



УДК 577.112:593.65

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ЦИТОЛИЗИНОВ МОРСКОЙ АКТИНИИ *Radianthus macrodactylus*

© 1999 г. М. М. Монастырская[#], Т. А. Зыкова, Э. П. КозловскаяТихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН,
690022, Владивосток, просп. 100-летия Владивостока, 159

Поступила в редакцию 25.01.99 г. Принята к печати 18.03.99 г.

Из тропической актинии *Radianthus macrodactylus* выделены и охарактеризованы три цитолитических токсина, названные RTX-A, RTX-S, RTX-G. Схема очистки включает гидрофобную хроматографию на полихrome-1, статическую хроматографию на целлюлозе CM-23, гель-фильтрацию на Akrilex P-4, ионообменную хроматографию на целлюлозе CM-32, ионообменную и обращенно-фазовую ВЭЖХ на колонках Ultropac TSK CM-3SW и Силасорб C₁₈, соответственно. Молекулярная масса цитолизиннов *Radianthus* по данным SDS-электрофореза в градиенте плотности ПААГ составляет 20 кДа. Цитолизинны – высокоосновные полипептиды (pI 9.8 для RTX-A и RTX-S и 10.5 для RTX-G). Для них характерны близкий аминокислотный состав, высокое содержание основных и гидрофобных аминокислот и отсутствие остатков цистеина. Гемолитическая активность цитолизиннов *Radianthus* соответствует 3.5, 5.0 и 1.0 10⁴ HU/мг для RTX-A, RTX-S и RTX-G. Их действие на эритроцитарную мембрану ингибируется экзогенным сфингомиелином. Определена аминокислотная последовательность N-концевого фрагмента RTX-A: ALAGAIAGAGL/KGLKI/FLIEVLGEG--V/NKVKI-.

Ключевые слова: морские актинии; цитолизинны; гемолитическая активность; структура; функция.

ВВЕДЕНИЕ

Морские актинии продуцируют большую группу биологически активных соединений, важное место среди которых занимают нейротоксины белковой природы [1–3]. Нейротоксины, полипептиды с молекулярной массой 3–6 кДа, специфически взаимодействуют с натриевыми каналами электровозбудимых мембран [4].

К настоящему времени из актиний выделено и охарактеризовано около 30 высокомолекулярных цитолитических токсинов (15–20 кДа), которые представляют собой уникальный по биологической активности и биохимическим характеристикам класс животных токсинов. Их литическое действие на различные клетки эукариот проявляется на мембранном уровне [2]. Отличительным свойством цитолизиннов актиний является ингибирование их действия экзогенным сфингомиелином [5]. Исключение составляет метридиозин (M 80 кДа) из актинии *Metridium senile*, действие которого ингибируется холестерином [6, 7]. Цитолизинны морских актиний, как и другие зоотоксины белковой природы, широко используются в исследовании молекулярной организации и механизмов функционирования биологических и модельных мембран [8, 9].

Цель данной работы – выделение и изучение физико-химических характеристик трех цитолитических токсинов из широко распространенной в Индийском океане актинии *Radianthus macrodactylus*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Обычно для выделения цитолизиннов из морских актиний используют схемы, включающие осаждение активных полипептидов ацетоном или сульфатом аммония с последующей их хроматографией на биогелях и ионообменных смолах. В индивидуальном состоянии полипептиды, как правило, получают с помощью изофокусирования, а в последние годы – с помощью ионообменной и обращенно-фазовой ВЭЖХ [2].

Для выделения цитолизиннов *Radianthus* была разработана схема, включающая гидрофобную хроматографию на полихrome-1 (политетрафторэтилене), хроматографию на целлюлозе CM-23 в статическом варианте, обессоливание и гель-фильтрацию на Akrilex P-4, ионообменную хроматографию на целлюлозе CM-32, ионообменную и обращенно-фазовую ВЭЖХ на колонках Ultropac TSK CM-3SW и Силасорб C₁₈, соответственно (табл. 1). На всех стадиях тестировали гемолитическую активность фракций.

[#] Автор для переписки (тел.: (4-232) 31-16-51; e-mail: rita@piboc.marine.su).

Таблица 1. Схема очистки цитолизиннов из актинии *R. macrodactylus*

Стадия очистки	Количество белка, мг	Гемолитическая активность, НУ/мг	Выход (по белку), %
Исходный водный экстракт	60000	400	100
Хроматография на полихроме-1	2000	1000	3.3
Статическая хроматография на целлюлозе СМ-23	1420		2.4
Гель-фильтрация на Akrilex P-4:			
фракция А	200	10000	0.33
фракция Б	250	5000	0.41
Хроматография на целлюлозе СМ-32:			
фракция 1 (RTX-A)	23	20000	0.04
фракция 2 (RTX-S)	17	33000	0.028
фракция 3	20	1390	0.033
фракция 4	15	1650	0.025
фракция 5 (RTX-G)	23	7500	0.04
фракция 6	8	1100	0.013
ВЭЖХ на Ultropac:			
RTX-A	4.5	28000	0.008
RTX-S	2.6	50000	0.004
RTX-G	4.0	10000	0.007
ВЭЖХ на Силасорбе C ₁₈ :			
RTX-A	2.0	35000	0.003

