



УДК 577.112.4

МОДИФИКАЦИЯ НЕЙРОТОКСИНА RTX-III ИЗ АКТИНИИ
RADIANTHUS MACRODACTYLUS УКСУСНЫМ АНГИДРИДОМ

Махнырь В. М., Козловская Э. П.

Тихоокеанский институт биоорганической химии
Дальневосточного отделения Академии наук СССР,
Владивосток

При модификации аминогрупп токсина RTX-III из *Radianthus macrodactylus* уксусным ангидридом получены четыре моно- и четыре дипроизводных. Ацетилирование N-концевой аминогруппы приводило к падению токсичности для мышей в 12 раз. Монопроизводные токсина по остатку Lys⁴, а также двум из трех C-концевых остатков Lys были в 2 раза менее токсичны по сравнению с нативным RTX-III. Инактивация в 30–35 раз наблюдалась при модификации двух аминогрупп, одной из которых в каждом случае была N-концевая аминогруппа. По данным КД-спектрокопии, модификация остатка Lys⁴ и C-концевых остатков Lys приводила к изменению вторичной структуры RTX-III. Сделан вывод о функциональной значимости N-концевой аминогруппы.

Полипептидные нейротоксины морских анемонов селективно взаимодействуют с быстрыми натриевыми каналами электровозбудимых мембран. Действие этих токсинов направлено на воротный механизм канала и проявляется в замедлении и неполном характере его инактивации [1]. Нейротоксины, выделенные из различных видов морских анемонов, в зависимости от строения могут быть отнесены к двум структурным классам. К первому классу относятся токсины родов *Anemonia* и *Anthopleura*, гомологичные хорошо изученному токсину ATX-II из *A. sulcata* [2] (A-токсины), а ко второму — токсины родов *Radianthus* и *Stoichactis* (R-токсины) [3]. Гомология аминокислотных последовательностей среди токсинов каждого класса достигает 98%, тогда как между токсинами разных классов не превышает 40%.

Изучение функциональной важности аминогрупп проводилось ранее только для A-токсинов [2, 4–8] и главным образом для ATX-II [2, 5–8]. Опубликованные данные были получены с использованием различных подходов в оценке биологической активности модифицированного токсина и поэтому плохо поддаются обобщению. Для R-токсинов такие данные отсутствуют, тогда как они представляют несомненный интерес для решения вопроса о структурно-функциональных взаимосвязях анемонотоксинов, в котором до сих пор много неясного.

Цель настоящей работы — исследование функциональной важности аминогрупп нейротоксина RTX-III из актинии *R. macrodactylus* методом химической модификации. Среди всех выделенных из этой актинии гомологов этот токсин наиболее токсичен для мышей. Его полипептидная цепь включает 48 аминокислотных остатков и содержит три дисульфидные связи. В составе RTX-III шесть аминогрупп: α-аминогруппа Gly⁴ и ε-аминогруппы остатков Lys в положениях 4, 32, 46, 47, 48 [9].

Для получения модифицированного токсина с высокой удельной радиоактивностью меченный тритием уксусный ангидрид использовали без разбавления холодным реагентом в виде раствора в бензоле. Рассчитанное по паспортным данным соотношение белок — реагент в каждом введении составляло 1:4,5, однако его действительное значение было в несколько раз ниже. К этому выводу мы пришли, сравнивая скорость модификации и характер конечных продуктов реакции в опытах с меткой и предварительных экспериментах с немеченым реагентом. Если при использовании

Рис. 1. ВЭЖХ продуктов модификации RTX-III уксусным ангидридом на колонке Ultraras TSK CM-3SW (7,5×150 мм) в градиенте NH₄OAc. Формирование градиента из растворов А (0,01 М NH₄OAc, pH 5,0) и В (0,2 М NH₄OAc, pH 5,0). Скорость элюирования 1 мл/мин

