



УДК 557.3.08 : 543.424 : 547.96

ИССЛЕДОВАНИЕ КОНФОРМАЦИОННОЙ СТАБИЛЬНОСТИ ТОКСИНА I  
ИЗ АКТИНИИ *RADIANTHUS MACRODACTYLUS*Набиуллин А. А., Одинокоев С. Е., Вожжова Е. И.,  
Козловская Э. И., Еляков Г. В.Тихоокеанский институт биоорганической химии  
Дальневосточного научного центра АН СССР, Владивосток

Методом КД изучено влияние растворителей, температуры и рН среды на конформационное состояние полипептидного токсина RTX-I. Показано, что 60% метанол не оказывает влияния на конформацию RTX-I, тогда как 2,2,2-трифторэтанол вызывает изменение как вторичной, так и третичной структуры токсина. При рН-титровании раствора RTX-I в щелочной области (рН 9–12) наблюдалось изменение его спектров в диапазоне 230–310 нм, обусловленное ионизацией остатков тирозина. Как показало исследование токсичности RTX-I, эта ионизация не вызывает функционально значимых изменений его пространственной структуры. Нагревание раствора RTX-I выше 40°С приводит к обратимой тепловой денатурации белка, которая хорошо описывается термодинамической моделью двух состояний. Получено значительное изменение энтальпии этого процесса. Токсичность раствора RTX-I, выдержанного при различных температурах вплоть до 80°С, не изменяется.

В последние годы из различных видов актиний выделены близкие по структуре и свойствам низкомолекулярные токсины, обладающие специфическим действием на возбудимые мембраны и образующие новый класс полипептидных токсинов животных [1]. Большинство описанных токсинов актиний (анемонотоксинов) имеет близкие молекулярные массы (около 5000), сильную основность, три дисульфидные связи на молекулу и высокое содержание гидрофобных аминокислотных остатков. Исходя из сходства перечисленных физико-химических свойств и структурного строения [2–4], токсин I из актинии *Radianthus macrodactylus*\* (RTX-I) относят к описанному выше классу полипептидных токсинов.

В настоящей работе методом КД изучено влияние растворителей, изменения температуры и рН среды на конформационное состояние TX-I и эти результаты сопоставлены с его физиологической активностью.

**Влияние растворителей.** Спектр КД водного раствора RTX-I (рис. 1) по положению и интенсивности полос соответствует ранее опубликованным спектрам КД анемонотоксинов AP-A [5] и ATX-II [6]. Подробное описание спектра КД и отнесение полос RTX-I было проведено ранее [4].

Сопоставление спектров водного раствора RTX-I и раствора в 60% метаноле не обнаруживает значительных различий как в пептидной области (190–250 нм), так и в области переходов ароматических аминокислотных остатков (250–300 нм). Подобное сходство спектров КД водного и 90% этанольного растворов было также установлено для антоплеурина А [5]. Анализ спектра КД раствора RTX-I в 2,2,2-трифторэтаноле показывает, что этот растворитель приводит к сдвигу полос в пептидной области, указывающему на увеличение доли  $\alpha$ -спирали в молекулах RTX-I [7], и существенным изменениям спектра в области 230–300 нм (рис. 1). Поскольку конформация анемонотоксинов поддерживается значительной долей упорядоченных структур [4], стабилизируемых водородными связями, столь различное влияние метанола и трифторэтанола может быть объяснено разными протонодонорными способностями этих спиртов. Работы Йогансена и др. [8, 9] показали, что факторы кислотности воды, метанола

\* В предварительных сообщениях [2, 3] данная актиния ошибочно определена как *Homostichantus duerdemi*.

и этанола сравнимы между собой, а воды и трифторэтанола различаются почти в 2 раза. Способность трифторэтанола образовывать более прочные водородные связи, по-видимому, вызывает стабилизацию  $\alpha$ -спирали и увеличение ее доли во вторичной структуре RTX-I.

**Влияние температуры.** Молекулы всех исследованных ранее анемоноксигенов при относительно малой длине полипептидной цепи (27–51 остаток) имеют три дисульфидные связи [1]. Эта особенность, вероятно, обуславливает конформационную жесткость их молекул и играет важную роль в наблюдаемой термостабильности RTX-I.

