



УДК 577.112.4

© 1990 г.

В. М. Махнырь, Э. П. Козловская

МОДИФИКАЦИЯ НЕЙРОТОКСИНА RTX-III ИЗ МОРСКОЙ  
АКТИНИИ *RADIANTHUS MACRODACTYLUS**Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО АН СССР,  
Владивосток*

Изучено влияние химической модификации на токсичность нейротоксина RTX-III для мышей. Модификация остатка Trp<sup>30</sup> 2-гидрокси-5-нитробензилбромидом не влияла на токсичность. Восстановление двух дисульфидных связей токсина 2-меркаптоэтанолом с последующей обработкой иодацетамидом приводило к падению токсичности в 100 раз. Блокирование карбоксильных групп после их активации 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимидом с помощью метилового эфира [<sup>3</sup>H]глицина снижало токсичность не более чем в 2 раза в случае монопроизводных и в 6 раз в случае дипроизводных RTX-III. Обсуждается концепция многоточечного связывания нейротоксинов из актиний с натриевым каналом.

Нейротоксины морских анемонов селективно взаимодействуют с натриевыми каналами возбудимых мембран, замедляя и делая неполной кинетику их инактивации [1]. Анемонотоксины образуют семейство структурно родственных полипептидов с молекулярной массой приблизительно 5 кДа и единственной полипептидной цепью. Среди гомологичных нейротоксинов, продуцируемых актинией *Radianthus macrodactylus*, количественно преобладающим и наиболее токсичным для млекопитающих является RTX-III. Его полипептидная цепь состоит из 48 аминокислотных остатков и включает в себя три внутримолекулярные дисульфидные связи [2]. Опубликованные данные по модификации нейротоксинов из актиний [3—5] носят разрозненный и противоречивый характер, что не позволяет сделать выводы об особенностях механизма действия этих неэнзиматических физиологически активных полипептидов. Целью настоящей работы было выяснение методом химической модификации функциональной роли триптофана, карбоксильных групп, а также дисульфидных связей токсина RTX-III.

*Модификация триптофана*

RTX-III содержит единственный остаток триптофана в положении 30, интерес к функциональному статусу которого обусловлен его консервативным характером для всех известных нейротоксинов из актиний (сравнение аминокислотных последовательностей токсинов см. в работе [6]). Обработка RTX-III 20-кратным молярным избытком 2-гидрокси-5-нитробензилбромида привела к исчерпывающей модификации триптофана, которая не сопровождалась изменением токсичности белка для мышей. Можно предположить, что либо триптофан выполняет в молекуле токсина чисто структурную функцию, либо он участвует в гидрофобных взаимодействиях между токсином и рецептором, на которых, однако, не сказывается присоединение модифицирующего реагента.

### Модификация карбоксильных групп

Как известно, карбодимиды модифицируют карбоксильные группы белков, давая лабильные производные O-ацилизо мочевины [7]. В присутствии нуклеофила происходит его ковалентное присоединение к активированным COOH-группам с образованием стабильных производных, которые в дальнейшем могут быть выделены и охарактеризованы. Наиболее часто обработку белков проводят 0,1 М водорастворимым карбодимидом в комбинации с 1 М метиловым или этиловым эфиром глицина в качестве нуклеофила при pH 4,75 (модификация по Кошланду) [8]. Токсин RTX-III содержит 8 карбоксильных групп, включая C-концевую. Инкубация RTX-III с 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимидом (EDC) и метиловым эфиром [<sup>3</sup>H]глицина в указанных выше условиях приводила к сложной смеси производных с 3—4 модифицированными COOH-группами, которые не удавалось разделить ни ионообменной, ни обращенно-фазовой ВЭЖХ. Интегральная токсичность полученной смеси продуктов была более чем в 20 раз ниже, чем у нативного токсина. Необходимо отметить, что в случае блокирования нескольких аминокислотных остатков аддитивность эффектов от модификации отдельных функциональных групп наблюдается далеко не всегда (примером могут служить результаты, полученные нами ранее [9]), что может объясняться влиянием стерических факторов или кооперативностью. Очевидно, что объективно судить о вкладе COOH-групп в физиологическую активность RTX-III можно было бы при наличии производных по отдельным карбоксильным группам, на получение которых и были направлены наши усилия.

