



УДК 577.112.5 : 591.145.2-365

ДИСУЛЬФИДНЫЕ СВЯЗИ В НЕЙРОТОКСИНЕ-III ИЗ АКТИНИИ  
*RADIANTHUS MACRODACTYLUS*

Зыкова Т. А., Козловская Э. П.

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО  
Академии наук СССР, Владивосток

На основании данных, полученных при изучении цистеинсодержащих пептидов образующихся при последовательном гидролизе нативного нейротоксина-III (RTX-III) из морской актинии *Radianthus macrodactylus* глутаминовой протеиназой и трипсином показано, что дисульфидные связи в RTX-III образованы остатками Cys<sup>3</sup>—Cys<sup>43</sup>, Cys<sup>5</sup>—Cys<sup>33</sup>, Cys<sup>26</sup>—Cys<sup>41</sup>.

Морская актиния *Radianthus macrodactylus* продуцирует пять гомологичных полипептидов (RTX-I — RTX-V), которые вместе с токсинами из *R. paumotensis* [1] и *Stoichactis helianthus* [2] образуют новый структурный класс анемотоксинов (R-токсины) [3, 4]. Подобно токсинам первого класса (A-токсинам) [5] они замедляют и делают неполным процесс инактивации быстрых натриевых каналов электровозбудимых мембран [6]. Степень гомологии внутри каждого класса токсинов достигает очень высокого уровня (98%), тогда как между классами не превышает 40%. Структура анемотоксинов стабилизирована тремя внутримолекулярными дисульфидными связями, положение которых определено только для A-токсинов [5, 7, 8].

Локализацию дисульфидных связей в R-токсинах проводили на молекуле RTX-III, который наиболее токсичен для млекопитающих.

При определении положения дисульфидных мостиков в белках выбирают условия, при которых можно исключить обмен S—S-связей. Известно, что такие обменные реакции происходят в меньшей степени в кислой среде, поэтому классическим приемом в структурных исследованиях является использование для гидролиза белка термолизина [9]. Этот фермент имеет оптимум pH в нейтральной среде и не разрушает дисульфидные связи белков. Термолизин был использован для определения дисульфидных связей в случае A-токсинов [7, 8, 5]. Хотя положение остатков цистеина аналогично для обоих классов токсинов, мы не смогли использовать термолизин для структурных исследований в случае RTX-III, поскольку в N-концевой (-C<sup>3</sup>-R-C<sup>5</sup>-) и C-концевой (-E<sup>42</sup>-C-C-R-K-K-K<sup>48</sup>) последовательностях этого токсина отсутствуют гидрофобные аминокислотные остатки, которые могут атаковываться термолизинном. Искомое расщепление полипептидной цепи токсина было достигнуто при последовательном гидролизе нативного RTX-III глутаминовой протеиназой и трипсином. Продукты гидролиза были разделены ВЭЖХ на колонке Zorbax C<sub>18</sub> (рис. 1). Для всех выделенных пептидов определен аминокислотный состав и N-концевая аминокислота. Для локализации S—S-связей были выбраны три цистеинсодержащих фрагмента: H-1, H-2, H-3 (рис. 1, табл. 1). Из анализа аминокислотного состава фрагмента H-1 однозначно следовало наличие дисульфидной связи в положении 5—33 (схема, 1а). Фрагмент H-2, содержащий все три дисульфидные связи, в дальнейшем не исследовали. Фрагмент H-3, согласно данным аминокислотного анализа, содержал две S—S-связи. Возможны два варианта структуры этого фрагмента (схема, 1б). Из приведенных на схеме двух возможных структур фрагмента H-3 видно, что если разрушить пептидную связь Cys<sup>43</sup>—Cys<sup>44</sup>, то из аминокислотного состава полученных пептидов можно получить информацию о локализации двух мостиков в токси-

