anthrax. *N. Engl. J. Med.*, 1999, vol. 341, no. 11, pp. 815–826.
10. Dumas E.K., Garman L., Cuthbertson H., Charlton S., Hallis B., Engler R.J.M., Choudhari S., Picking W.D., James J.A., Farris A.D. Lethal factor antibodies contribute to lethal toxin neutralization in recipients of anthrax vaccine precipitated. *Vaccine*, 2017, vol. 35, no. 26, pp. 3416–3422. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.05.006
11. Fabre L., Santelli E., Mountassif D., Donoghue A., Biswas A., Blunck R., Hanein D., Volkmann N., Liddington R., Rouiller I. Structure of anthrax lethal toxin prepore complex suggests a pathway for efficient cell entry. *J. Gen. Physiol.*, 2016, vol. 148, no. 4, pp. 313–324. doi: 10.1085/jgp.201611617
12. Glinert I., Bar-David E., Sittner A., Weiss S., Schlomovitz J., Ben-Shmuel A., Mechaly A., Altboum Z., Kobiler D., Levy H. Revisiting the concept of targeting only *Bacillus anthracis* toxins as a treatment for anthrax. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2016, vol. 60, no. 8, pp. 4878–4885. doi: 10.1128/AAC.00546-16
13. Goldberg A.B., Turk B.E. Inhibitors of the metalloproteinase anthrax lethal factor. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2016, vol. 16, no. 21, pp. 2350–2358.
14. Goldstein J.M., Lee J., Tang X., Boyer A.E., Barr J.R., Bagarozzi D.A. Jr, Quinn C.P. Phage display analysis of monoclonal antibody binding to anthrax toxin lethal factor. *Toxins (Basel)*, 2017, vol. 9, no. 7, pp. 221. doi: 10.3390/toxins9070221
15. Greig S.L. Obiltoxaximab: first global approval. *Drugs*, 2016, vol. 76, no. 7, pp. 823–830. doi: 10.1007/s40265-016-0577-0
16. Greither T., Wedler A., Rot S., Keßler J., Kehlen A., Holzhausen H.J., Bache M., Würfl P., Taubert H., Kappler M. CMG2 expression is an independent prognostic factor for soft tissue sarcoma patients. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, vol. 18, no. 12: E2648. doi: 10.3390/ijms18122648
17. Harges K., Becker G.L., Lu Y., Dahms S.O., Köhler S., Beyer W., Sandvig K., Yamamoto H., Lindberg I., Walz L., von Messling V., Than M.E., Garten W., Steinmetzer T. Novel furin inhibitors with potent anti-infectious activity. *Chem. Med. Chem.*, 2015, vol. 10, no. 7, pp. 1218–1231. doi: 10.1002/cmdc.201500103
18. Hu K., Olsen B.R., Besschetnova T.Y. Cell autonomous ANTXR1-mediated regulation of extracellular matrix components in primary fibroblasts. *Matrix Biol.*, 2017, vol. 62, pp. 105–114. doi: 10.1016/j.matbio.2016
19. Huang E., Pillai S.K., Bower W.A., Hendricks K.A., Guarnizo J.T., Hoyle J.D., Gorman S.E., Boyer A.E., Quinn C.P., Meaney-Delman D. Antitoxin treatment of inhalation anthrax: a systematic review. *Health Secur.*, 2015, vol. 13, no. 6, pp. 365–377. doi: 10.1089/hs.2015.0032
20. Hughes J.M., Gerberding J.L. Anthrax bioterrorism: lessons learned and future directions. *Emerg. Infect. Dis.*, 2002, vol. 8, no. 10, pp. 1013–1014. doi: 10.3201/eid0810.020466
21. Jeong S.Y., Martchenko M., Cohen S.N. Calpain-dependent cytoskeletal rearrangement exploited for anthrax toxin endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013, vol. 110, no. 42: E4007–E4015. doi: 10.1073/pnas.1316852110
22. Jia Z., Ackroyd C., Han T., Agrawal V., Liu Y., Christensen K., Dominy B. Effects from metal ion in tumor endothelial marker 8 and anthrax protective antigen: BioLayer Interferometry experiment and molecular dynamics simulation study. *J. Comput. Chem.*, 2017, vol. 38, no. 15, pp. 1183–1190. doi: 10.1002/jcc.24768