Гидрофобная хроматография водного экстракта актинии с использованием полихроме-1 позволяет избавиться от основной массы балластных белков, липидов, пигментов, а также морской соли. Кроме того, важным свойством данно-

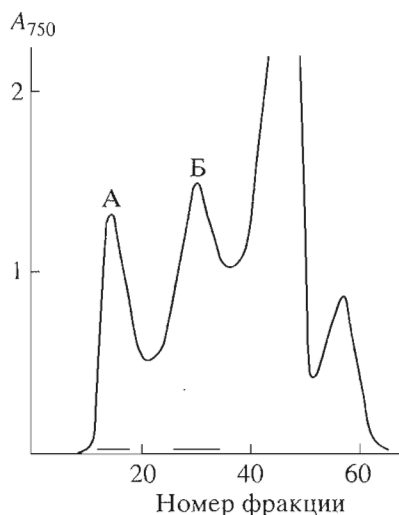


Рис. 1. Гель-фильтрация на колонке (3 × 100 см) с Akrilex P-4 активного препарата водорастворимых белков актинии *R. macrodactylus* (после статической хроматографии на целлюлозе СМ-23) в 0.01 М аммоний-ацетатном буфере, рН 6.0. Объем фракций 5 мл. Отмечены границы объединения активных фракций.

го носителя является способность сорбировать ингибиторы протеиназ, находящиеся в исходном водном экстракте в значительных количествах, и уже на первой стадии очистки избавиться от них. Высокая емкость сорбента и его гидродинамические свойства обеспечивают возможность получения цитолизиннов в препаративных количествах, достаточных для дальнейших исследований. Недостатком этой стадии является большой объем получаемой активной белковой фракции, однако введение стадии статической хроматографии на целлюлозе СМ-23 позволяет сконцентрировать белок в 30–40 раз.

Для обессоливания полученной сконцентрированной на целлюлозе СМ-23 фракции использовали гель-фильтрацию на Akrilex P-4, что привело к дополнительному разделению полипептидов по молекулярным массам (рис. 1). Фракции А и Б обладали высокой гемолитической активностью и содержали в основном полипептиды с *M* 20 кДа (по данным SDS-электрофореза в градиенте плотности ПААГ).

В результате ионообменной хроматографии объединенных фракций А и Б на целлюлозе СМ-32 получено шесть активных фракций (рис. 2а и б). По данным SDS-электрофореза, фракции с высокой гемолитической активностью (1, 2 и 5) содержали полипептиды с *M* 20 кДа (рис. 3) и, согласно *N*-концевому аминокислотно-

му анализу (Ala, Ser и Gly), были названы RTX-A, RTX-S и RTX-G, соответственно. Подобные значения молекулярных масс имеют цитолитические изотоксины из *Stichodactyla helianthus* [10], *Actinia equina* [11], *A. tenebrosa* [12], *Heteractis magnifica* [13], а также большинство цитолитинов морских актиний, образующих группу сфингомиелинингибируемых гемолизинов [2]. Молекулярная масса полипептидов во фракциях 3, 4 и 6, проявляющих более низкую гемолитическую активность, по данным SDS-электрофореза составляла 5–7 кДа [14].

Фракции 1, 2 и 5, содержащие высокомолекулярные гемолизины, после обессоливания и лиофилизации были дополнительно очищены ионообменной ВЭЖХ на колонке Ultrac S TSK CM-3SW (рис. 4а, б, в). Полученная гемолитически активная фракция RTX-A (рис. 4а) была подвергнута хроматографии на колонке с обращенной фазой Силасорб С₁₈ (рис. 4г). В результате выделены три гемолитически высокоактивных полипептида RTX-A, RTX-S и RTX-G, гомогенность которых доказана методами SDS-электрофореза в градиенте плотности ПААГ и N-концевым аминокислотным анализом.

Для аминокислотного состава цитолитинов *Radianthus* характерно высокое содержание неполярных аминокислот (табл. 2), что отмечено для большинства полипептидов актиний, обладающих высокой мембранолитической активностью [10]. Другой отличительной чертой цитолитинов актиний является отсутствие остатков цистеина и наличие четырех остатков триптофана (для цитолитина IV из *S. helianthus* – 3). Наибольшее подобие по аминокислотному составу наблюдается для цитолитинов *Radianthus* и цитолитина III из *S. helianthus*. Молекулярная масса RTX-A, RTX-S и RTX-G, рассчитанная из аминокислотного состава, составляет 17249, 16671 и 17392, соответственно.

Физико-химические характеристики цитолитинов *Radianthus*, представленные в табл. 3 (*M*, *pI*), близки аналогичным характеристикам изотоксинов из *S. helianthus* [10], *A. equina* [11], *A. tenebrosa* [12], *H. magnifica* [13], *A. cary* [15].

Данные по биологической активности цитолитинов актиний (табл. 3), показывают значительный разброс величин LD₅₀* цитолитинов, полученных разными способами. На наш взгляд, это свидетельствует не только о разной степени очистки образцов цитолитинов, но также о присутствии в ряде препаратов высокотоксичных низкомолекулярных соединений небелковой природы, подобных палитоксину (LD₅₀ 0.74 мкг/кг), обнаруженный ранее в водно-этанольных экстрактах актинии *R. macrodactylus* [16]. Более низкие значения токсичности цитолитинов *Radianthus* мы объясняем отсутствием в препаратах RTX примеси пали-

*LD – летальная доза.

