



УДК 577.334

**СПИН-МЕЧЕННЫЙ ПО Lys35 ЦИТОТОКСИН II ИЗ ЯДА КОБРЫ
Naja oxiana ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ЕГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
С ФОСФОЛИПИДНЫМИ МЕМБРАНАМИ МЕТОДОМ ЭПР**© 1999 г. Ю. Н. Уткин[#], П. В. Дубовский, М. А. Дубинный*, В. А. Жаравин,
Т. Н. Симонова, Л. И. Барсуков, А. С. АрсеньевИнститут биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая 16/10;

*Московский физико-технический институт, Москва

Поступило в редакцию 03.08.99 г. Принято к печати 17.08.99 г.

После модификации цитотоксина II *Naja oxiana* *N*-оксисукцинимидным эфиром 2,2,5,5-тетраметилпирролин-*N*-оксил-3-карбоновой кислоты и последующего разделения реакционной смеси с помощью ионообменной и обращенно-фазовой ВЭЖХ получены спин-меченые производные токсина, содержащие метки в различных положениях аминокислотной последовательности. В одном из них, очищенном до гомогенного состояния, установлено положение метки на Lys35. Показано, что полученное производное может быть использовано для изучения взаимодействия цитотоксина II с фосфолипидными мембранами методом ЭПР.

Ключевые слова: цитотоксин II; модификация; спиновые метки; метод ЭПР; фосфолипидные мембраны.

Цитотоксины из ядов змей представляют собой сильно основные белки с молекулярной массой 6–7 кДа [1]. Отличительная особенность этих полипептидов – их ярко выраженная способность взаимодействовать с клеточными и модельными фосфолипидными мембранами [2], однако механизм действия цитотоксинов на мембраны пока еще не установлен. Один из подходов к решению данной проблемы состоит в изучении взаимосвязи полиморфных изменений мембраны, наблюдаемых при действии цитотоксина [3], с топологией токсина в мембране. Эта задача может быть решена с помощью спектроскопии ЭПР на основе недавно разработанного метода градиента доступности (collision gradient method), позволяющего определять глубину проникновения в фосфолипидную мембрану нитроксильного радикала, ковалентно связанного с молекулой белка [4]. Необходимое условие применения этого метода – наличие селективно меченного белка с заданным положением метки в полипептидной цепи. В работе описан метод получения селективно спин-меченых аналогов цитотоксина II (ЦТ II) яда среднеазиатской кобры *Naja oxiana* и показана возможность применения одного из них для изу-

чения взаимодействия цитотоксина с фосфолипидными мембранами методом ЭПР.

Для селективного введения спиновых меток на аминокислоты ЦТ II использовали *N*-оксисукцинимидный эфир 2,2,5,5-тетраметилпирролин-*N*-оксил-3-карбоновой кислоты, при этом для преимущественного образования мономеченых производных мольное соотношение токсин/реагент составляло 1 : 1.8. Разделение полученных производных проводили ионообменной хроматографией на колонке Spherogel TSK CM-2SW (рис. 1а). Фракцию 3, очищенную до гомогенного состояния с помощью обращенно-фазовой хроматографии (рис. 1б), использовали в дальнейших исследованиях. Для установления положения метки данное спин-меченое производное после пиридилэтилирования и выделения продукта обращенно-фазовой хроматографией подвергали триптическому гидролизу. Анализ продуктов гидролиза методом MALDI-масс-спектрометрии обнаружил продукт с молекулярной массой 1649, соответствующий фрагменту 24–36, содержащему спиновую метку. Отсутствие расщепления после Lys35 свидетельствует о присоединении к нему спиновой метки. Следует отметить, что ацетилирование аналогичного остатка лизина в гомологичном токсине γ кобры *Naja nigricollis* приводило к незначительному уменьшению его биологической активности [5].

Сокращения: ЭПР – электронный парамагнитный резонанс; ЦТ II – цитотоксин II; PC – яичный фосфатидилхолин; DMPC – димиристоилфосфатидилглицерин; MALDI – matrix-assisted laser desorption ionization.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 330-73-74; e-mail: utkin@ibch.siobc.ras.ru).