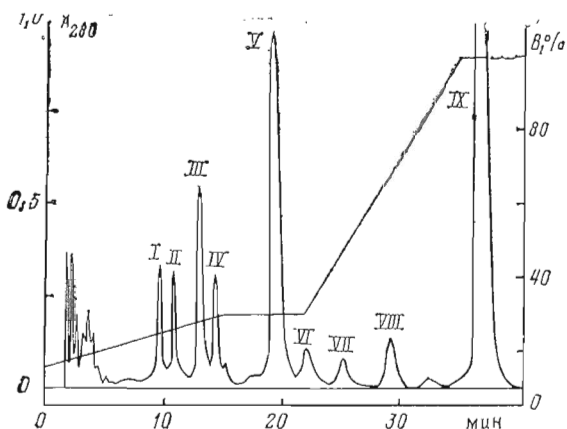


Рис. 1

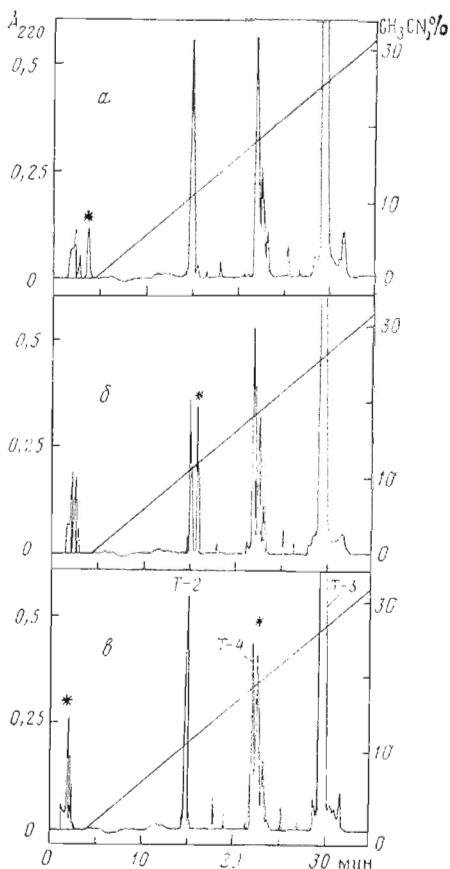


Рис. 2

холодного уксусного ангидрида оптимальным было соотношение токсин — реагент 1 : 1, то при переходе к меченому препарату для достижения аналогичного результата требовалось значительное увеличение количества уксусного ангидрида в реакционной смеси. Учитывая высокую удельную радиоактивность использованного нами уксусного ангидрида, мы объясняем это авторадиилизом реагента.

При ионообменной ВЭЖХ продуктов реакции нами были получены четыре фракции, соответствующие дипроизводным токсина (фракции I—IV, рис. 1), четыре — монопроизводным (фракции V—VIII), а также фракция IX, содержащая непрореагировавший токсин. Среди продуктов ацетилирования преобладало монопроизводное V, выход которого составил 24% от исходного количества токсина и 72% от суммарного количества монопроизводных. Выделенные продукты ацетилирования проявляли различную активность (табл. 1); степень инактивации была тем значительнее, чем раньше они элюировались с хроматографической колонки. Минимальную токсичность среди монопроизводных (в 12 раз ниже, чем у нативного RTX-III) показала фракция V. Увеличение числа модифицированных аминокетильных групп до двух сопровождалось усилением инактивации токсина (табл. 1). Исчерпывающая модификация RTX-III большим избытком уксусного ангидрида приводила к падению токсичности более чем в 100 раз.

Локализацию модифицированных остатков проводили идентификацией меченых пептидов, полученных в результате расщепления трипсином восстановленных и карбоксиметилированных [³H] ацетилпроизводных токсина. Триптические гидролизаты разделяли, используя обращенно-фазовую ВЭЖХ (рис. 2). Структуру меченого пептида определяли аминокислотным анализом (табл. 2).

Таблица 1

Характеристики продуктов ацетилирования RTX-III
(см. рис. 1)

Фракция	Степень модификации	Степень инактивации *
I	2	35
II	2	35
III	2	30
IV	2	30
V	1	12
VI	1	2
VII	1	2
VIII	1	2
IX	0	1

* Отношение значений LD₅₀ для модифицированного и нативного токсинов (опыты на мышах).

Таблица 2

Аминокислотный состав меченных тритием продуктов триптического гидролиза [³H]ацетилированных производных I — VIII (рис. 1) токсина RTX-III *

Аминокислота	I	II	III	IVa	IVб
Cys(Cm)	1,1(1)	0,9(1)	1,0(1)	1,0(1)	2,0(2)
Asp	0,9(1)	0,8(1)	0,8(1)	0,9(1)	2,8(3)
Ser					1,1(1)
Glu					0,9(1)
Pro					2,2(2)
Gly	1,2(1)	1,0(1)	1,1(1)	1,2(1)	
Ala					0,9(1)
Val					
Ile					0,7(1)
Tyr					0,9(1)
Lys	1,0(1)	1,0(1)	0,9(1)	0,9(1)	1,0(1)
Arg					

Аминокислота	V	VI	VII	VIII
Cys(Cm)	1,0(1)	2,8(3)	2,9(3)	2,2(2)
Asp	0,8(1)			2,9(3)
Ser		1,9(2)	1,9(2)	
Glu		1,0(1)	1,1(1)	1,2(1)
Pro		0,9(1)	1,0(1)	1,0(1)
Gly	1,1(1)			2,3(2)
Ala		1,9(2)	2,0(2)	
Val				1,0(1)
Ile		1,0(1)	1,0(1)	
Tyr		1,6(2)	1,7(2)	0,8(1)
Lys	1,0(1)	0,5(1) **	0,4(1) **	1,0(1)
Arg		0,9(1)	1,0(1)	1,0(1)

* В случае дипроизводных токсина I — IV, а также монопроизводных VI и VII метка была обнаружена в двух фракциях триптического гидролизата, обозначенных для производного IV как «а» и «б». Для остальных перечисленных производных в таблице приведен аминокислотный состав только одной из двух тритийсодержащих фракций, тогда как во второй был обнаружен лизин.

