

УДК 577.352

Анионные липиды как детерминанты связывания цитотоксинов из яда змей на поверхности клеточной мембраны

А. Г. Коншина^{1,*}, И. А. Болдырев¹, А. В. Омельков², Ю. Н. Уткин¹, Р. Г. Ефремов¹¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Макляя, 16/10²Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, факультет технологии органических веществ и химико-фармацевтических средств

*E-mail: nastya@nmr.ru

Поступила в редакцию 19.05.2010 г.

РЕФЕРАТ Цитотоксические свойства цитотоксинов (ЦТ) из яда змей опосредованы их взаимодействием с мембраной клеток. Известно, что гидрофобный паттерн, включающий окончания петель I–III и окруженный полярными остатками, является мембраносвязывающим мотивом ЦТ. Однако этого недостаточно для объяснения различий в активности среди представителей семейства ЦТ, сходных как по последовательности, так и по типу пространственной укладки. По-прежнему остается неясным механизм дальнейшего взаимодействия с мембраной, приводящий к формированию пор и гибели клетки. Имеющиеся в литературе экспериментальные данные о специфическом взаимодействии ЦТ с низкомолекулярными анионными компонентами (сульфатид), входящими в состав бислоя, указывают на наличие на поверхности молекулы токсина участков связывания соответствующих лигандов. В настоящей работе мембранолитические свойства ЦТ I, ЦТ II (*Naja oxiana*) и ЦТ 4 (*Naja kaouthia*), принадлежащих к разным структурно-функциональным типам (P и S), оценивали по интенсивности вытекания флуоресцентного красителя кальцеина из липосом, содержащих липид фосфатидилсерин (ФС) в качестве анионного компонента. С помощью метода молекулярного докинга выявлены и охарактеризованы три потенциальных сайта связывания полярной головки ФС молекулами ЦТ. На основании полученных данных выдвинуто предположение о наличии специфического взаимодействия ЦТ с одним или несколькими анионными липидами (в частности, ФС) в составе мембраны, что может повышать эффективность взаимодействия ЦТ с липидным бислоем клеточной мембраны.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА цитотоксины, фосфатидилсерин, липидные мембраны, молекулярный докинг, флуоресцентная спектроскопия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ЦТ – цитотоксин(ы), ФС – фосфатидилсерин; РКС – протеинкиназа С, Сф – сульфатид, ПОФХ – пальмитоилолеилфосфатидилхолин, 6-CF – 6-карбокCIFлуоресцеин, L/P – соотношение липид/белок, ДФХ – додецилфосфохолин, ЯМР – ядерный магнитный резонанс, гФС – полярная головка липида фосфатидилсерина, PDB – Protein Data Bank (банк данных белковых структур).

ВВЕДЕНИЕ

Одна из характерных особенностей молекул цитотоксинов из яда змей – их способность оказывать токсическое действие на различные типы клеток [1]. Цитотоксины (реже кардиотоксины, ЦТ) – небольшие основные белки, принадлежащие семейству «трехпетельных» токсинов. Вторичная структура ЦТ состоит из 2 β-слоев, включающих 2 и 3 антипараллельных β-тяжа, и стабилизирована 4 дисульфидными связями. Наибольшие различия в аминокислотной последовательности и пространственной структуре представителей обширного семейства ЦТ наблюдаются в петлевых участках с нерегулярной структурой, прежде всего в петлях I и II. Деление ЦТ на S- или P-тип в зависимости от наличия в петле II консервативного остатка S28

или R30, соответственно, коррелирует с различиями в их функциональной активности [2]. Долгое время считалось, что ЦТ неспецифически взаимодействуют с клеточной мембраной. Способность ЦТ P-типа сильнее взаимодействовать с бислоем (по сравнению с ЦТ S-типа) связывают с большей гидрофобностью петли II и, как следствие, с наличием на поверхности токсина протяженной области, формируемой гидрофобными окончаниями трех петлевых участков. Обладая амфифильными свойствами (гидрофобные окончания петель I–III фланкированы поясом положительно заряженных остатков), молекулы ЦТ встраиваются в липидный бислой и образуют в нем структурные дефекты по типу поры [3–6], что приводит к гибели клетки. Ранее был предложен ряд моделей, объясняющих меха-

низ действия ЦТ, приводящий к нарушению целостности бислоя и последующему лизису [7]. Позже было показано, что некоторые ЦТ, в том числе ЦТ АЗ (*Naja atra*), способны к интернализации внутрь клетки и взаимодействию с внутриклеточными органеллами, митохондриями [8] и лизосомами [9].