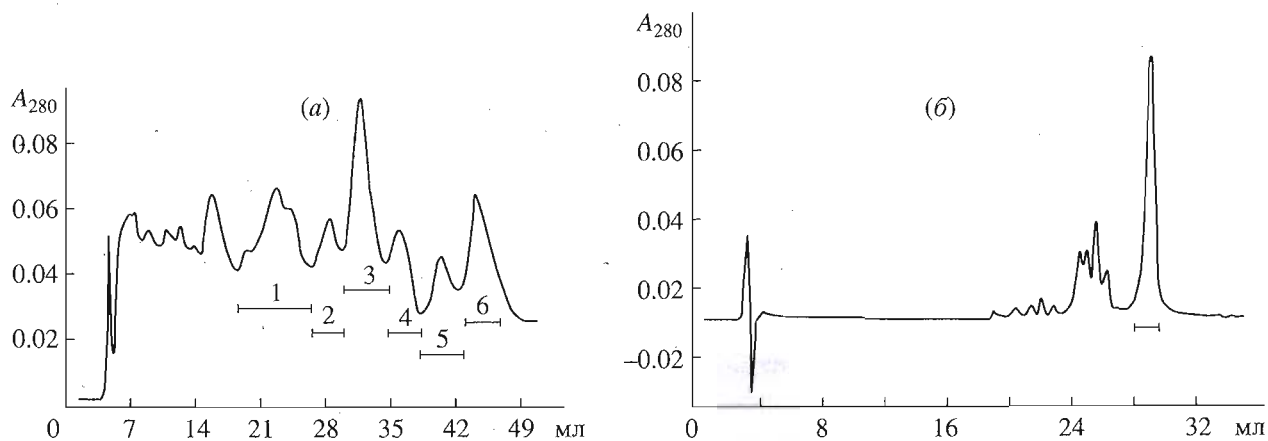


Рис. 1. Выделение спин-меченого по Lys35 ЦТ II. (а) – разделение спин-меченых производных ЦТ II на колонке Spherogel TSK CM-2SW (4.6×250 мм) в градиенте концентрации ацетата аммония от 0.5 до 0.8 М (рН 7.5). Скорость элюции 0.7 мл/мин. (б) – хроматография фракции 3 на колонке Vudac C18 (4.6×250 мм) в градиенте ацетонитрила в воде (от 20 до 50% за 30 мин) в присутствии 0.1% TFA. Скорость элюции 1 мл/мин. Отмечена исследованная фракция.

Спектр ЭПР полученного производного в водном растворе представлен на рис. 2а. В присутствии моноламеллярных липосом, приготовленных методами экструзии из смеси PC/DMPG (9 : 1, моль/моль), спектр характеризуется наличием двух компонент (рис. 2б), одна из которых соответствует токсину в водном растворе, а вторая, относительное содержание которой растет с увеличением соотношения липид/белок, очевидно, может быть отнесена к токсину, связанному с мембраной. В растворах небольшой ионной силы в присутствии избытка липосом из PC/DMPG регистрируется только спектральная компонента, отвечающая мембраносвязанному белку (см. рис. 2в). При использовании цвиттер-ионных мембран из PC также наблюдается связывание ЦТ II (рис. 2г), однако в этом случае даже при большом мольном избытке PC остается сигнал свободного токсина (рис. 2г). Следовательно, ассоциация цитотоксина с фосфолипидными мембранами возрастает в присутствии DMPG, а также при уменьшении ионной силы среды, и значит этот процесс определяется не только гидрофобными, но и электростатическими взаимодействиями. Спектры, представленные на рис. 2, позволяют оценить количество связанного с мембраной токсина путем интегрирования соответствующих компонент, что дает возможность получить изотермы взаимодействия цитотоксина с мембраной.

Таким образом, нами впервые получено моноспин-меченое производное цитотоксина II, взаимодействие которого с фосфолипидными мембранами различных типов эффективно регистрируется методом ЭПР. Анализ этого взаимодействия в рамках модели Гуи–Чапмена [6] должен позволить определить эффективный заряд токсина, константу его связывания с фосфолипидным бислоем и охарактеризовать специфичность биоло-

гического действия цитотоксина на мембраны различных типов.