Предварительные опыты показали, что для получения монопроизводных токсина при pH 4,75 оптимально использование 5-кратного молярного избытка EDC. Реакционную смесь разделяли ионообменной ВЭЖХ (рис. 1) с последующей рехроматографией полученных производных. Степень модификации определяли по включению трития (таблица), а также по результатам аминокислотного анализа, основываясь на увеличении содержания в белке глицина. При этом наблюдалось хорошее согласование результатов, полученных разными методами. Первым с хроматографической колонки элюировался немодифицированный токсин, за которым следовали его моно- и дипроизводные. Из таблицы видно, что блокирование какой-либо одной COOH-группы не вызывало падения токсичности более чем в 2 раза, а двух карбоксильных групп — в 6 раз.

Приведенные результаты существенно отличаются от данных по модификации карбоксильных групп токсинов ATX-II из актинии *Anemonia sulcata* [4] и Антоплеурина-A из *Anthopleura xanthogrammica* [3, 5], опубликованных ранее. По сообщению Барханина с соавт. [4], исчерпывающая модификация трех COOH-групп ATX-II этиловым эфиром глицина после их активации EDC приводила к потере токсичности более чем в 20 раз. При модификации 2,4 из трех свободных карбоксильных групп Антоплеурина-A таурином в присутствии EDC [3] исчезала его кардиотропная активность (при увеличении концентрации токсина в 100 раз по сравнению

Характеристики продуктов модификации RTX-III метиловым эфиром глицина в присутствии EDC (см. рис. 1)

Фракция	Степень модификации *	Степень инактивации **	Фракция	Степень модификации *	Степень инактивации **
1	0,8	1	7	1,0	2
2	1,0	1	8	2,2	2
3	1,9	2	9	1,9	4
4	1,0	2	10	1,9	2
5	1,2	1	11	2,4	6
6	1,0	2			

\* Определена по включению трития.

\*\* Отношение значений LD<sub>50</sub> для модифицированного и нативного токсинов (опыты на мышах).

с контролем положительной инотропный эффект отсутствовал). При обработке Антоплеурина-А этиловым эфиром глицина в сочетании с EDC [5] включалось 1,9 остатка нуклеофила на молекулу токсина, что сопровождалось значительным (приблизительно в 50 раз) снижением положительного инотропного эффекта (исследование влияния модификации на токсичность в опытах с Антоплеурином-А не проводилось). По нашему мнению, причина расхождений между опубликованными данными и результатами нашей работы кроется не столько в структурных особенностях нейротоксинов из различных видов морских анемонов, сколько в использовании различных методических подходов. Авторы цитированных работ обрабатывали белки большим избытком водорастворимого карбодимиды (0,4 М) в течение длительного времени (2,5—24 ч), получая таким образом модифицированные производные, степень замещения которых была значительно больше единицы. Это не позволяет оценить вклад отдельных COOH-групп в физиологическую активность токсина и значительно увеличивает вероятность влияния различных осложняющих факторов, о которых говорить выше. В пользу того, что такие факторы существуют, говорят данные о том, что падение активности Антоплеурина-А происходило как при присоединении этилового эфира глицина, так и таурина, хотя модификация последним не вызывает значительного изменения заряда молекулы белка.

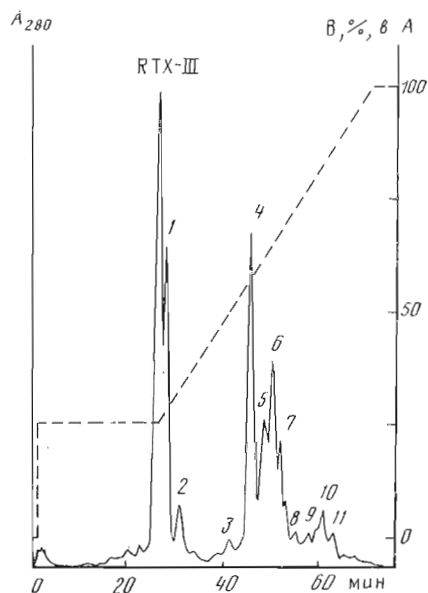


Рис. 1. ВЭЖХ продуктов модификации RTX-III метиловым эфиром  $[^3\text{H}]$ глицина в присутствии EDC на колонке ( $7,5 \times 150$  мм) Ultraras TSK CM-3SW в градиенте концентрации  $\text{NH}_4\text{OAc}$ . Формирование градиента из растворов А (0,01 М)  $\text{NH}_4\text{OAc}$ , pH 5,3) и В (0,5 М  $\text{NH}_4\text{OAc}$ , pH 5,3). Скорость элюирования 1 мл/мин