Исследование спектров КД водного раствора RTX-I в пептидной области (рис. 2а) и области переходов ароматических остатков (рис. 2б) показывает, что при повышении температуры раствора от 40 до 80°С белок претерпевает полностью обратимый конформационный переход. Существование изохроичных точек (254, 219 и 194 нм) на температурных спектрах КД свидетельствует о термодинамическом равновесии в растворе нативных и денатурированных форм токсина. Следовательно, наблюдаемый процесс можно описывать с помощью термодинамической модели двух состояний. Это позволило ввести константу равновесия и рассчитать изменение энтальпии ( $\Delta H$ ) этого процесса. Значения  $\Delta H$ , рассчитанные по максимумам КД при 201 и 275 нм (65 и 75 ккал/моль соответственно), хорошо согласуются между собой и несколько выше изменения энтальпии денатурационного перехода в глобулярных белках (40–60 ккал/моль [10]). Более величины  $\Delta H$ , полученные по максимумам КД в пептидной и ароматической областях, показывают, что наблюдаемый конформационный переход в одинаковой мере затрагивает как вторичную, так и третичную структуры RTX-I.

Параллельное исследование токсичности раствора RTX-I, выдержанного в течение 1 ч при соответствующих температурах, показало, что нагревание вплоть до 80°С не изменяет летальную дозу токсина RTX-I.

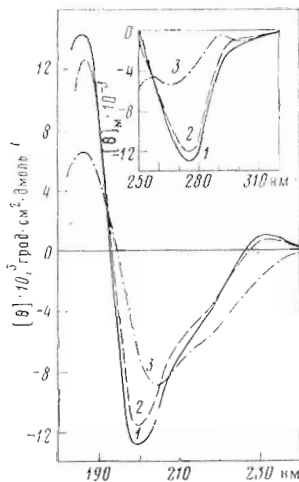


Рис. 1. Спектры КД растворов RTX-I в воде (1), 60% метаноле (2) и 2,2,2-трифторэтаноле (3)

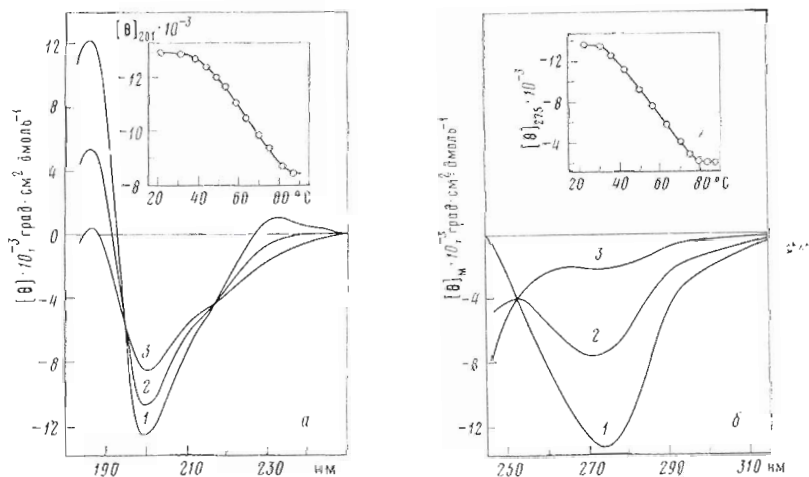


Рис. 2. Спектры КД водного раствора RTX-I при температурах: 21 (1), 60 (2) и 85°С (3) в области 190–250 (а) и 250–300 нм (б). На вставках приведены температурные зависимости максимумов 201 и 275 нм