23. Jiang J., Pentelute B.L., Collier R.J., Zhou Z.H. Atomic structure of anthrax protective antigen pore elucidates toxin translocation. *Nature*, 2015, vol. 521, no 7553, pp. 545–549.
24. Krantz B.A. Anthrax lethal toxin co-complexes are stabilized by contacts between adjacent lethal factors. *J. Gen. Physiol.*, 2016, vol. 148, no. 4, pp. 273–275. doi: 10.1085/jgp.201611681
25. Kummerfeldt E.C. Raxibacumab: potential role in the treatment of inhalational anthrax. *Infect. Drug Resist.*, 2014, pp. 101–110. doi: 10.2147/IDR.S47305
26. Li L., Guo Q., Liu J., Zhang J., Yin Y., Dong D., Fu L., Xu J., Chen W. Recombinant HSA-CMG2 is a promising anthrax toxin inhibitor. *Toxins (Basel)*, 2016, vol. 8, no. 1: E28. doi: 10.3390/toxins8010028
27. Little S.F., Novak J.M., Lowe J.R., Leppla S.H., Singh Y., Klimpel K.R., Lidgerding B.C., Friedlander A.M. Characterization of lethal factor binding and cell receptor binding domains of protective antigen of *Bacillus anthracis* using monoclonal antibodies. *Microbiology*, 1996, vol. 142, pp. 707–715.
28. Liu C.C., Kanekiyo T., Roth B., Bu G. Tyrosine-based signal mediates LRP6 receptor endocytosis and desensitization of Wnt/ β -catenin pathway signaling. *J. Biol. Chem.*, 2014, vol. 289, no. 40, pp. 27562–27570. doi: 10.1074/jbc.M113.533927
29. Liu S., Zhang Y., Hoover B., Leppla S.H. The receptors that mediate the direct lethality of anthrax toxin. *Toxins (Basel)*, 2012, vol. 5, no. 1, pp. 1–8. doi: 10.3390/toxins5010001
30. Machen A.J., Akkaladevi N., Trecuzzi C., O’Neil P.T., Mukherjee S., Qi Y., Dillard R., Im W., Gogol E.P., White T.A., Fisher M.T. Asymmetric Cryo-EM Structure of Anthrax Toxin Protective Antigen Pore with Lethal Factor N-Terminal Domain. *Toxins (Basel)*, 2017, vol. 9, no. 10: E298. doi: 10.3390/toxins9100298
31. Maize K.M., Kurbanov E.K., De La Mora-Rey T., Geders T.W., Hwang D.J., Walters M.A., Johnson R.L., Amin E.A., Finzel B.C. Anthrax toxin lethal factor domain 3 is highly mobile and responsive to ligand binding. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 2014, vol. 70 (Pt. 11), pp. 2813–2822. doi: 10.1107/S1399004714018161
32. Martchenko M., Jeong S.Y., Cohen S.N. Heterodimeric integrin complexes containing β 1-integrin promote internalization and lethality of anthrax toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, vol. 107, no. 35, pp. 15583–15588. doi: 10.1073/pnas.1010145107