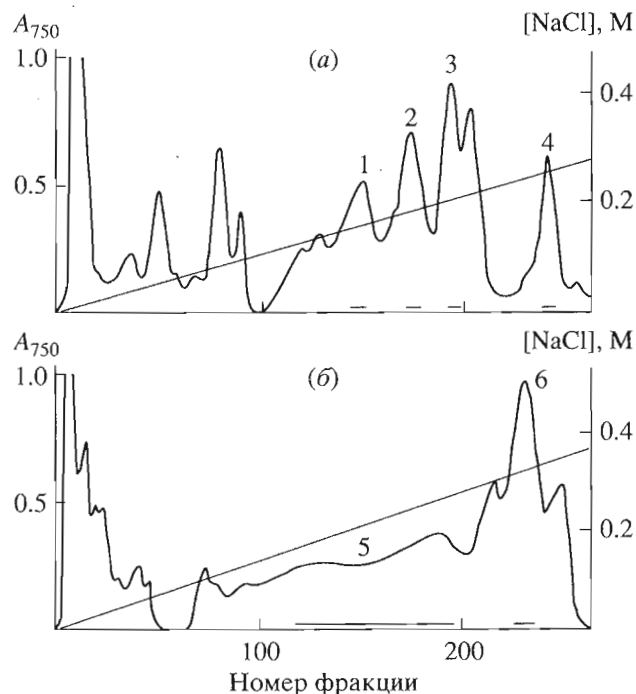


Рис. 2. Ионообменная хроматография фракций А (а) и Б (б) рис. 1 на колонке (2.2 × 50 см) с целлюлозой CM-32 в градиенте концентрации NaCl (0–0.5 М) в 0.01 М аммоний-ацетатном буфере, рН 6.0. Объем фракций 6 мл. Отмечены границы объединения фракций, проявивших гемолитическую активность

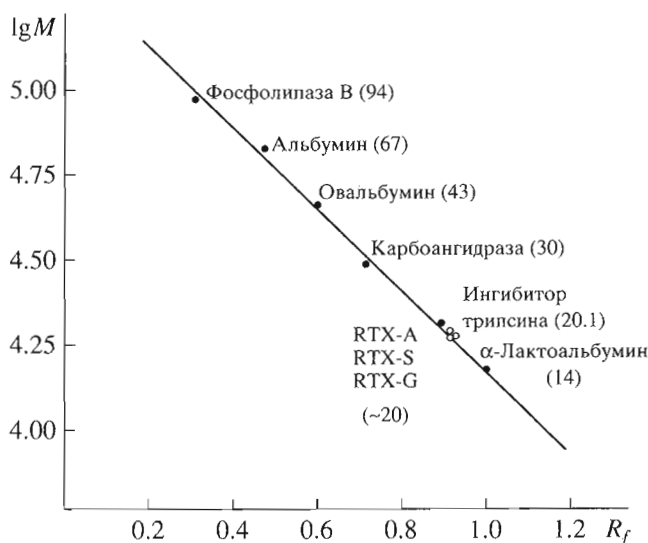


Рис. 3. Определение молекулярной массы RTX-A, RTX-S, RTX-G (светлые кружки) по результатам SDS-электрофореза в градиенте плотности ПААГ (10–30%). В скобках приведены молекулярные массы (кДа) белков-маркеров и анализируемых препаратов.

токсина (в УФ-спектрах цитолитинов *Radianthus* отсутствуют характерные для палитоксина максимумы поглощения при 233 и 263 нм), который прочно сорбируется гидрофобным сорбен-