Ввиду широкого спектра биологической активности, в том числе влияния на функциональное состояние различных мембранных белков, таких, как протеинкиназа С (РКС), Na^+ , K^+ -АТФаза, интегрин, гипотезы о существовании специфических мишеней для ЦТ и молекулярные детали механизма взаимодействия токсинов с мембраной актуальны и остаются предметом дискуссий [7, 10–12].

Поиск потенциальных мишеней действия ЦТ выявил ряд анионных низкомолекулярных лигандов (олигосахариды на основе гепарина, производные АТФ, сульфатид), взаимодействие которых с определенными участками поверхности токсина подтверждено ЯМР и рентгеноструктурными исследованиями [13–17]. Комплексный подход с использованием метода флуоресцентной спектроскопии на липосомах разного состава, а также экспериментов *in vivo* с применением моноклональных антител продемонстрировал наличие специфической мишени – полярной головки гликолипида сульфатида (Сф) – на поверхности мембраны кардиомиоцитов крысы, опосредующей токсическое действие ЦТ АЗ [17]. Учитывая то, что ЦТ действуют на разные типы клеток, а также тот факт, что модельные мембраны, не содержащие гликолипиды, тем не менее, эффективно лизируются токсинами [5, 18, 19], можно предположить, что ЦТ способны к специфическому взаимодействию и с другими анионными мембранными липидами, в том числе – с наиболее широко распространенным фосфатидилсерином (ФС). И хотя в норме данный липид локализован почти исключительно во внутреннем монослое клеточной мембраны, в ряде патологических процессов, при повреждении бислоя, ФС присутствует во внешнем монослое и может быть доступен для молекул цитотоксина. Ряд экспериментальных данных косвенно указывает на возможную конкуренцию между ЦТ и другими ФС-связывающими молекулами (РКС, тионин) за общий сайт на поверхности мембраны [10, 20, 21].

Предполагая, что ФС является специфической мишенью, опосредующей токсическое действие ЦТ на клетки, в настоящей работе мы изучили взаимодействие цитотоксинов S- (ЦТ I из *Naja oxiana*) и P-типа (ЦТ II из *Naja oxiana* и ЦТ 4 из *Naja kaouthia*) с пальмитилолеилфосфатидилхолиновыми (ПОФХ) мембранами, в том числе содержащими ФС и Сф. Отметим, что ЦТ 4 (*N. kaouthia*) по первичной структуре является 100% аналогом ЦТ АЗ (*N. atra*). С помощью метода флуоресцентной спектроскопии исследована литическая активность данных ЦТ в отношении липосом разного состава. Для выявления потенциальных сайтов связывания ФС с молекулой ЦТ проведен молекулярный докинг полярной головки ФС в модели пространный структуры молекул токсинов, активных в отношении ФС-содержащих липосом. На основании полученных данных выдвинута гипотеза о двухстадийном специфическом взаимодействии токсина с бислоем, молекулярными детерминантами которого являются полярные

головки анионных липидов, взаимодействующие с определенными сайтами ЦТ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Флуоресцентная спектроскопия: исследование литической активности ЦТ в отношении ФС-содержащих липосом разного состава