33. Mechaly A., Levy H., Epstein E., Rosenfeld R., Marcus H., Ben-Arie E. A novel mechanism for antibody – based anthrax toxin neutralization: inhibition of prepore-to-pore conversion. *J. Biol. Chem.*, 2012, vol. 287, no. 39, pp. 32665–32673. doi: 10.1074/jbc.M112.400473
34. Mogridge J., Cunningham K., Lacy D.B., Mourez M., Collier R.J. The lethal and edema factors of anthrax toxin bind only to oligomeric forms of the protective antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, vol. 99, no. 10, pp. 7045–7048. doi: 10.1073/pnas.052160199
35. Nestorovich E.M., Bezrukov S.M. Designing inhibitors of anthrax toxin. *Expert Opin. Drug. Discov.*, 2014, vol. 9, no. 3, pp. 299–318. doi: 10.1517/17460441.2014.877884
36. Petosa C., Collier R.J., Klimpel K.R., Leppla S.H., Liddington R.C. Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen. *Nature*, 1997, vol. 385, no. 6619, pp. 833–838.
37. Rawlings N.D. Bacterial calpains and the evolution of the calpain (C2) family of peptidases. *Biol. Direct.*, 2015, vol. 10, p. 66. doi: 10.1186/s13062-015-0095-0
38. Rubert Pérez C., López-Pérez D., Chmielewski J., Lipton M. Small molecule inhibitors of anthrax toxin-induced cytotoxicity targeted against protective antigen. *Chem. Biol. Drug Des.*, 2012, vol. 79, no. 3, pp. 260–269. doi: 10.1111/j.1747-0285.2011.01285.x
39. Rubinson L., Corey A., Hanfling D. Estimation of time period for effective human inhalational anthrax treatment including anti-toxin therapy. *PLoS Curr.*, 2017, vol. 9. doi: 10.1371/currents.outbreaks.7896c43f69838f17ce1c2c372e79d55d
40. Schneemann A., Manchester M. Anti-toxin antibodies in prophylaxis and treatment of inhalation anthrax. *Future Microbiol.*, 2009, vol. 4, pp. 35–43. doi: 10.2217/17460913.4.1.35
41. Scobie H.M., Thomas D., Marlett J.M., Destito G., Wigelsworth D.J., Collier R.J., Young J.A., Manchester M. A soluble receptor decoy protects rats against anthrax lethal toxin challenge. *J. Infect. Dis.*, 2005, vol. 192, no. 6, pp. 1047–1051.
42. Thomas D., Naughton J., Cote C., Welkos S., Manchester M., Young J.A. Delayed toxicity associated with soluble anthrax toxin receptor decoy-Ig fusion protein treatment. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 4: e34611. doi: 10.1371/journal.pone.0034611
43. Van der Goot G., Young J.A. Receptors of anthrax toxin and cell entry. *Mol. Aspects Med.*, 2009, vol. 30, no. 6, pp. 406–412. doi: 10.1016/j.mam.2009.08.007
44. Zakowska D., Bartoszcze M., Niemcewicz M., Bielawska-Drózd A., Kocik J. New aspects of the infection mechanisms of *Bacillus anthracis*. *Ann. Agric. Environ. Med.*, 2012, vol. 19, no. 4, pp. 613–618.