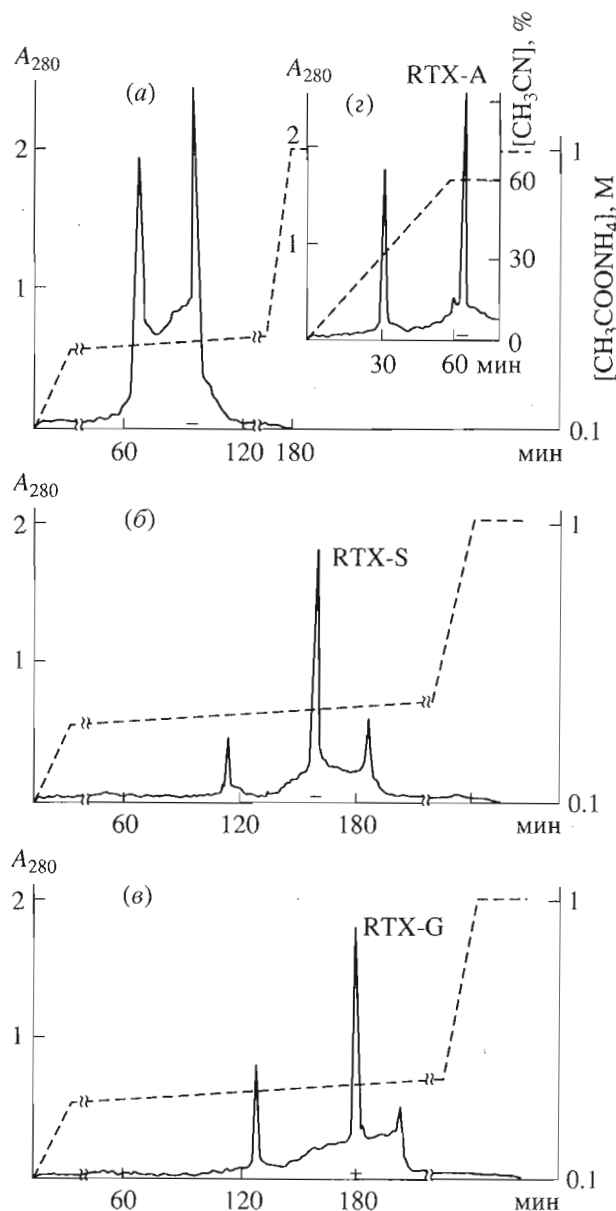


Рис. 4. Ионообменная ВЭЖХ фракций 1 (а), 2 (б), 5 (в) рис. 2 на колонке (21.5 × 150 мм) Ultrac S TSK CM-3SW в ступенчатом градиенте концентрации аммоний-ацетатного буфера (0.1–1 М), рН 6.0 за 240 мин и обращенно-фазовая ВЭЖХ фракции RTX-A рис. 4а (г) на колонке (10 × 250 мм) Силасорб С₁₈ в градиенте концентрации ацетонитрила (0–60%) в 0.1% трифторуксусной кислоте за 60 мин. Скорость элюции 1 мл/мин.

том полихромом-1 на первой стадии очистки цитотоксинов.

При исследовании действия препаратов RTX на карциному Эрлиха (асцитный вариант) показано, что в результате лечения экспериментальных мышей, начатого через сутки после инокуляции опухоли (5×10^6 клеток), на 12-е сутки опухоль у животных не обнаруживается. Определена цитотоксическая доза цитотоксинов IC₁₀₀: для RTX-A,

RTX-S и RTX-G составляет 6.0, 1.25 и 10 мкг/мл, соответственно.

Гемолитическая активность RTX-A, RTX-S и RTX-G соответствует 3.5, 5.0 и 1.0 HU/мг. Наиболее близки по гемолитической активности изотоксины из *S. helianthus* [10] и *H. magnifica* [13] (табл. 2). Некоторые различия в полученных значениях можно объяснить использованием в биологических тестах эритроцитов разных видов животных, которые проявляют разную чувствительность к цитотоксинам, что обусловлено, очевидно, определенным содержанием сфингомиелина в их мембранах [5].

Как показано большинством авторов, мембранолитическое действие цитолитических токсинов актиний, за исключением метридиолизина, ингибируется экзогенным сфингомиелином (SM) [5, 6], который принято считать их мембранным рецептором или акцептором, непосредственно участвующим в литическом процессе [2, 17]. При изучении влияния ряда фосфолипидов, холестерина, сфингомиелина, а также нормальной сыворотки крови человека на мембранолитическое действие цитотоксинов *Radianthus* установлено, что ингибирующий эффект оказывает только дисперсия сфингомиелина (см. также рис. 5) и сыворотка крови, содержащая, как известно, этот липид (табл. 4). Как показывают данные табл. 4, преинкубация цитотоксинов с большими избытками других липидов и холестерина практически не вызывает изменения их исходной гемолитической активности. Действие сыворотки крови, сравнимое с действием сфингомиелина, можно объяснить наличием в ней, помимо этого липида, также α -глобулиновой и β -липопротеиновой фракций, которые, как показано ранее [5], способны ингибировать гемолитическую активность актиний. Показано также, что обработка эритроцитов кролика стафилококковой сфингомиелиназой предотвращает их гемолиз препаратами RTX. Вышеперечисленные факты свидетельствуют о том, что цитотоксины *Radianthus* относятся к группе SM-ингибируемых цитолитических токсинов актиний. Ранее методами собственной белковой флуоресценции и дифференциальной сканирующей микрокалориметрии установлено, что взаимодействие сфингомиелина с RTX носит специфический характер и образующийся комплекс SM–RTX имеет иные, нежели нативные белок и липид, физико-химические характеристики [9].

Имеются данные, что морские актинии помимо сфингомиелин- и холестеринингибируемых цитотоксинов продуцируют фосфолипазу A₂ [3], которая является для эритроцитов так называемым “непрямым” литическим фактором, требующим для полного гемолиза наличия лецитина (фосфатидилхолина). С помощью известного метода [18] мы установили отсутствие в препаратах

Таблица 2. Аминокислотный состав цитолизинов *Radianthus* (RTX-A, -S, -G), *Stichodactyla* (I-IV) [10] и *Magnifica* (I, II) [13] (приведено количество остатков на 1 моль белка)