Цитотоксины ЦТ I и ЦТ II выделяли из яда змеи *N. oxiana* по методике, описанной в работе [22], ЦТ 4 – из яда *N. kaouthia*, используя методику, описанную в работе [23], с последующей очисткой токсина методом обращенно-фазовой хроматографии. Структуру токсина подтверждали масс-спектрометрией с использованием метода пептидного картирования после гидролиза трипсином восстановленного и пиридилэтилированного производного токсина. Сф и ФС, выделенные из мозга быка в лаборатории химии липидов ИБХ РАН, а также синтетический ПОФХ (Avanti Polar Lipids, США) использовали для приготовления липосом состава: ПОФХ, ПОФХ/ФС5%, ПОФХ/ФС20%, ПОФХ/ФС35%, ПОФХ/ФС50%, ПОФХ/ФС70%, ПОФХ/Сф5% и ПОФХ/Сф62%. Растворы липидов необходимой концентрации в хлороформе с метанолом (1 : 1) смешивали, упаривали и высушивали под вакуумом. Полученные липидные пленки гидратировали буфером состава: 50 мМ Трис-НСl (рН 7.8), 30 мМ NaCl, 4 мМ EDTA и 100 мМ кальцеина. После инкубации в течение нескольких часов суспензия была подвергнута 10 циклам замораживания–оттаивания и затем продавлена 20 раз с помощью мини-экструдера (Avanti Polar Lipids, США) через поликарбонатный фильтр (NucleoPore, США) с размером пор 100 нм. Внешний краситель удаляли методом гель-фильтрации на сефарозной колонке CL-4B, уравновешенной буфером состава: 50 мМ Трис-НСl (рН 7.8), 110 мМ NaCl, 4 мМ EDTA. Кроме того, активность ЦТ 4 в отношении Сф-содержащих липосом (ПОФХ/Сф62%) была измерена в условиях, описанных в [6], состав буфера: 10 мМ Трис-НСl (рН 7.4), 75 мМ NaCl; 50 мМ 6-карбоксифлуоресцеина (6-СФ) в качестве флуорофора; соотношение липид/белок (L/P) ~62.

Степень повреждающего действия ЦТ на липосомальную мембрану оценивали спектрофотометрически по степени выхода флуорофора (*I*) из внутреннего объема липосом при добавлении в измеряемый объем (кварцевую кювету) аликвоты раствора токсина. Величину *I* (%) рассчитывали по формуле:

$$I = 100 \times (F - F_0) / (F_t - F_0),$$

где F_0 – интенсивность флуоресценции липосом без токсина (фоновый уровень);

F – интенсивность флуоресценции в присутствии токсина; F_t – интенсивность флуоресценции после разрушения липосом детергентом (Тритон X-100). Во всех измерениях, если это не оговорено особо, соотношение L/P в измеряемом объеме составляло 100. Интенсивность флуоресценции измеряли на длине волны 517 нм с возбуждением на 494 нм. Спектральная ширина щели при возбуждении и испускании составила 3 и 5 нм соответственно. Для каждого эксперимента регистрировали кинетику флуоресценции (около 40 мин) до выхода кривой зависимости *I* от време-

