



УДК 547.962:541.69+547.993:598.126.088

**ВЛИЯНИЕ АЦИЛИРОВАНИЯ ОСТАТКОВ ЛИЗИНА
НЕЙРОТОКСИНА II NAJA NAJA OXIANA
НА НЕЙРОТОКСИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ****Влинов П. О., Цетлин В. И., Уткин Ю. Н.,
Ананина В. А., Макарова О. Д.***Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Проведено электрофизиологическое исследование (на мышце *m. cutaneus pectoris* лягушки *Rana temporaria*) биологической активности производных нейротоксина II *Naja naja oxiana*, в которых модифицирован один из остатков лизина: лизин-15, -25, -26, -44 или -46. Введение ацильной группы в положение 46 уменьшает биологическую активность примерно в 2,5 раза. Активность остальных производных существенно не изменилась.

Полипептидные нейротоксины змей, блокирующие никотиновый ацетилхолиновый рецептор, широко используются при исследовании механизма нервно-мышечной передачи. Известно строение около 60 таких белков. По иммунологическим свойствам и строению они разделены на две подгруппы: «короткие» (60—62 аминокислотных остатка и 4 дисульфидные связи) и «длинные» (66—74 аминокислотных остатка и 5 дисульфидных связей) нейротоксины. В строении этих токсинов существует определенная гомология [1]: около трети аминокислотных остатков занимают строго определенное положение, т. е. они одинаковы (инвариантны) у представителей каждой подгруппы, а примерно 15 аминокислотных остатков инвариантны у токсинов обеих подгрупп.

Данные о том, какие участки молекулы нейротоксинов существенны для связывания с рецептором, получают при сравнении биологической активности гомологичных нейротоксинов, а также их производных. Большой интерес представляет выяснение функционального значения катионных групп нейротоксинов, так как ацетилхолин и его антагонисты имеют катионную природу. Среди аминокислотных остатков нейротоксинов, несущих положительный заряд, инвариантными являются аргинин в положении 37 гомологического ряда*, а также лизин в положении 47 «коротких» нейротоксинов. Имеющиеся в литературе данные показывают, что при модификации остатков аргинина [2] и лизина [3—6] наблюдается уменьшение токсичности, хотя и довольно значительное в некоторых случаях, но все же не полное ее исчезновение. Полная инактивация наблюдается лишь при одновременной модификации многих групп, могущей привести к изменению конформации нейротоксинов [1].

Целью данной работы являлось электрофизиологическое исследование биологической активности серии производных нейротоксина II *Naja naja oxiana*, в каждом из которых модифицирован один из остатков лизина (лизин-15, -25, -26, -44 или -46) [7, 8]. Выполненные ранее спектральные исследования [7] показали, что эти производные в основном сохраняют конформацию природного нейротоксина. Биологические испытания проводили на первно-мышечном препарате кожно-грудной мышцы лягушки. Нерв раздражали импульсами электрического тока и регистрировали возникающие потенциалы концевой пластинки. По уменьшению амплитуды

* В тексте в некоторых случаях используется двойная номенклатура нейротоксинов при указании положения аминокислот: приводится порядковый номер аминокислоты в цепи данного нейротоксина и в скобках соответствующий ему номер гомологического ряда [1].

**Сравнительная активность (время полуспада амплитуды потенциала
концевой пластинки) нейротоксина II из яда кобры *Naja naja oxiana*
и его ацетильных и спин-меченных производных**

Соединения	Концентрация, мкМ	Время полуспада, с	Средняя квадратичная ошибка среднего	Число опытов
Нейротоксин II (NT-II)	0,11	500	—	1
	0,23	317	±67	4
	0,35	191	±20	5
	0,52	86,5	±20,5	2
[Lys ¹⁵ (Ac)]NT-II	0,23	431	±71	2
	0,29	369	±79	3
	0,47	158	±34	3
[Lys ²⁵ (Ac)]NT-II	0,11	382	±29	3
	0,23	316	±90	5
	0,46	275	±85	3
[Lys ²⁶ (Ac)]NT-II	0,23	297	±67	5
	0,46	236	±45	3
[Lys ⁴⁴ (Ac)]NT-II	0,11	621	±159	3
	0,23	316	±66	3
	0,45	182	±55	4
[Lys ⁴⁶ (Ac)]NT-II	0,26	572	±40	2
	0,52	316	±39	3
[Lys ⁴⁴ (SL)]NT-II *	0,44	305	±43	5
[Lys ²⁶ (SL)]NT-II *	0,23	478	±87,5	5

* SL — спиновая метка, (1-оксил-2,2,6,6-тетраметилпиперид-4-ил)ацетил.