Аминокислота	RTX			Цитолизины <i>Stichodactyla</i>				Цитолизины <i>Magnifica</i>	
	A	G	S	I	II	III	IV	I	II
Asp	16	16	17	18	14	15	19	16	19
Thr	8	11	6	9	9	9	9	8	7
Ser	10	10	10	13	11	10	12	12	12
Glu	10	10	10	9	10	9	12	10	8
Pro	5	4	5	5	5	5	7	5	5
1/2 Cys	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gly	21	20	20	21	20	18	23	19	18
Ala	14	14	17	12	14	13	15	16	16
Val	9	8	9	9	10	10	10	10	9
Met	5	6	6	5	5	5	5	6	5
Ile	7	7	8	6	6	7	8	10	9
Leu	12	12	11	10	10	12	13	12	13
Tyr	10	10	10	12	9	10	10	12	12
Phe	6	6	6	5	5	5	5	7	6
Trp	4	4	4	4	4	4	3	4	4
Lys	11	12	8	10	10	10	11	10	9
His	2	2	2	0	1	1	1	3	1
Arg	7	6	7	8	8	7	8	8	8
Число а. о.	157	158	156	201	151	150	171	168	161

Приведены средние значения, полученные из двух экспериментов при гидролизе в течение 24 ч (результаты 48- и 72-часовых гидролизом аналогичны).

Таблица 3. Некоторые свойства цитолизинов морских актиний

Вид актинии	Токсин	M, кДа	pI	LD ₅₀ , мышь (в/в), мкг/кг	Гемолитич. активность, 10 ⁴ HU/мг	Эритроциты
<i>Radianthus macrodactylus</i>	RTX-A	20	9.8	50*	3.5	Кролика
	RTX-S	20	9.8	50*	5.0	»
	RTX-G	20	10.5	100*	1.0	»
<i>Stichodactyla helianthus</i> [10]	цитолизин I	17.6	8.7		0.91	Крысы
	цитолизин II	17.6	9.5		3.14	»
	цитолизин III	17.5	9.7	100	4.82	»
	цитолизин IV	19.2	9.8		1.67	»
<i>Actinia equina</i> [11]	эквинатоксин I	19	9.8	23		Крысы
	эквинатоксин II	19	10.5	35		»
	эквинатоксин III	19	10.5	83		»
<i>Actinia tenebrosa</i> [12]	тенебросин-A	19.8	9.4		71	Морской свинки
	тенебросин-B	19.4			23	»
	тенебросин-C	20.2	>10		17	»
<i>Heteractis magnifica</i> [13]	магнификализин I	19	9.4	140	3.6	Кролика
	магнификализин II	19	10.0	320	3.3	»
<i>Actinia cari</i> [15]	каритоксин I	19.8	9.45	54	0.7	Коровы
	каритоксин II	19.8	10.0	91	0.5	»

* Внутривентральная инъекция цитолизинов.

Таблица 4. Ингибирование гемолитической активности цитолизинов *Radianthus* фосфолипидами и сывороткой крови человека

	Концентрация, мкг/мл	Гемолиз эритроцитов, %
Фосфатидилэтаноламин	100	100
	500	100
Фосфатидилхолин	100	100
	500	82 ± 3
Дифосфатидилглицерин	100	100
	500	82 ± 2.7
Димиристоиллецитин	100	100
	500	83 ± 1.5
Дипальмитоиллецитин	100	100
	500	81 ± 2.2
Моноолеин	100	100
	500	85 ± 1.7
Холестерин	100	100
	500	88 ± 0.6
Фосфолипиды яйцеклеток морского ежа*	100	100
	500	88 ± 0.5
Сфингомиелин	1	100
	2	77 ± 2.7
	4	13 ± 1.7
	8	9 ± 1.2
	16	5 ± 0.4
	100	0
Сыворотка крови человека**	1	93 ± 3
	2	64 ± 4
	4	9 ± 2
	8	3.6 ± 0.5
	16	1 ± 0.15
	100	0

* В яйцеклетках морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* сфингомиелин отсутствует.

** Коммерческий препарат нормальной сыворотки крови (Hyland Division Travenol Laboratories S.A., Бельгия). Исходная концентрация – 500 мг лиофилизированного препарата в 5 мл 0.01 М Трис-Нерес-буфера, pH 7.25, содержащего 0.85% NaCl.

цитолизинов *Radianthus* как фосфолипазной, так и сфингомиелиназной активностей.

К настоящему времени определена полная первичная структура только трех цитолизинов: ShIII из *S. helianthus* [19], тенебросина С из *A. tenebrosa* [12] и эквинатоксина II из *A. equina* [11, 17]; для нескольких цитолизинов определена N-концевая аминокислотная последовательность [10–13]. Полная структурная гомология тенебросина С и эквинатоксина II позволила Нортону высказать гипотезу о том, что аминокислотная последовательность цитолизинов может служить их родовым хемотаксономическим маркером [17], и предопределяет дальнейшее сравнительное изучение

первичной структуры цитолизинов морских актиний.

Нами установлена N-концевая аминокислотная последовательность RTX-A: ALAGAPIA-GAGL/KGLKI/FLIEVLGEG-V/NKVKI- (в положении 25 и 26 аминокислотные остатки не идентифицированы). Как видно из табл. 5 этот фрагмент имеет 78% гомологии с аналогичными N-концевыми фрагментами магнификализинов I и II и только 45% гомологии с тенебросином С, эквинатоксином II и хелиантином III. Высокую степень гомологии N-концевых последовательностей цитолизинов *Radianthus* и *Heteractis* можно объяснить тем, что продуцирующие их актинии принадлежат к одному роду *Heteractis*.