### Модификация дисульфидных связей

Дисульфидные связи RTX-III восстанавливали 2-меркаптоэтанолом с последующим алкилированием сульфгидрильных групп иодацетамидом. Очистку модифицированного токсина проводили ионообменной ВЭЖХ на колонке Ultraras TSK CM-3SW (не показано). Использование иодацетамиды позволяло избежать значительного изменения заряда молекулы токсина, которое имело бы место в случае его обработки иодуксусной или надмуравьиной кислотами. Модифицированный токсин элюировался с хроматографической колонки с временем удерживания несколько большим, чем у нативного RTX-III, и, по данным аминокислотного анализа, содержал четыре остатка карбоксиметилцистеина на молекулу, что свидетельствовало о восстановлении только двух из трех дисульфидных связей. Токсичность полученного производного оказалась в 100 раз ниже, чем у нативного RTX-III. Неполное расщепление остатков цистина, вероятно, объясняется высокой устойчивостью нейротоксинов морских анемонов к действию денатурирующих факторов [10]. Об этом также свидетельствуют данные, полученные Ишизаки с соавт. [11], показавших, что присутствие 5 М гуанидингидрохлорида не препятствует складыванию полипептидной цепи карбоксиметилцистеинового производного Антоплеурина-А и не изменяет в значительной степени сферическую форму молекулы токсина, восстановленного дитиотреитом.

Контроль за состоянием вторичной структуры осуществляли, сравнивая спектры КД полученных производных, снятые в области оптической активности пептидных групп (190—250 нм), с аналогичным спектром нативного токсина (рис 2). Спектры КД производного по триптофану, а также моно- и дипроизводных по СООН-группам оказались практически идентичны спектру нативного RTX-III (рис. 2, 1), что свидетельствует об отсутствии изменений вторичной структуры токсина под действием модификации. Изменения наблюдались в спектре RTX-III с разрушенными дисульфидными связями (рис. 2, 2), форма которого оказалась близка к аналогичному спектру токсина, подвергнутого тепловой денатурации [10].

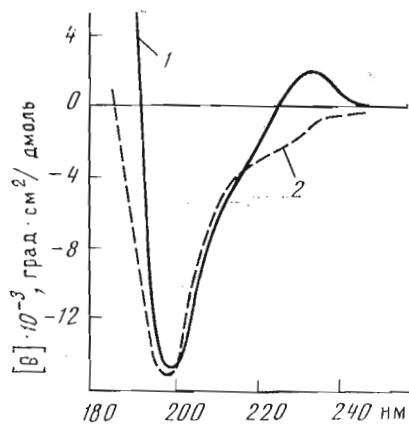


Рис. 2. Спектры КД водных растворов нативного RTX-III (1) и токсина с двумя модифицированными дисульфидными связями (2). Концентрация токсина  $1,5 \cdot 10^{-4}$  М, длина оптического пути 1 мм

Это указывает на важность дисульфидных связей для сохранения активной конформации RTX-III.

На основании полученных результатов, а также данных, опубликованных нами ранее [9, 12], можно сделать вывод об отсутствии в аминокислотной последовательности RTX-III остатка, абсолютно необходимого для токсичности (имеется в виду такой остаток, модификация которого приводила бы к ее полному исчезновению). Максимальное падение токсичности происходило в результате модификации N-концевой аминогруппы (в 12 раз) [9], а также при модификации остатка  $\text{Arg}^{13}$  (в 5 раз) [12], тогда как эффект от блокирования других функциональных групп токсина был значительно меньше. Очевидно, что в данной ситуации неприменимы как классическая концепция «активного

центра», так и предложенная ранее [4] модель организации реакционного участка анемонотоксинов, согласно которой роль центра связывания с натриевым каналом выполняет остаток аргинина.

Наличие эффекта от модификации ряда заряженных аминокислотных остатков, с одной стороны, указывает на то, что взаимодействие токсина с натриевым каналом, по крайней мере на одной из стадий, является электростатическим, а с другой — приводит нас к постулированию нескольких независимых участков взаимодействия. Кроме того, из данных по влиянию модификации на токсичность видно, что функциональная значимость отдельных аминокислотных остатков различна. На практике это должно находить выражение в различной величине локальных констант взаимодействия с рецептором, интегрирование которых дает наблюдаемую в эксперименте [13] величину константы связывания токсина. Наиболее заметную роль играют остатки, функциональные группы которых способны нести положительный заряд (особенно  $\text{Gly}^1$  и  $\text{Arg}^{13}$ ), хотя наличие свободных карбоксильных групп также важно для проявления токсинном максимальной биологической активности.