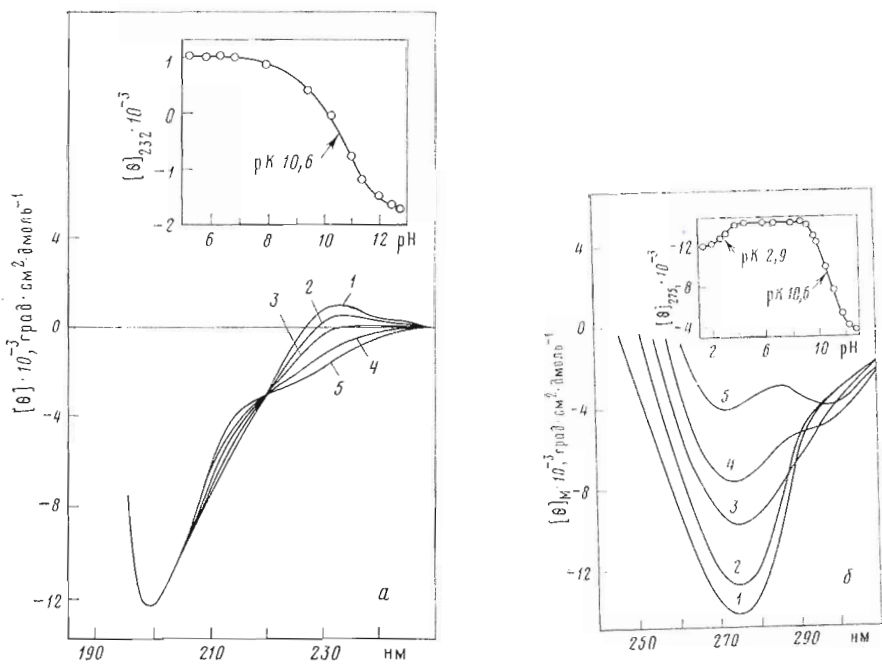


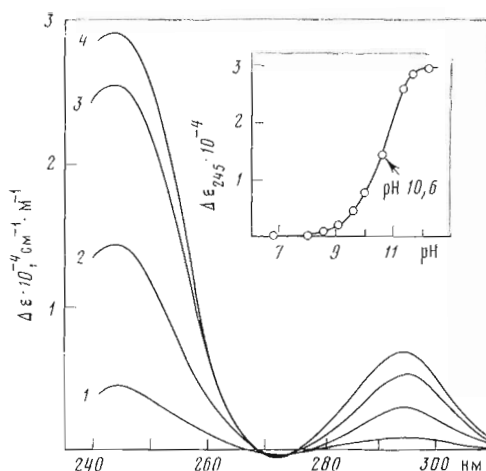
Рис. 3. Спектры КД растворов RTX-I в 0,1 М NaCl при pH: 6,8 (1); 9,5 (2); 10,5 (3); 12,0 (4) и 12,6 (5). На вставках приведены pH-зависимости максимумов 232 и 275 нм

**pH-Титрование.** Влияние pH среды на конформационное состояние RTX-I было изучено с помощью методов КД и дифференциальной УФ-спектроскопии. На рис. 3 представлены спектры КД растворов RTX-I в 0,1 М NaCl при значениях pH > 7. В кислом и нейтральном диапазонах pH изменений в пептидной области спектров КД не наблюдалось. В области 250–300 нм было замечено небольшое уменьшение интенсивности полосы при 275 нм (pK 2,9), что соответствует ионизации одной или нескольких карбоксильных групп в непосредственной близости к ароматическим остаткам RTX-I (рис. 3б). Положение и интенсивность полосы при 201 нм оставались неизменными также и в щелочной области pH (рис. 3а), что указывает на стабильность вторичной структуры RTX-I во всем исследованном диапазоне pH (1,4–12,6). Изменение спектров КД в области 250–300 нм, а также в области полосы 232 нм, отнесенной нами ранее [4] к переходам ароматических остатков, свидетельствует об ионизации остатков тирозина RTX-I (наблюдаемое pK 10,6) и возможном изменении его третичной структуры при увеличении значений pH > 9.

Согласно дифференциальным УФ-спектрам растворов RTX-I (рис. 4), при pH > 9 происходит ионизация фенольных групп тирозина. Значение  $\Delta\epsilon_{245} \approx 30\,000$  отвечает ионизации всех трех остатков тирозина RTX-I при pH 12 (для одного тирозинила  $\Delta\epsilon_{245} \approx 10\,000$  [11]), а кривая pH-зависимости  $\Delta\epsilon_{245}$  имеет простую S-образную форму с единственной точкой перегиба при pH 10,6. Полученное значение pK несколько выше значения pK свободного тирозинила (по данным спектрофотометрии [11], pK 9,7). Возможно, это связано с тем, что остатки тирозина в нативном токсине частично замаскированы в белковой глобуле. Титрование в щелочной области pH, по-видимому, приводит к изменению третичной структуры RTX-I, что обуславливает полную доступность его остатков тирозина при pH 12 и выше.

Для изучения обратимости этого конформационного перехода нами было проверено влияние pH раствора RTX-I на величину его летальной дозы (ЛД<sub>100</sub>). Результаты показали, что значение ЛД<sub>100</sub> сохраняется при выдерживании RTX-I в течение 1 сут в растворах, значение pH которых менялось в диапазоне 1,4–12,5. Сопоставление этих результатов и дан-

Рис. 4. Дифференциальные УФ-спектры растворов RTX-I в 0,1 М NaCl при pH: 9,6 (1); 10,6 (2); 11,3 (3) и 12,3 (4). На вставке приведена pH-зависимость максимума разностного поглощения при 245 нм. В кювете сравнения был помещен раствор RTX-I в 0,1 М NaCl при pH 6,5



ных спектральных методов показывает, что если в щелочной области pH (9–12) существует конформационный переход, то он затрагивает лишь третичную структуру токсина и является обратимым. Следовательно, ионизация фенольных групп RTX-I не вызывает функционально значимых необратимых изменений его пространственной структуры.

### Экспериментальная часть

Токсин RTX-I выделен по методу, описанному ранее [2].

Спектры КД регистрировали на приборе Dichrograph III (Jobin-Yvon) в диапазоне 185–330 нм при концентрации RTX-I ~1 мг/мл. pH-Титрование раствора RTX-I в 0,1 М NaCl проводили добавлением 0,5–6 М растворов HCl и NaOH. Значение pH контролировали с помощью pH-метра pH ASAR-I (Beckman). УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Beckman Acta M VI.