Таблица 5. Сравнение последовательностей *N*-концевых фрагментов цитолизина *Radianthus* (RTX-A), магнификализинов I и II [13], *Stichodactyla* цитолизина III (Sh III) [19], эквинатоксина II (EqT II) и тенебросина-С (Tn C) [11, 12]

RTX-A	A L A G A I I A G A G L / K G L K I / F L I E V L G E G - - V / N K V K I -
Магнификализин I	A L A G T I I A G A S L T F K I L D E V -
Магнификализин II	S A A L A G T I I D G A S L G F D I L N K V
Sh III	A L A G T I I A G A S L T F Q V L D K V L E E L G K V S R S G -
EqT II	S A D V A G A V I D G A S L S F D I L K T V L E A L G N V K R K I -
Tn C	S A D V A G A V I D G A S L S F D I L K T V L E A L G N V K R K I -

В дальнейших исследованиях предполагается установить полную аминокислотную последовательность высокомолекулярных цитолизинов актинии *R. macrodactylus* и выяснить их структурно-функциональные взаимосвязи.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали полихром-1 (Олайне, Латвия), Akrilex P-4 (Reanal, Венгрия), целлюлозу CM-32 (Whatman, Англия) и CM-23 (Reanal, Венгрия), набор стандартов для определения молекулярных масс (Pharmacia, Fine Chemicals AB, США), реактивы для электрофореза в ПААГ (Serva, ФРГ), 5-диметиламинонафталин-1-сульфохлорид (Serva, Германия), *L*- α -фосфатидилхолин, α -моноолеин, α -моноэруцин, *L*- α -фосфатидилэтаноламин, *L*- α -фосфатидил-*DL*-глицерин, *L*- α -димиристоилфосфатидилхолин, *L*- α -дипальмитоилфосфатидилхолин, сфингомиелин из мозга быка (Sigma, США), фосфолипиды из гонад морского ежа *S. intermedius*, выделенные по методу Блая и Дайера [19]. Все остальные реактивы имели квалификацию "ос. ч".

Все выделительные операции проводили при 4°C.

Приготовление экстракта. Морские актинии собирали в 11-м экспедиционном рейсе НИС "Академик Опарин" в районе Сейшельских островов и хранили при -20°C. Их видовая принадлежность определена Гребельным С.Д. (Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург). Цельные актинии гомогенизировали с трехкратным объемом дистиллированной воды. После 12 ч экстракции гомогенат фильтровали и центрифугировали при 10000 *g* (K-24, Германия).

Гидрофобную хроматографию водного экстракта *R. macrodactylus* проводили на колонке (4.5 × 120 см) с полихромом-1, уравновешенным водой. Элюцию осуществляли водой при скорости 120 мл/ч, объем фракций 20 мл. Детектирование осуществляли с помощью проточного спектрофотометра Uvicord 8300 (ЛКВ, Швеция) при длине волны 280 нм.

Количество белка в хроматографических фракциях определяли спектрофотометрически по методу Лоури [21] при длине волны 750 нм.

Хроматографию в статическом варианте проводили на воронке Шотта № 4 (объем 300 см³) с целлюлозой CM-23 (Reanal, Венгрия), уравновешенной 0.01 М аммоний-ацетатным буфером, pH 6.0. Элюцию осуществляли 0.5 М NaCl в том же буфере.

Обессоливание и гель-фильтрацию осуществляли на колонке (3 × 100 см) Akrilex P-4 в 0.01 М аммоний-ацетатном буфере, pH 6.0 при скорости элюцию 30 мл/ч; объем фракции 5 мл.

Ионообменную хроматографию выполняли на колонке 2.2 × 50 см с целлюлозой CM-32 в градиенте концентрации NaCl (0–0.5 М, общий объем 4 л) в 0.01 М аммоний-ацетатном буфере, pH 6.0. Скорость элюции 24 мл/ч, объем фракции 6 мл.

Для ВЭЖХ использовали жидкостной хроматограф Altex 114M Solvent Delivery Module (Beckman, США), детектор 2151 (ЛКВ, Швеция). Ионнообменную ВЭЖХ проводили на колонке Ultropac TSK CM-3SW (21.5 × 150 мм, ЛКВ, Швеция), уравновешенной 0.1 М аммоний-ацетатным бу-

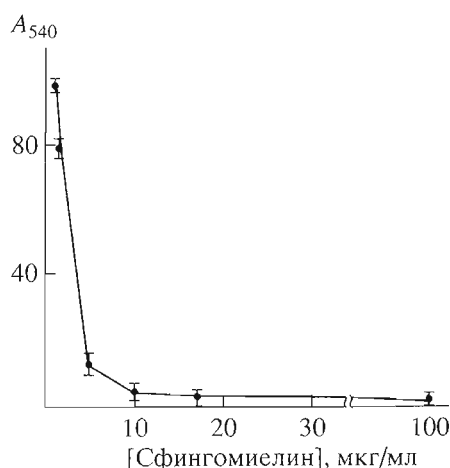


Рис. 5. Зависимость ингибирующего действия сфингомиелина от его концентрации. Инкубационная смесь содержит 0.35 мкг цитолизина RTX-A и дисперсию сфингомиелина. Объем смеси 1 мл, инкубация 1 ч при 37°C.