Авторы:

Фирстова В.В., д.б.н., главный научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Московская область, Россия;
Шемякин И.Г., д.б.н., профессор, зам. директора по науке ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Московская область, Россия
Дятлов И.А., академик РАН, профессор, д.м.н., директор ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Московская область, Россия.

Authors:

Firstova V.V., PhD, MD (Biology), Head Researcher of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation,
Shemyakin I.G., PhD, MD (Biology), Professor, Deputy Director for Science, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation,
Dyatlov I.A., RAS Full Member, PhD, MD (Medicine), Professor, Director, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation.

Поступила в редакцию 25.07.2018
 Отправлена на доработку 04.03.2019
 Принята к печати 15.03.2019

Received 25.07.2018
 Revision received 04.03.2019
 Accepted 15.03.2019

Иллюстрации к статье «Современное понимание организации молекул токсинов сибирской язвы и подходы к блокированию их цитотоксического действия» (авторы: В.В. Фирстова, И.Г. Шемякин, И.А. Дятлов) (с. 639–647)

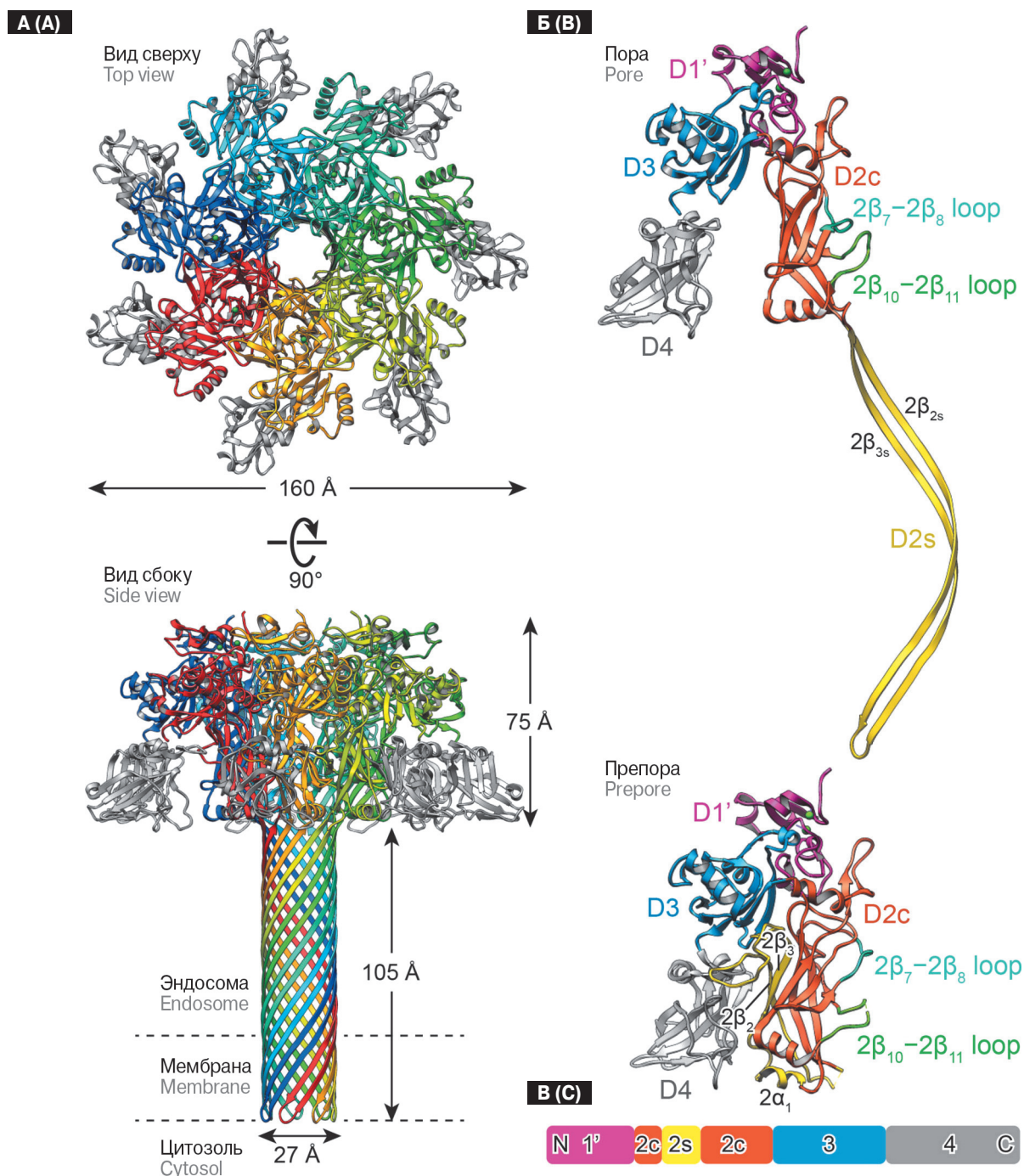


Рисунок 1. Атомная модель поры ПА [23]

Figure 1. Atomic model of PA pores [23]

А) Вид сверху и вид сбоку на атомную модель ПА изображены в виде лент. Протомеры окрашены в разные цвета, домен 4 — серый. Б) Сравнение структуры протомеров, формирующих пору и препору ПА (PDB ID: 1TZO).