Для записи спектров КД при повышенных температурах использовали специальный кюветный держатель, термостатируемый с точностью 0,5° С током воды. Константу равновесия  $K$  процесса тепловой денатурации RTX-I определяли из концентрации нативных  $[N]$  и денатурированных  $[D]$  молекул

$$K = [D]/[N] = \frac{[\theta]_T - [\theta]_N}{[\theta]_D - [\theta]_T},$$

где  $[\theta]_T$  — наблюдаемая эллиптичность при температуре  $T$ ,  $[\theta]_N$  и  $[\theta]_D$  — эллиптичности нативного и денатурированного белков соответственно. Изменение энтальпии  $\Delta H$  было оценено по наклону прямой зависимости  $\ln K$  от  $1/T$ . Молекулярную эллиптичность  $[\theta]_M$  (в области 250–310 нм) и эллиптичность, приведенную на среднюю молекулярную массу аминокислотного остатка ( $M$  106), выражали в единицах град·см<sup>2</sup>·дмоль<sup>-1</sup>.

Определение летальной дозы ЛД<sub>100</sub> проводили на белых беспородных мышах весом 20–22 г инъекцией внутрибрюшинно или внутривенно. Для определения термо- и pH-стабильности раствор RTX-I выдерживали в течение 1 ч при соответствующей температуре (pH 4,5) или в течение 1 сут в соответствующем буфере при комнатной температуре.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Rathmayer W. In: *Advan. Cytopharmacology*/Eds Ceccarelli B., Clemente F. v. 3. N. Y.: Raven Press, 1979, p. 335–342.
2. Зыкова Т. А., Козловская Э. П., Еляков Г. Б. V Всес. симп. по химии и физике белков и пептидов. Тез. докл. Баку, 1980, с. 70.
3. Nabiullin A. A., Kozlovskaya E. P., Elyakov G. B. III USSR-FRG Symp. Chem. Pept. and Prot., Makhachkala, Abstracts, 1980, p. 31.

4. *Nabiullin A. A., Kozlovskaya E. P., Odinokov S. E., Elyakov G. B.* FEBS Lett., 1982, v. 141, № 1, p. 124–127.
5. *Ishizaki H., McKay R. H., Norton T. R., Yasunobu K. T., Lee J., Tu A. T.* J. Biol. Chem., 1979, v. 254, № 19, p. 9651–9656.
6. *Ash P., Hider R. S., Menez A., Wunderer G.* Biochem. et biophys. acta, 1981, v. 669, № 1, p. 231–235.
7. *Sears D. W., Beychok S.* In: Phys. Principles and Techn. Prot. Chem./Ed. Leach S. J. New York – London: Acad. Press, 1973, Part C, p. 446–593.
8. *Йогансен А. В.* Теор. и эксперим. химия, 1971, т. 7, № 3, с. 302–311.
9. *Йогансен А. В., Курьчи Г. А., Фурман В. М., Глазунов В. П., Одинокоев С. Е.* Ж. прикл. спектр., 1980, т. 33, вып. 3, с. 460–466.
10. *Tanford C.* Advan. Prot. Chem., 1968, v. 23, p. 121–282.
11. *Herskovitz T. T.* In: Methods Enzymol./Ed. Hirs C. H. W., V. 11. New York – London: Acad. Press, 1967, p. 748–775.

Поступила в редакцию  
28.VI.1982

## A CIRCULAR DICHROISM STUDY ON THE CONFORMATIONAL STABILITY OF TOXIN I FROM SEA ANEMONE *RADIANTHUS MACRODACTYLUS*

NABIULLIN A. A., ODINOKOV S. E., VOZHOVA E. I.,  
KOZLOVSKAYA E. P., ELYAKOV G. B.

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

Effect of solvents, temperature and pH on the conformation of polypeptide toxin I isolated from sea anemone *Radianthus macrodactylus* (RTX-I) was studied by circular dichroism method. It is shown that 60% methanol do not change native conformation of RTX-I, whereas 2,2,2-trifluoroethanol causes dramatic changes in the spatial structure. The changes in CD and difference UV spectra of RTX-I in the 230–340 nm region due to tyrosine residues ionisation were observed over the pH range of 9–12. As shown by toxicity tests, this ionisation does not alter functionally important spatial arrangement of RTX-I. Heating of RTX-I solution above 40° C results in a reversible protein denaturation which can be well described by the two-state thermodynamic model. The enthalpy value of the denaturation process is determined. Incubation of RTX-I solutions at various temperatures up to 80° C has no effect on its toxicity.