фером рН 6.0, в градиенте концентрации буфера (0.1–1 М), рН 6.0; обращенно-фазовую – на колонке Силасорб С₁₈ (10 × 250 мм, Элсико, НПО “Диагностикум”) в градиенте концентрации ацетонитрила (1–60%) в 0.1% трихлоруксусной кислоте. Скорость элюции 1 мл/мин.

SDS-ПААГ-электрофорез. Фракции и очищенные препараты анализировали по методу Лэммли [22] в вертикальных пластинах (9 × 12 см × 1 мм) в градиенте плотности ПААГ (10–30%).

Аминокислотный анализ осуществляли на аминокислотном анализаторе D-500 (Dugum, США) [23]. Образцы полипептидов (2.5–3 нмоль) гидролизовали 24, 48 и 72 ч 5.7 н. HCl при 110°C. Содержание триптофана определяли на спектрофотометре Cary 219 (Varian, Англия) по вторым производным УФ-спектров белков [24].

N-Концевые аминокислотные остатки определяли по методу [25]. Дансильные производные аминокислот идентифицировали двумерной ТСХ на пластинках (5 × 5 см) с закрепленным слоем силикагеля [26].

Изоэлектрическую точку гемолизинов определяли по методу [27] на стандартной пластинке (11 × 15 см) с ПААГ, содержащим 2%-ную смесь амфолинов с рН 3.5–11.0 (LKB, Швеция). После фокусирования измеряли рН в краевых зонах геля с помощью рН-метра Orion 501 (Research, США). Для этого кусочки геля размером 1 × 1 см растирали с дистиллированной водой, центрифугировали и отбирали супернатант.

N-Концевую аминокислотную последовательность RTX-A (30 нмоль) определяли по методу [28] на секвенаторе модели 477A (Applied Biosystems, США). Фенилтиогидантоины аминокислот идентифицировали ВЭЖХ на колонке с обращенной фазой Microsil C18 (Macherey-Nadel, Германия).

Токсичность цитолизинов RTX определяли на белых беспородных мышках весом 20–22 г инъекцией внутрибрюшинно.

Цитотоксическую дозу измеряли по модифицированному методу Шрека [29], опухолевые клетки окрашивали эозином.

Гемолитическую активность цитолизинов определяли на эритроцитах кролика в среде, содержащей 0.9% NaCl, 1 мМ KCl, 10 мМ глюкозу, 5 мМ Трис-HCl, рН 7.4. Уровень гемоглобина измеряли в супернатанте спектрофотометрически при 540 нм после предварительного быстрого охлаждения реакционной смеси и ее центрифугирования. За одну гемолитическую единицу (НУ) принимали количество белка, вызывающее 50%-ный гемолиз в 1 мл 0.7% суспензии эритроцитов за 30 мин при 37°C.

Фосфолипазную активность в свежесыведенных препаратах RTX (лиофильно высушенные

фракции А и Б, рис. 1) определяли с помощью техники ТСХ методом [18], основанным на превращении L-α-лецитина в L-α-лизолецитин и жирную кислоту. В качестве стандартов использовали L-α-лецитин и сфингомиелин (для определения сфингомиелиназной активности). Гидролиз L-α-лецитина осуществляли коммерческой фосфолипазой А₂ из пчелиного яда и фосфолипазой С из *S. welchii* (Calbiochem, США), сфингомиелин гидролизовали стафилококковой сфингомиелиназой (Boeinger Mannheim, ФРГ).

Липидную специфичность и ингибирующее действие нормальной сыворотки крови определяли по методу [5], предварительно инкубируя цитолизин *Radianthus* (12.25, 17.5, 3.5 НУ для RTX-A, RTX-S, RTX-G, соответственно) в течение 60 мин с дисперсиями различных липидов и сывороткой крови человека в 0.01 М Трис-Нерес-буфере, рН 7.25, содержащем 0.85% NaCl (по три параллельных опыта для каждого липида). Для определения ингибирующего действия сфингомиелина использовали молярное соотношение RTX : SM, равное 1 : 1, 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16, 1 : 100. Степень гемолиза эритроцитов, добавленных к липид-белковой смеси, определяли через 30 мин спектрофотометрически как описано выше.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность И.В. Назимову (ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН) за определение N-концевой аминокислотной последовательности RTX-A и Н.Г. Прокофьевой (ТИБОХ ДВО РАН) за определение токсической и цитотоксической дозы цитолизинов *Radianthus*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schweitz H., Vincent J.-P., Barhanin J., Frelin C., Linden G., Hugues M., Lazdunski M. // Biochem. 1981. V. 20. P. 5245–5252.
2. Turk T. // J. Toxicol.-Toxin Rev. 1991. V. 10. P. 223–262.
3. Tejuca M., Serra M.D., Ferreras M., Lanio M.E., Menestrina G. // Biochem. 1996. V. 35. P. 14947–14957.
4. Bergman G., Dubois J.M., Rojas E., Rathmayer W. // Biochem. Biophys. Acta. 1976. V. 455. P. 173–184.
5. Bernheimer A., Avigad L.S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1976. V. 73. P. 467–471.
6. Bernheimer A., Avigad L.S., Kim K.S. // Toxicon. 1979. V. 17. P. 69–75.
7. Монастырная М.М., Козловская Э.П., Иванов А.С., Мольнар А.А., Халилов Э.М., Еляков Г.Б. // Биол. мембраны. 1988. Т. 5. С. 830–835.
8. Chanturiya A.N. // Biochem. Biophys. Acta. 1990. V. 1026. P. 248–250.