Домены окрашены в разные цвета в соответствии с расшифровкой на фрагменте В. В) Домены препоры ПА.

А) Top view and side view on the PA atomic model. Protomers are colored in different colors, domain 4 is gray.

Б) Comparison of the structures of the protomers that form the PA pore and prepore (PDB ID: 1TZO).

Домены препоры ПА.

Иллюстрации к статье «Современное понимание организации молекул токсинов сибирской язвы и подходы к блокированию их цитотоксического действия» (авторы: В.В. Фирстова, И.Г. Шемякин, И.А. Дятлов) (с. 639–647)

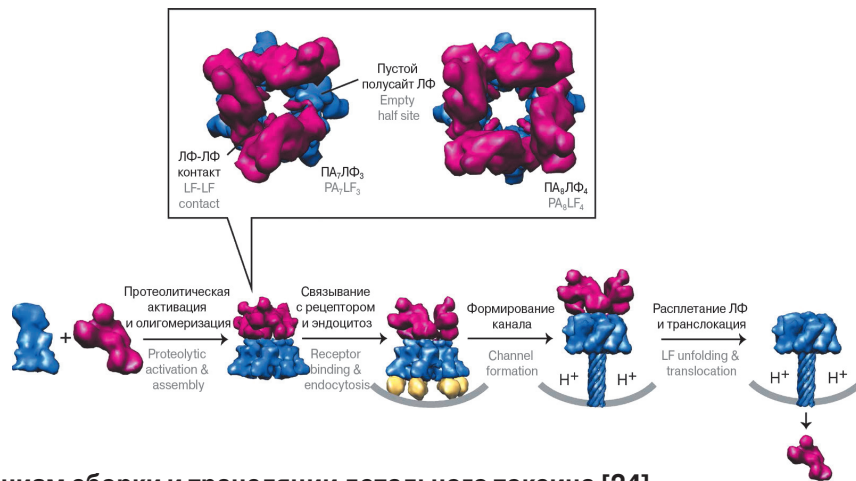


Рисунок 2. Механизм сборки и трансляции летального токсина [24]
 Figure 2. The mechanism of assembly and translation of the lethal toxin [24]