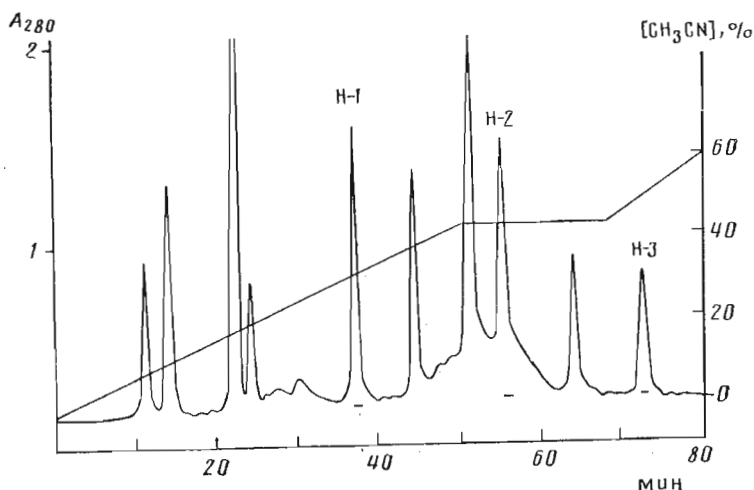


Рис. 1

Рис. 1. ВЭЖХ гидролизата RTX-III стафилококковой глутаминовой протеиназой и трипсином на колонке Zorbax C<sub>18</sub> (4,6 × 250 мм) в градиенте концентрации ацетонитрила в 0,05 М ацетат-аммонийном буфере, рН 6,2. Скорость элюции 1,2 мл/мин.

Отмечены отбираемые фракции

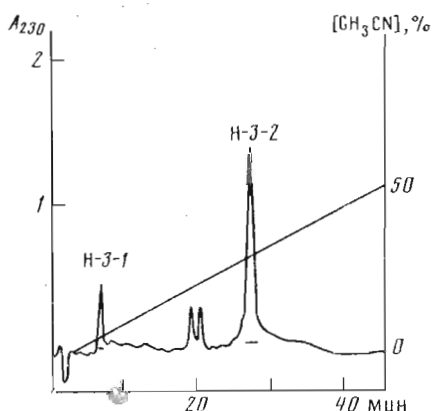


Рис. 2. ВЭЖХ фрагмента Н-3 после деградации по Эдману на колонке Ultrasphere IP (4,6 × 250 мм) в градиенте концентрации ацетонитрила в 0,05 М натрий-ацетатном буфере, рН 5,8. Скорость элюции 1 мл/мин

не RTX-III. Для разрыва пептидной связи была использована деградация по Эдману. Образовавшиеся пептиды были разделены ВЭЖХ на колонке Ultrasphere IP (рис. 2). Из анализа аминокислотного состава пеп-

Таблица 1

Таблица 2

Аминокислотный состав цистеинсодержащих фрагментов, полученных при последовательном гидролизе нативного RTX-III стафилококковой глутаминовой протеиназой и трипсином

Аминокислотный состав пептидов, полученных после деградации по Эдману фрагмента Н-3

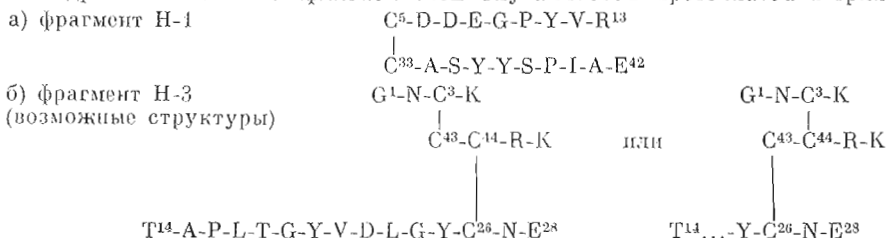
Аминокислота	Н-1	Н-2	Н-3
Cys (С.п)	1,50 (2)	5,65 (6)	3,53 (4)
Asx	2,15 (2)	4,52 (5)	2,71 (3)
Glx	1,72 (2)	2,61 (3)	1,12 (1)
Thr		2,30 (2)	2,21 (2)
Ser	1,69 (2)	1,75 (2)	
Gly	1,17 (1)	3,11 (3)	2,71 (3)
Ala	1,68 (2)	3,21 (3)	0,82 (1)
Pro	2,15 (2)	1,82 (2)	1,12 (1)
Val	0,79 (1)	0,91 (1)	1,21 (1)
Ile	0,90 (1)	1,21 (1)	
Leu		2,12 (2)	1,75 (2)
Lys		1,65 (2)	2,15 (2)
Tyr	2,71 (3)	3,61 (4)	2,21 (2)
Arg	0,80 (1)	0,81 (1)	1,15 (1)
Н-концевая	Cys	Gly, Cys,	Gly, Cys,
Шелк. دنب		Thr	Thr
фрагмента	5-13;	5-8; 33-42;	1-4;
та	33-42	11-4; 14-28;	13-23;
		43-46	43-46