9. Shnyrov V.L., Monastyrnaya M.M., Zhadan G.G., Kuznetsova S.M., Kozlovskaya E.P. // *Biochem. Int.* 1992. V. 26. P. 219–229.
10. Kem W.R., Dunn B.M. // *Toxicon.* 1988. V. 26. P. 997–1008.
11. Ferlan I., Jacson K. // *Toxicon.* 1983. Suppl. 3. V. 21. P. 141–144.
12. Simpson R.J., Reid G.E., Moritz R.L., Morton C., Norton R.S. // *Eur. J. Biochem.* 1990. V. 190. P. 319–328.
13. Khoo K.S., Kam W.K., Khoo H.E., Gopalakrishnakone P., Chung M.C.M. // *Toxicon.* 1993. V. 31. P. 1567–1579.
14. Зыкова Т.А., Монастырская М.М., Анапикова О.В., Швец Т.В., Козловская Э.П. // *Биоорганическая химия.* 1998. Т. 24. С. 509–516.
15. Sencic L., Macek P. // *Comp. Biochem. Physiol.* 1990. V. 97B. P. 687–693.
16. Махнырь В.М., Козловская Э.П. // *Биоорганическая химия.* 1992. Т. 18. С. 751–752.
17. Norton R.S., Macek P., Reid G.E., Simpson R.J. // *Toxicon.* 1992. V. 30. P. 13–23.
18. Vaskovsky V.E., Suppes Z.S. // *Comp. Biochem. Physiol.* 1972. V. 43. P. 601–609.
19. Blumenthal K.M., Kem W.R. // *J. Biol. Chem.* 1983. V. 258. P. 5574–5581.
20. Bligh E.G., Dyer W.J. // *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959. V. 37. P. 911–917.
21. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. P. 265–275.
22. Laemmli U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680–685.
23. Scheffer J.-J., Tsugita A., Linden G., Schweitz H., Lazdunsky M. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1982. V. 107. P. 272–278.
24. Ichikawa T., Terada H. // *Chem. Pharm. Bull.* 1981. V. 29. P. 438–444.
25. Grey W.R. // *Methods Enzymol.* 1967. V. 11. P. 139–151.
26. Бельский Б.Г., Ганкина Е.С., Нестеров В.В. // *Докл. АН СССР.* 1967. Т. 172. С. 91–93.
27. Awdeh Z.L., Williamson A.R., Askonas B.A. // *Nature.* 1968. V. 219. P. 66–68.
28. Hunkapiller M., Hood L.E. // *Biochemistry.* 1978. V. 17. P. 2124–2133.
29. Alsen C., Harris J.B., Tesseraux I. // *Br. J. Pharmacol.* 1981. V. 74. P. 61–71.
30. Богославская Е.Г., Коган В.Е., Глуценко Н.Н., Ерохин В.Н. // *Изв. АН СССР. Сер. биол.* 1976. № 5. С. 734–741.

Isolation and Characterization of High-molecular Cytolytic Toxins from the Sea Anemone *Radianthus macrodactylus*

M. M. Monastyrnaya[#], T. A. Zyкова, and E. P. Kozlovskaya

Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-Eastern Division, Russian Academy of Sciences, pr. 100-letiya Vladivostoka 159, Vladivostok, 690022 Russia

Three cytolytic toxins (RTX: RTX-A, RTX-S, and RTX-G) were isolated from the sea anemone *Radianthus macrodactylus* and characterized. The purification scheme involved hydrophobic chromatography on Polychrome-1, batch-chromatography on CM-23 cellulose, gel filtration on Akrilex P-4, cation-exchange chromatography on CM-32 cellulose, and HPLC on an ion-exchange Ultropac TSK CM-3SW column and a reversed-phase Silasorb C₁₈ column. The molecular masses of RTXs (ca. 20 kDa) were determined by SDS-PAGE in a density gradient of PAG. They are highly basic polypeptides (pI of 9.8 for RTX-A and RTX-S and 10.5 for RTX-G) containing similar amino acid compositions with a high content of basic and hydrophobic residues and the absence of Cys residues. The hemolytic activities of RTX-A, RTX-S, and RTX-G were determined to be 3.5, 5.0, and 1.0 × 10⁴ HU/mg, respectively. Exogenous sphingomyelin inhibits their action on the erythrocyte membrane. The N-terminal sequence of RTX-A was determined to be ALAGAIAGAGL/KGLKI/FLIEVLGEG–V/NKVKI–.

Key words: sea anemone; cytolytic toxins, function, hemolytic activity, structure

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (4232) 31-1651; e-mail: rita@piboc.marine.su.