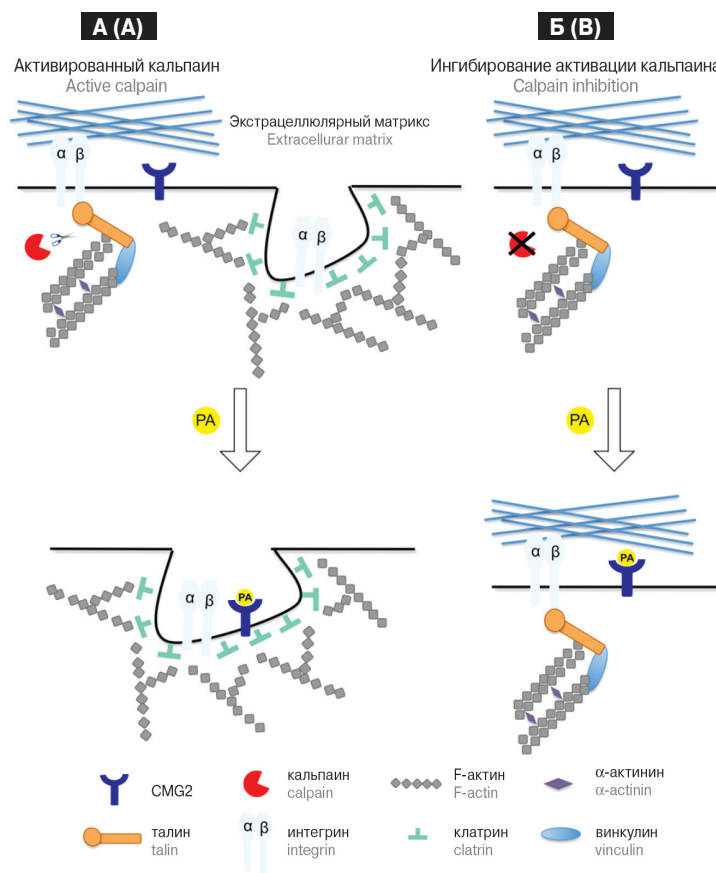


Рисунок 3. Предполагаемая модель опосредованного кальпаином эндоцитоза ПА [21]
 Figure 3. A putative model of calpain mediated endocytosis PA [21]

А) Интегриновые комплексы, такие как $\alpha 5 \beta 1$, динамически интернализируются и рециркулируют в плазматическую мембрану во время сборки и разборки комплексов фокальной адгезии на поверхности клетки. Кальпаин-опосредованное расщепление TLN1 нарушает связь между интегринными и актиновым цитоскелетом, что способствует эндоцитозу интегрин с помощью клатрин-зависимых и клатрин-независимых механизмов. Комплекс ПА/CMG2 на поверхности клетки интернализуется путем использования механизмов клатрин-зависимого эндоцитоза интегрин. Б) Ингибирование кальпаина препятствует разборке интегрин-содержащих комплексов фокальной адгезии и уменьшает индуцированную ПА интернализацию как интегрин, так и комплекса ПА/CMG2.

А) Integrin complexes, such as $\alpha 5 \beta 1$, are dynamically internalized and recycled to the plasma membrane during assembly and disassembly of focal adhesion complexes on the cell surface. Calpain-mediated cleavage of TLN1 disrupts the connection between integrins and the actin cytoskeleton, which contributes to integrin endocytosis using clathrin-dependent and clathrin-independent mechanisms. The PA/CMG2 complex on the cell surface is internalized by using the mechanisms of clathrin-dependent integrin endocytosis. Б) Inhibition of Calpain is prevents of disassembly of Integrin-Containing complexes of focal adhesion and decreases PA inducible internalisation of integrins and PA/CMG2 complex.

Иллюстрации к статье «Современное понимание организации молекул токсинов сибирской язвы и подходы к блокированию их цитотоксического действия» (авторы: В.В. Фирстова, И.Г. Шемякин, И.А. Дятлов) (с. 639–647)

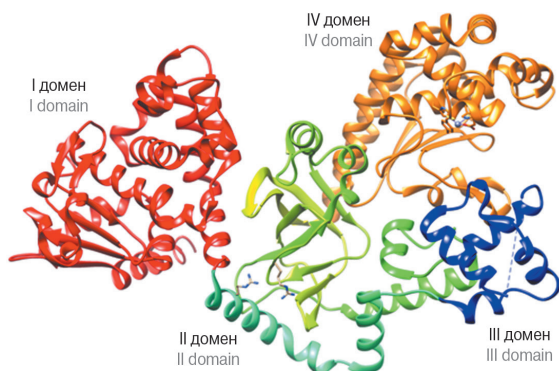


Рисунок 4. Структура ЛФ

Figure 4. LF structure

ЛФ состоит из 4 доменов. Домен 1 — сайт связывания с ПА, домен 2 — участвует в формировании истинной поры, домен 3 — участвует в олигомеризации ПА, домен 4 — каталитический центр связывания иона Zn^{2+} [13].

LF consists of 4 domains. Domain 1 — the binding site for PA, domain 2 — participates in the formation of the true pore, domain 3 — participates in oligomerization of the PA, domain 4 — catalytic binding site of the Zn^{2+} [13].