Аминокислота	Н-3-1	Н-3-2
Cys (С.п)	1,75 (2)	1,52 (2)
Asx	1,25 (1)	2,21 (2)
Thr		1,10 (1)
Glu		0,75 (1)
Pro		0,90 (1)
Gly		2,11 (2)
Ala		1,10 (1)
Val		1,21 (1)
Leu		1,82 (2)
Tyr		1,53 (2)
Lys	0,75 (1)	0,92 (1)
Arg		0,65 (1)
Количество остатков	4	17
Н-концевая аминокислота	Asn	Cys, Ala

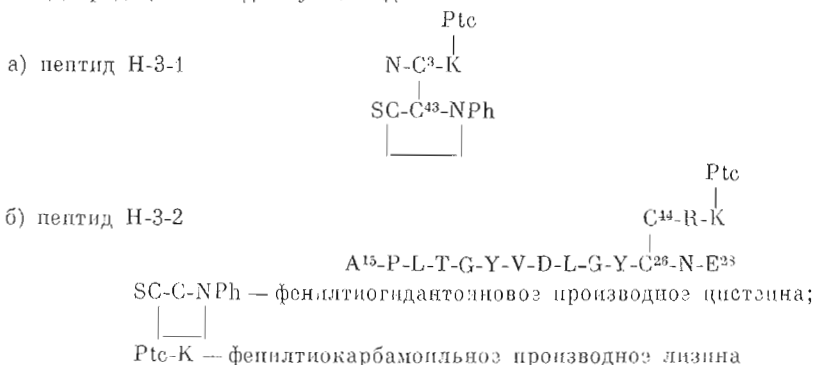
тидов Н-3-1 и Н-3-2 (табл. 2) следует положение дисульфидных связей:  $Cys^{26}-Cys^{44}$  и  $Cys^3-Cys^{43}$  (схема, II).

Локализация дисульфидных связей в нейротоксине-III из *B. macrodactylus*

I. Гидролиз RTX-III стафилококковой глутаминовой протеиназой и трипсином:



II. Деградация по Эдману пептида Н-3:



Итак, положение дисульфидных связей в молекуле RTX-III (рис. 3) идентично их положению в А-токсинах [5, 7, 8]. Из этого факта следует предположение, что, по-видимому, все R-токсины имеют такое же поло-

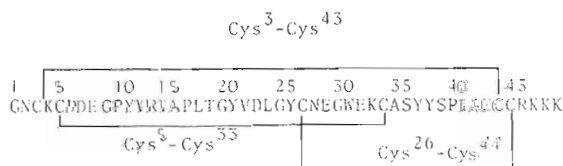


Рис. 3. Аминокислотная последовательность RTX-III [10] с учетом дисульфидных связей

жение дисульфидных связей, как у RTX-III, поскольку степень их гомологии с последним значительно выше, чем у А-токсинов. Кроме того, консервативность положения дисульфидных связей для обоих классов токсинов является подтверждением важной роли остатков цистеина в формировании третичной структуры анемотоксинов.

### Экспериментальная часть

В работе использовали трипсин (Worthington, США), глутаминовую протеиназу из *Staphylococcus aureus* V8 (Mannheim, Англия), реактивы для метода Эдмана (Beckman, США). Все остальные реактивы имели квалификацию ос. ч.

Токсин-III выделяли по методу [3].

Аминокислотный анализ. Пептид (2,5 нмоль) гидролизовали по методу [11]. Аминокислотный состав определяли на анализаторе Biotronic LC 5000/LC 5001 (Biotronic, ФРГ). Цистеин определен в виде карбоксиметил-цистеина.