потенциалов после действия нейротоксинов в определенной концентрации определяли период полуспада амплитуды (таблица). Данные о периоде полуспада позволили охарактеризовать относительную активность нейротоксина II и его производных. Активность всех производных, кроме нейротоксина II, ацетилированного по остатку лизина-46, слабо отличалась от таковой нейротоксина II. Последнее производное оказывало такое же биологическое действие при концентрациях в 2,3–2,4 раза больших, чем остальные вещества. Иными словами, активность этого вещества составляет около 40% активности исходного препарата.

Из таблицы видно, что введение в боковую цепь остатков лизина-26 и -44 вместо ацетильной группы более объемной спиновой метки приводит к уменьшению биологической активности.

Представляет интерес сопоставить данные электрофизиологических испытаний с токсичностью и данными о взаимодействии с препаратами ацетилхолинового рецептора как исследованных в данной работе соединений, так и гомологичных нейротоксинов и их производных. Ацетилирование аминогрупп нейротоксина II или введение спиновых меток вызывает наибольшее уменьшение токсичности (в 4–5 раз по сравнению с нативным нейротоксином II) при модификации остатков лизина-26 и -46 [7, 9]. Аналогичным образом, наибольшее уменьшение токсичности наблюдалось при ацетилировании гомологичных остатков лизина-27 и -47 (27 и 53) в эрабутоксине *b*, также принадлежащем к коротким нейротоксинам [5]. Следует отметить, что модификация одного и того же инвариантного остатка в нейротоксинах разного типа оказывает различное влияние на биологическую активность. Так, при ацетилировании остатка лизина-47 в эрабутоксине *b* токсичность падает почти в 10 раз [5], а при ацетилировании любой из аминогрупп (в том числе и гомологичного остатка лизина-53) в токсине *3 N. n. siamensis*, нейротоксине «длинного» типа, сохраняется около 70% исходной токсичности [3, 4]. Ацетилированные производ-

ные токсина *N. n. siamensis* лишь очень слабо отличаются от нативного токсина по способности блокировать нервную передачу на мышечных препаратах [10].

Изучение взаимодействия токсинов с изолированным ацетилхолиновым рецептором показало, что ацетилирование остатка лизина-47 в эрабутоксине *b* или данселирование остатков лизина-26 и -47 в «коротком» нейротоксине *N. haje* приводит к ухудшению константы связывания почти на два порядка [11, 12]. В случае нейротоксина II связывание с солибилизованным ацетилхолиновым рецептором не изменялось при ацетилировании остатка лизина-25 или -44, а при ацетилировании остатка лизина-26 константа диссоциации токсин-рецепторного комплекса возрастала в 5 раз [9]. Спицовые метки, связанные с остатками лизина-26 и лизина-46 нейротоксина II, наиболее сильно экранируются от внешней среды в токсин-рецепторных комплексах [9]. В целом прослеживается корреляция между токсичностью и эффективностью связывания различных токсинов и их производных с ацетилхолиновым рецептором. Обнаруженное в настоящей работе наибольшее подавление нейротоксической активности при ацетилировании остатка лизина-46 (53) согласуется с выводом о функциональной роли его аминокислотной группы, которая следует из рассмотренных выше данных по токсичности и связыванию с препаратами ацетилхолинового рецептора.

Так как активность исследованных в данной работе производных нейротоксина II близка к таковой нативного токсина или же уменьшилась примерно в 2 раза, полученные результаты подтверждают сделанный ранее вывод о том, что эти соединения являются близкими аналогами природного нейротоксина. Тот факт, что ни одна из аминокислот не оказалась абсолютно необходимой для проявления биологической активности, согласуется с существующими представлениями о сложном характере связывания нейротоксинов с ацетилхолиновым рецептором, в котором участвуют многие заряженные и гидрофобные группировки нейротоксила.

Экспериментальная часть

Получение ацетильных и сини-меченных производных нейротоксина II описано в предыдущих сообщениях [7, 8].