** Пониженное содержание лизина объясняется примесью пептида T-4 (рис. 3), не содержащего лизин.

Работа по локализации положения меченых аминокислотных остатков осложнялась частичной регенерацией аминогруппы на стадии восстановления — карбоксиметилирования. Мы предполагаем, что потеря метки происходила под действием высокой концентрации 2-меркаптоэтанола, использованного для восстановления дисульфидных связей.

При разделении продуктов триптического гидролиза фракции V (рис. 2а) метка обнаруживалась в пике, соответствующем пептиду T-1

на Антоплеурина-А связывать катионы было высказано предположение о наличии у него внутримолекулярных ионных связей между функциональными группами боковых цепей аминокислот. Такие же выводы были сделаны в результате расчетов вторичной структуры этого токсина по методу Чоу — Фасмана [12]. Аналогия в строении и вторичной структуре А- и R-токсинов позволяет предполагать существование внутримолекулярных ионных связей также у RTX-III. Такие связи могут быть фактором дополнительной стабилизации активной конформации токсина. Модификация составляющих связей остатков должна приводить к ее разрушению и, как следствие, к изменению вторичной структуры полипептида.

Таким образом, полученные результаты показывают, что, по-видимому, только N-концевая аминогруппа токсина активно участвует во взаимодействии с рецептором. Остаток Lys⁴ и два из трех C-концевых остатков лизина также необходимы для проявления токсином максимальной биологической активности, однако они играют второстепенную роль, которая, возможно, сводится к стабилизации активной конформации белка. Аргументом против непосредственного участия этих остатков во взаимодействии с рецептором на правах дополнительных центров связывания является тот факт, что они не принадлежат к консервативным остаткам А- и R-токсинов даже при наблюдаемой значительной гомологии внутри каждой группы токсинов. Вместе с тем нельзя не отметить, что распределение остатков лизина в полипептидных цепях А- и R-токсинов весьма схоже. Исключение составляет Lys⁴, который отсутствует у первой группы токсинов. В этой связи, на наш взгляд, в настоящее время нельзя категорически отвергать возможность участия аминогрупп этих остатков в полярных взаимодействиях с рецептором. Для окончательного решения этого вопроса необходимы дальнейшие исследования.

Экспериментальная часть

В работе использовали ТРСК-трипсин (Worthington, Biochemical, США), 5-диметиламино-1-нафталинсульфенилхлорид (дансилхлорид) (Serva, ФРГ), 2-меркаптоэтанол (Loba Chemie), моноодуксусную кислоту марки ч., дважды перекристаллизованную, Полихром-1 (Союзреактив), [³H]уксусный ангидрид (6,8 ТБк/моль, 10,8 г/л, Изотоп). Для приготовления растворов применялась дважды перегнанная в стекле вода.

Токсин RTX-III был выделен по методу [13]. Его гомогенность была доказана ВЭЖХ, аминокислотным анализом и анализом N-концевой аминокислоты.

Концентрацию белка определяли по методу Лоури и спектрофотометрически ($\epsilon_{278} = 10\,700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$).

Летальную дозу (LD₅₀) определяли внутрибрюшинной инъекцией препаратов мышам весом 20–22 г по методу [14].

Аминокислотный анализ проводили на анализаторе Biotronic LC 2000 после гидролиза образцов в 6 н. HCl в течение 24 ч при 108° С.

Для снятия КД-спектров использовали спектрополяриметр J500A (Jasco, Япония).

Модификация RTX-III уксусным ангидридом. К 13 мг (2,5 мкмоль) токсина в 4 мл полунасыщенного ацетата натрия, pH 8,8, содержащего для улучшения растворимости белка 15% этанола, при перемешивании добавляли 110 мкл (80 МБк) раствора [³H]уксусного ангидрида в бензоле. Реакционную смесь инкубировали на ледяной бане 1ч, после чего внесли такую же порцию реагента. Через 2 ч после начала реакции раствор наносили на колонку (10×150 мм) с Полихромом, уравновешенным водой, для обессоливания. После промывки колонки водой белок элюировали 60% этанолом. Белковую фракцию лиофилизировали и хроматографировали на колонке Ultropac TSK CM-3SW LKB (рис. 1). Степень модификации определяли по радиоактивности модифицированного белка.