Вывод о существовании по крайней мере двух стадий во взаимодействии анемонотоксинов с натриевым каналом следует из результатов электрофизиологического эксперимента [13], показавшего, что модификация воротного механизма канала обратима в течение нескольких минут после аппликации токсином RTX-III и становится необратимой, если отмывку токсина начинают позднее. По-видимому, начальный этап взаимодействия токсина с натриевым каналом представляет собой простое электростатическое притяжение, за которым в дальнейшем следует поиск конформационного соответствия. На особую важность конформационного фактора указывает почти полная потеря токсичности в результате разрушения дисульфидных связей, стабилизирующих активную конформацию молеку-

лы RTX-III со строго определенным расположением гидрофильных и гидрофобных участков. Вероятно, гидрофобные взаимодействия играют в рецепции токсина не последнюю роль. То, что на поверхности молекулы токсина есть участок (участки) с высокой гидрофобностью, вытекает из его способности сорбироваться на гидрофобном сорбенте тетрафторполиэтилене (Полихром) (см. «Экспериментальную часть»). На это же указывают данные по высокой поверхностной активности анемоноксина, опубликованные ранее [14].

По-видимому, в процессе многоточечного связывания с натриевым каналом принимают участие как полярные, так и гидрофобные участки молекулы токсина. Возможно, что первые более важны на начальной стадии этого процесса, тогда как гидрофобные взаимодействия необходимы для последующего образования жесткого комплекса токсина с натриевым каналом.

### Экспериментальная часть

В работе использовали 2-меркаптоэтанол (Loba Chemie), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид (Serva, ФРГ), 2-гидрокси-5-нитробензилбромид (Fluka, Швейцария),  $\alpha$ -иодацетамид марки ч., дважды перекристаллизованный из воды, мочевины марки ос. ч., Полихром-I (Союзреактив). Квалификация остальных реагентов была х.ч.

Токсин RTX-III был выделен по методу [15], его гомогенность доказана данными ВЭЖХ, аминокислотного анализа и анализа N-концевой аминокислоты.

Гидрохлорид метилового эфира [ $^3\text{H}$ ]глицина получали метилированием [ $^3\text{H}$ ]глицина («Изотоп», СССР) абсолютным метанолом, насыщенным сухим HCl [16]. Меченый глицин, поступающий в виде раствора в 50% этаноле, предварительно упаривали досуха под вакуумом.

Концентрацию белка определяли по методу Лоури [17] и спектрофотометрически ( $\epsilon^{278} = 10\,700\ \text{M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ ).

Спектральные измерения выполняли на УФ-спектрофотометре Cary 219 (Varian). Для снятия КД-спектров использовали спектрополяриметр J 500 A (Jasco).

Летальную дозу ( $\text{LD}_{50}$ ) определяли внутривнутрибрюшинной инъекцией препаратов мышам весом 20–22 г по методу [18].

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

Для счета радиоактивности использовали сцинтиллятор состава: 1 л сцинтилляционной жидкости ЖС-1 (Союзреактив), 333 мл Тритона X-100.

*Модификация триптофана.* Токсин (5 мг, 1 мкмоль) растворяли в 5 мл 0,15 М ацетата натрия (рН 4,7) в защищенном от света флаконе и при перемешивании вводили раствор 4,6 мг 2-гидрокси-5-нитробензилбромида в 0,5 мл диоксана (20-кратный молярный избыток), который готовили непосредственно перед проведением реакции. Инкубацию вели 10 мин, после чего удаляли реагенты гель-фильтрацией на колонке с биогеелем Р-4 (10 × 500 мм), уравновешенным 0,01 М ацетатом аммония, рН 6,0. Степень модификации определяли по спектру модифицированного токсина ( $\epsilon^{410} = 18\,000\ \text{M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ , рН 11,9 [19]).

*Модификация карбоксильных групп.* Токсин (40 мг, 7,6 мкмоль) растворяли в 4 мл 1 М гидрохлорида метилового эфира [ $^3\text{H}$ ]глицина (0,15 ТБк/моль), куда для улучшения растворимости белка вводили 0,4 мл этанола. Раствор дотитровывали 2 н. NaOH до рН 4,75 и вносили 7,3 мг EDC в 0,1 мл воды (5-кратный молярный избыток). Реакционную смесь инкубировали при перемешивании в течение 1 ч, после чего наносили на колонку с Полихромом (12 × 120 мм) для обессоливания: реагенты удаляли промыванием колонки 300 мл воды, токсин элюировали 50% этанолом и после удаления растворителя лиофилизировали.