Финансовая поддержка работы осуществлялась грантом “Университеты России – фунда-

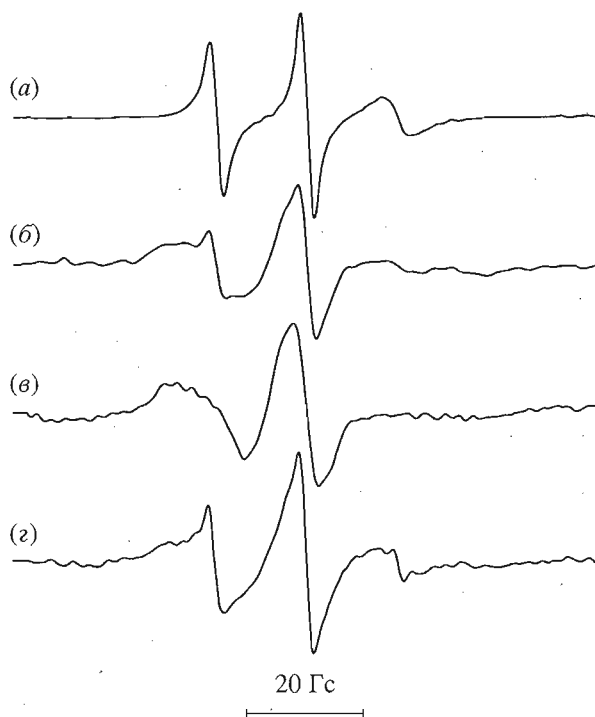


Рис. 2. Спектры ЭПР спин-меченого по Lys35 цитотоксина: в 25 мМ MES-буфере (рН 5.2) в отсутствие (а) и в присутствии (б) фосфолипидных везикул PC/DMPG (9 : 1, моль/моль) диаметром ~100 нм (липид/белок = 120 : 1, моль/моль) и 50 мМ KCl; (в) – то же, что и (б), но в отсутствие KCl (липид/белок = 100 : 1); (г) – в присутствии PC-везикул (липид/белок = 180 : 1). Во всех случаях температура образца составляла 22°C, концентрация токсина 20 мкМ.

ментальные исследования" № 414/98/1ДП и грантом ГНТП "Новейшие методы биоинженерии" № 03.0001-306.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dufton M.J. // J. Mol. Evol. 1984. V. 20. P. 128–134.
2. Kumar T. K., Jayaraman G., Lee C. S., Arunkumar A. I., Sivaraman T., Samuel D., Yu C. // J. Biomol. Struct. Dyn. 1997. V. 15. P. 431–463.
3. Batenburg A.M., Bougis P.E., Rochat H., Verkleij A.J., de Kruijff B. // Biochemistry. 1985. V. 24. P. 7101–7110.
4. Altenbach C., Greenhalgh D. A., Khorana H. G., Hubbell W.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. P. 1667–1671.
5. Gatineau E., Takechi M., Bouet F., Mansuelle P., Rochat H., Harvey A.L., Montenay-Garestier Th., Menez A. // Biochemistry. 1990. V. 29. P. 6480–6489.
6. Beschiaschvili G., Seelig J. // Biochemistry. 1990. V. 29. P. 52–58.

The *Naja oxiana* Venom Cytotoxin II Spin-Labeled at Lys35 for the EPR Study of Its Interaction with Phospholipid Membranes

Yu. N. Utkin^{**}, P. V. Dubovskii^{*}, M. A. Dubinnyi^{**},
V. A. Zharavin^{*}, T. N. Simonova^{*}, L. I. Barsukov^{*}, and A. S. Arseniev^{*}

^{*}Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia

^{**}Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, Russia

The modification of cytotoxin II from *Naja oxiana* by *N*-succinimide ester of 2,2,5,5-tetramethylpyrroline-*N*-oxyl-3-carboxylic acid led to a mixture of spin-labeled derivatives of this toxin. One of these derivatives, purified to a homogenous state by successive ion-exchange chromatography and reverse-phase HPLC, was shown to contain a single label at Lys35 and to be usable in the EPR studying of the cytotoxin II interaction with phospholipid membranes.

Key words: EPR method, cytotoxin II, modification, phospholipid membranes, spin labels

[#]To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 330-7374; e-mail: utkin@ibch.siobc.ras.ru.