Получение триптических пептидов модифицированного RTX-III. Для восстановления дисульфидных связей 100–400 мкг каждого из производных токсина инкубировали 5 ч в 1,5 мл буфере (0,4 М трис-HCl, pH 8,0;

8 М мочевины, 0,2 мМ EDTA), содержащего 25 мкл 2-меркаптоэтанола, после чего вносили 100 мг моноiodуксусной кислоты в 115 мкл воды, нейтрализованной NaOH до pH 8,0. Карбоксиметилировали 40 мин, затем белок обессоливали на колонке (0,8×50 мм) с Полихромом, как описано выше, и лиофилизовали.

Леофилизат растворяли в 0,2 мл 0,05 М натрий-фосфатного буфера, pH 8,0, добавляли раствор трипсина в воде (1 : 50 по весу) и инкубировали 5 ч при 37° С с последующим замораживанием и лиофилизацией. Полученную смесь триптических пептидов разделяли ВЭЖХ на колонке (4,6×250 мм) Ultrasphere ODS (рис. 2).

Для счета трития использовали сцинтиллятор состава: 1 л сцинтилляционной жидкости ЖС-1, 333 мл Тритона X-100.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Catterall W. A.* // Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1980. V. 20. P. 15-43.
2. *Barhanin J., Hugues M., Schweitz H., Vincent J.-P., Lazdunski M.* // J. Biol. Chem. 1981. V. 256. № 11. P. 5764-5769.
3. *Зыкова Т. А., Козловская Э. П., Еляков Г. Б.* // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 11. С. 1489-1494.
4. *Newcomb R., Yasunobu K. T., Seriguchi D. G., Norton T. R.* // Frontiers in Protein Chemistry/Eds Liu T. Y., Mamiya G., Yasunobu K. T. N. Y.: Elsevier Press, 1980. P. 539-550.
5. *Rack M., Meves H., Beress L., Grünhagen H. H.* // Toxicon. 1983. V. 21. № 2. P. 231-237.
6. *Rack M., Waschow C.* // Toxins as Tools in Neurochemistry/Eds Hucho F., Ovchinnikov Y. A. B.; N. Y.: Walter de Gruyter, 1983. P. 279-289.
7. *Rack M.* // Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 1984. B. 365. S. 1046.
8. *Rack M., Isenberg G.* // Toxicon. 1986. V. 24. № 9. P. 923-931.
9. *Зыкова Т. А., Винокуров Л. М., Козловская Э. П., Еляков Г. Б.* // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 3. С. 302-310.
10. *Набиуллин А. А., Одиноков С. Е., Вожжова Е. И., Козловская Э. П., Еляков Г. Б.* // Биоорган. химия. 1982. Т. 8. № 12. С. 1644-1648.
11. *Norton R. S., Norton T. R.* // J. Biol. Chem. 1979. V. 254. № 20. P. 10220-10226.
12. *Nabiullin A. A., Odnokov S. E., Kozlovskaya E. P., Elyakov G. B.* // FEBS Lett. 1982. V. 141. № 1. P. 124-127.
13. *Beress L., Beress R., Wunderer G.* // Toxicon. 1975. V. 13. № 5. P. 359-367.
14. *Miranda F., Kupryan C., Rochat H., Rochat C., Lissitzky S.* // Eur. J. Biochem. 1970. V. 16. P. 514-523.

Поступила в редакцию
4.X.1988

MODIFICATION OF NEUROTOXIN RTX-III FROM THE SEA ANEMONE *RADIANTHUS MACRODACTYLUS* WITH ACETIC ANHYDRIDE

MAHNIR V. M., KOZLOVSKAYA E. P.

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry,
Far-Eastern Division,
Academy of Sciences of the USSR, Vladivostok*

Upon modification of neurotoxin RTX-III at amino groups with [³H]acetic anhydride, four monoacetyl and four diacetyl derivatives have been obtained. Acetylation of the N-terminal amino group led to 12-fold decrease of toxicity in mice. Monoderivatives of the toxin with either Lys⁴ or two out of three C-terminal Lys residues modified showed a 2-fold drop in toxicity as compared with the native RTX-III. Diacetylation caused a 30 to 35-fold decrease in toxicity, the N-terminal amino group being modified in all the derivatives. As assessed by circular dichroism method, the modification of amino groups, except for N-terminal one, affected secondary structure of the toxin. The data suggest the N-terminal amino group to be essential for toxicity of RTX-III.