*N*-Концевые аминокислоты определяли по методу [12]. Дансильные производные аминокислот идентифицировали двумерной ТСХ на пластинках (5 × 5 см) с закрепленным слоем силикагеля [13].

Дегградацию по Эдману пептида Н-3 проводили по методу [14]. При этом обычную экстракцию этилацетатом не использовали из-за возможного перехода короткого пептида в слой этилацетата. ВЭЖХ полученных пептидов осуществляли на колонке Ultrasphere IP (рис. 2).

Последовательный гидролиз токсина стафилококковой глутаминовой протеиназой и трипсином. 100 нмоль белка растворяли в 150 мкл 0,05 М аммоний-бикарбонатного буфера, рН 8,0, добавляли стафилококковую глутаминовую протеиназу (1 : 20) и инкубировали 5 ч при 37° С. Затем добавляли трипсин (1 : 50) и оставляли раствор при 20° С на 7—8 ч. Гидролиз останавливали ледяной уксусной кислотой (20 мкл) и раствор замораживали. Пептиды разделяли ВЭЖХ на колонке Zorbax C<sub>18</sub> (рис. 1).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Wemmer D. E., Kumar N. V., Mettrion R. M., Lazdunski M., Drobny G., Kallenbach N. R. // *Biochemistry*. 1986. V. 25. № 22. P. 6842—6849.
2. Kem W. R., Dunn B. M., Parten B., Price D. // *Abst. Toxicol.* 1985. V. 23. № 4. P. 580.
3. Зыкова Т. А. Исследование первичной структуры биологически активных пептидов актинии *Radianthus macrodactylus*: Дис. ... канд. хим. наук. Владивосток: ТИБОУ, 1986. С. 93—94.
4. Schweitz H., Bidard J.-N., Frelin C., Pauron D., Vijverberg H. P. M., Mahashed D. M., Lazdunski M., Vilbois F., Tsugita A. // *Biochemistry*. 1985. V. 24. № 14. P. 3554—3561.
5. Sunahara S., Muramoto K., Tenma K., Kamiya H. // *Toxicol.* 1987. V. 25. № 2. P. 211—219.
6. Сорокина Э. А., Чижмаков И. В., Еляков Г. В., Козловская Э. П., Возжова Е. И. // *Физиол. журн.* 1984. Т. 30. № 5. С. 571—579.
7. Wunderer G. // *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 1978. V. 359. № 9. P. 1193—1201.
8. Norton T. R. // *Fed. Proc.* 1981. V. 40. № 1. P. 21—25.
9. Henrikson R. L. // *Meth. Enzymol.* 1977. V. 47. Part E. P. 175—189.
10. Зыкова Т. А., Винокуров Л. М., Козловская Э. П., Еляков Г. В. // *Биоорган. химия*. 1985. Т. 11. № 3. С. 302—310.
11. Scheffer J. J., Tsugita A., Linden G., Schweitz H., Lazdunski M. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1982. V. 107. № 1. P. 272—278.
12. Gray W. R. // *Meth. Enzymol.* 1967. V. 11. P. 139—151.
13. Белецкий Б. Г., Ганкина Е. С., Нестеров В. В. // *Докл. АН СССР*. 1967. Т. 172. № 1. С. 91—93.
14. Gray W. R., Hartly B. S. // *Biochem. J.* 1963. V. 89. № 2. P. 379—380.

Поступила в редакцию  
2.XI.1988

#### DISULFIDE BONDS IN NEUROTOXIN-III FROM SEA ANEMONE *RADIANTHUS MACRODACTYLUS*

ZYKOVA T. A., KOZLOVSKAYA E. P.

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

Positions of the three disulfide bridges in neurotoxin-III (RTX-III) from sea anemone *Radianthus macrodactylus* were determined: Cys<sup>3</sup>—Cys<sup>43</sup>, Cys<sup>5</sup>—Cys<sup>33</sup>, Cys<sup>26</sup>—Cys<sup>44</sup>. The cystine-containing peptides obtained by the staphylococcal proteinase/trypsin digestion of the intact RTX-III were investigated.