Для биологических испытаний использовали первично-мышечные препараты кожно-грудной мышцы *m. pectoris cutaneus* лягушек *Rana temporaria*. Развитие потенциала действия предотвращали добавлением в раствор Рингера ионов магния при соответствующем уменьшении концентрации ионов кальция. Потенциал концевой пластинки регистрировали при внутриклеточном отведении стеклянными электродами, заполненными 2,5 М КСl (сопротивление 5–10 МОм). Нерв раздражали 1 раз в 3 с прямоугольными импульсами тока длительностью 0,1 мс.

Статистическую обработку данных проводили с помощью ЭВМ «Hewlett-Packard 9830» с графопостроителем. Все опытные данные в цифровой форме вводили в ЭВМ, программа предусматривала различную обработку в зависимости от стадии эксперимента. Среднюю величину амплитуды потенциала концевой пластинки принимали за 100%. Массив данных в период времени, соответствующий падению амплитуды потенциала, обрабатывали по уравнению линейной регрессии [13–14]. При этом строили график уменьшения амплитуды во времени, что давало возможность определить ее период полуснада. Для каждой концентрации вещества проводили несколько опытов (число опытов указано в таблице) и определяли среднее время полуснада и величину средней квадратичной ошибки среднего.

ЛИТЕРАТУРА

1. Karlsson E. In: Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology / Ed. Lee C. Y. Berlin: Springer Verlag, 1979, v. 52, p. 159–212.
2. Yang C. C., Chang C. C., Liou I. F. Biochim. et biophys. acta, 1974, v. 365, № 1, p. 1–14.
3. Karlsson E., Eaker D. J. Formosan Med. Assoc., 1972, v. 71, p. 358–371.

4. Karlsson E., Eaker D., Ponterius G. *Biochim. et biophys. acta*, 1972, v. 257, № 1, p. 235-248.
5. Hori H., Tamiya N. *Biochem. J.*, 1976, v. 153, № 2, p. 217-222.
6. Chicheportiche R., Rochat C., Sampieri F., Lazdunski M. *Biochemistry*, 1972, v. 11, № 9, p. 1681-1691.
7. Tsetlin V. I., Arseniev A. S., Utkin Y. N., Gurevich A. Z., Senyavina L. B., Bystrov V. F., Ivanov V. T., Ovchinnikov Y. A. *Eur. J. Biochem.*, 1979, v. 94, № 2, p. 337-346.
8. Utkin Y. N., Pashkov V. S., Surin A. M., Tsetlin V. I., Ivanov V. T. In: *Peptides 1978* / Eds Semion I. Z., Kupriszewski G. Wroclaw University Press, 1979, p. 397-400.
9. Tsetlin V. I., Karlsson E., Arseniev A. S., Utkin Y. N., Surin A. M., Pashkov V. S., Pluzhnikov K. A., Ivanov V. T., Bystrov V. F., Ovchinnikov Y. A. *FEBS Lett.*, 1979, v. 106, № 1, p. 47-52.
10. Libelius R. J. *Neural Transmission*, 1974, v. 35, p. 137-149.
11. Ishikawa Y., Menez A., Hori H., Yoshida H., Tamiya N. *Toxicon*, 1977, v. 15, p. 477-488.
12. Chicheportiche R., Vincent G.-P., Kopeyan C., Schweitz H., Lazdunski M. *Biochemistry*, 1975, v. 14, № 10, p. 2081-2091.
13. Плохинский Н. А. *Биометрия*. Изд-во МГУ, 1970.
14. Вознесенский В. Л. *Первичная обработка экспериментальных данных*. Л.: Наука, 1969.

Поступила в редакцию
21.IX.1981

EFFECT OF ACYLATION OF LYSINE RESIDUES IN *NAJA NAJA OXIANA* NEUROTOXIN II ON ITS ACTIVITY

BLINOV N. O., TSETLIN V. I., UTKIN Yu. N., ANANINA V. A.,
MAKAROVA O. D.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

An electrophysiological study was carried out, using a m. cutaneus pectoris muscle of *Rana temporaria* frog, of a series of *Naja naja oxiana* neurotoxin II derivatives modified at a single lysine residue - Lys 15, Lys 25, Lys 26, Lys 44, or Lys 46. Acyl group incorporation at Lys 46 diminished the biological activity about 2,5-fold, while there was no considerable change in the activity of other derivatives.