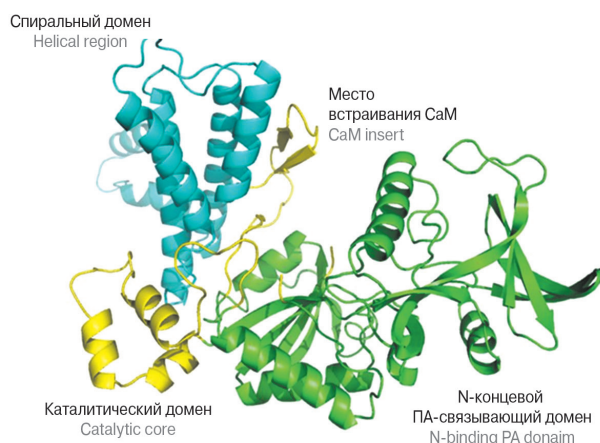


Рисунок 5. Структура ОФ [3]

Figure 5. Structure of OF [3]

ОФ состоит из N-концевого ПА-связывающего домена, центрального каталитического домена и С-концевого спирального домена. Спиральный домен располагается напротив каталитического домена в инактивированном состоянии. Кальмодулин (CaM) встраивается между этими двумя доменами.

OF consists of an N-terminal PA-binding domain, a central catalytic domain, and a C-terminal spiral domain. The spiral domain is located opposite the catalytic domain in an inactivated state. Calmodulin (CaM) inserted between these two domains.

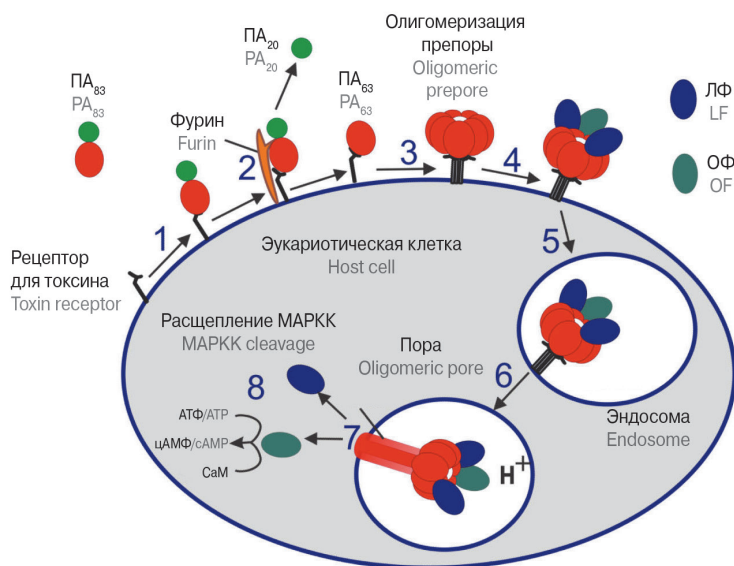


Рисунок 6. Схематическая модель сборки и проявления активности токсинов *B. anthracis* с указанием ключевых моментов, на которые должны действовать антитоксические препараты [35]

Figure 6. A schematic model of the assembly *B. anthracis* toxins and their activities, indicating the key points to which the antitoxic drugs should act [35]

Потенциальные агенты могут нацеливаться на связывание с ПА-рецептором (этап 1), ингибирование внеклеточного фурина (этап 2), предотвращение сборки олигомерной PA_{63} -препоры (этап 3), ингибирование связывания ЛФ и ОФ с ПА (этап 4), предотвращение эндоцитоза (этап 5), ингибирование превращения олигомерной формы препоры PA_{63} в истинную пору (этап 6), ингибирование ПА-опосредованного выхода ЛФ и ОФ из эндосом (этап 7), ингибирование ферментативной активности ЛФ и ОФ (этап 8).

Potential agents can aim at binding to the PA receptor (step 1), inhibiting extracellular furin (step 2), preventing the assembly of oligomeric PA_{63} prepore (step 3), inhibiting the binding of LF and OF or PA (step 4), preventing endocytosis (step 5), inhibition of the transformation of the oligomeric form of PA_{63} prepore into the true pore (step 6), inhibition LF and OF PA-mediated translocation from endosomes (step 7), inhibition of the enzymatic activity of LF and OF (step 8).