*Модификация дисульфидных связей.* Токсин (5 мг, 1 мкмоль) инкубировали под аргоном с 6,7 мкл 2-меркаптоэтанол (100-кратный молярный избыток) в 250 мкл дегазированного под вакуумом буфера (0,4 М трис-HCl

(рН 8,0), 8 М мочевины, 0,2 мМ EDTA) в течение 4 ч, после чего вносили 35 мг иодацетамида в 250 мкл того же буфера (2-кратный молярный избыток по отношению к 2-меркаптоэтанолу), выдерживали 15 мин в темноте, добавляли 2-меркаптоэтанол в количестве, равном исходному, и сразу наносили на колонку с Полихромом (0,8 × 50 мм) для обессоливания (см. выше).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rathmayer W., Beress L. // J. Comp. Physiol. 1976. V. 109. P. 373—382.
2. Зыкова Т. А., Винокуров Л. М., Козловская Э. П., Еляков Г. Б. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 3. С. 302—310.
3. 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.
4. Barhanin J., Hugues M., Schweitz H., Vincent J.-P., Lazdunski M. // J. Biol. Chem. 1981. V. 256. № 11. P. 5764—5769.
5. Gruen L. C., Norton R. S. // Biochem. Int. 1985. V. 11. № 1. P. 69—76.
6. Kent W. R., Parten B., Pennington M. W., Price D. A., Dunn B. M. // Biochemistry. 1989. V. 28. № 8. P. 3483—3489.
7. Hoare D. G., Koshland D. E. // J. Biol. Chem. 1967. V. 242. № 10. P. 2447—2453.
8. Carraway K. L., Koshland D. E. // Methods Enzymol. 1972. V. 25. P. 616—623.
9. Махнырь В. М., Козловская Э. П. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 4. С. 465—470.
10. Набиуллин А. А., Одинокоев С. Е., Вождова Е. И., Козловская Э. П., Еляков Г. Б. // Биоорган. химия. 1982. Т. 8. № 12. С. 1644—1648.
11. Ishizaki H., McKay R. H., Norton T. R., Yasunobu K. T. // J. Biol. Chem. 1979. V. 254. № 19. P. 9651—9656.
12. Mahnir V. M., Kozlovskaya E. P., Elyakov G. B. // Toxicon. 1989. V. 27. № 10. P. 1075—1084.
13. Сорочкина Э. А., Цижмаков И. В., Еляков Г. Б., Козловская Э. П., Вождова Е. И. // Физиол. журн. 1984. Т. 30. № 5. С. 571—579.
14. Ash P., Hider R. C., Menez A., Wanderer G. // Biochem. et biophys. acta. 1981. V. 669. P. 231—235.
15. Beress L., Beress R., Wunderer G. // Toxicon. 1975. V. 13. № 5. P. 359—367.
16. Гринштейн Дж., Виниц М. Химия аминокислот и пептидов: Пер. с англ. М.: Мир, 1965. С. 425—426.
17. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265—275.
18. Miranda F., Kupeyan C., Rochat H., Rochat C., Lissitzky S. // Eur. J. Biochem. 1970. V. 16. P. 514—523.
19. Norton H. R., Koshland D. E. // J. Amer. Chem. Soc. 1965. V. 87. № 5. P. 1126—1130.

Поступила в редакцию  
8.IX.1989

V. M. MAHNIR, E. P. KOZLOVSKAYA

#### MODIFICATION OF SEA ANEMONE TOXIN RTX-III FROM *RADIANTHUS MACRODACTYLUS*

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

The influence of chemical modification on neurotoxin RTX-III toxicity in mice has been studied. The toxicity was not affected by modification of Trp<sup>30</sup> residue with 2-hydroxy-5-nitrobenzyl bromide but was diminished by a factor of 100 after reduction of the toxin's two disulfide bonds with 2-mercaptoethanol followed by derivatization with iodoacetamide. Blocking carboxyl groups with [<sup>3</sup>H]glycine methyl ester in the presence of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide led to only a two-fold drop in toxicity in the case of monocarboxylate-modified derivatives and a six-fold decrease for dimodified derivatives. A conception of multipoint attachment of the toxin to sodium channel is discussed.