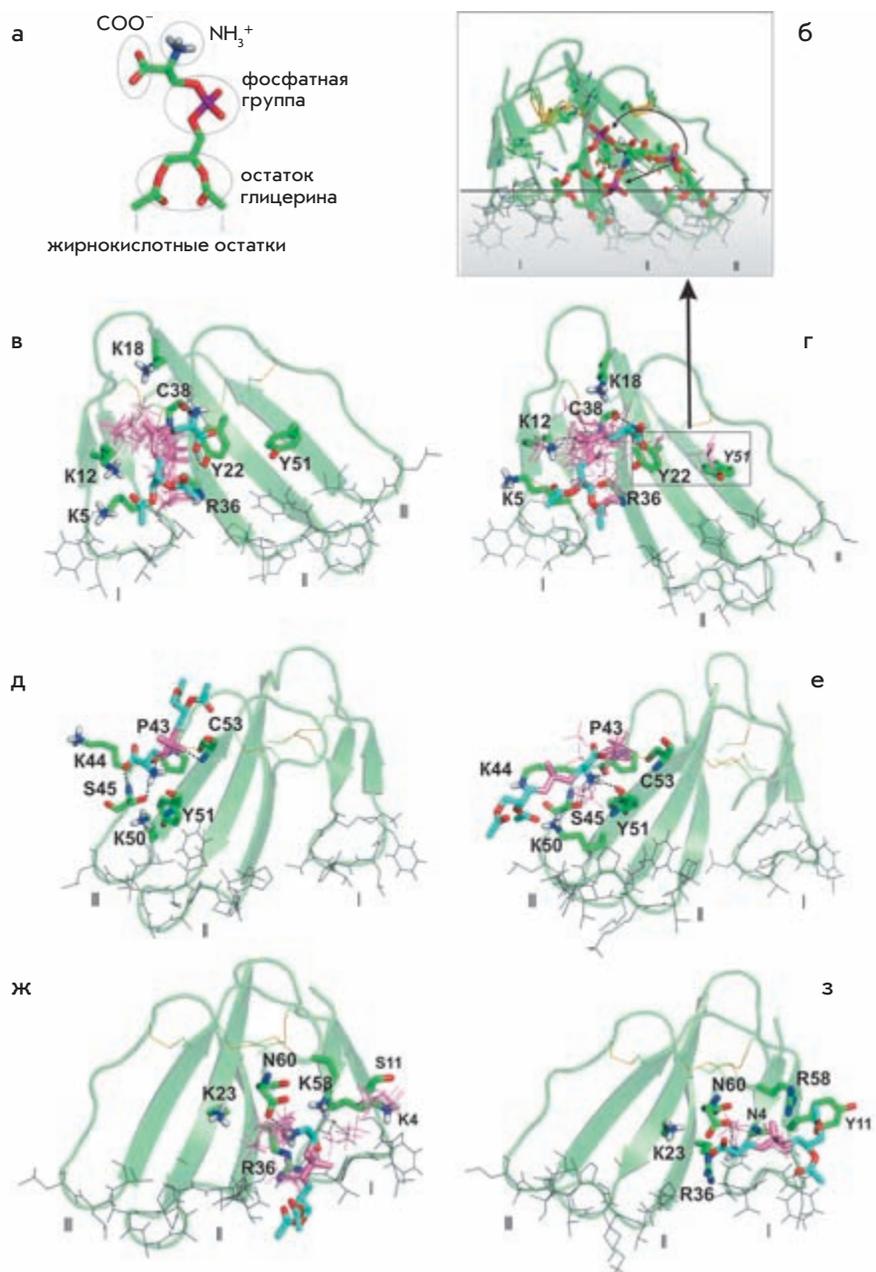


Рис. 1. а – Пространственная модель лиганда гФС, использованная в расчетах молекулярного докинга. Функциональные группы обозначены. б–з – Результаты молекулярного докинга ЦТ–гФС. Пространственные структуры комплексов белок–лиганд в сайте М молекул токсинов ЦТ 4 (б, г) и ЦТ II (в); сайте L3 ЦТ II (д) и ЦТ 4 (е); сайте L1 ЦТ II (ж) и ЦТ 4 (з). Трехмерные модели ЦТ даны в виде ленточных диаграмм с обозначением участков β-структуры в виде плоских широких стрелок. Гидрофобные остатки петель I–III (даны римскими цифрами), взаимодействующие с мембраной, атомы основной и/или боковой цепей остатков, образующих сайты, а также одна из предпочтительных конформаций гФС в сайте даны в проволочном представлении. Для остальных решений докинга, входящих в TOP10, указаны положения фосфатных групп гФС (даны в проволочном представлении), отражающие варибельность локализации гФС в каждом из сайтов. Аминокислотные остатки, образующие сайт связывания лиганда, указаны однобуквенным кодом с номером остатка. Пунктирными линиями указаны водородные связи лиганд–рецептор. Для молекул ЦТ окраска по типу атомов соответствует общепринятой схеме. Фосфатная группа и атомы углерода молекулы гФС окрашены в розовый и голубой цвета соответственно. б – Несколько вариантов ориентации гФС в сайте М_Y51 ЦТ 4, найденные в TOP10-решениях докинга. Стрелками указан возможный путь миграции гФС из сайта М_Y51 в направлении сайта М. Показана предполагаемая мода связывания токсина с мембраной (затененная область под горизонтальной линией).

ни на плато. Для контроля воспроизводимости результатов каждое измерение повторяли 2–3 раза. Все измерения проводили при комнатной температуре на спектрофлуориметре HITACHI F4000 (Япония).

Молекулярный докинг полярной головки ФС в ЦТ II и ЦТ 4

Поиск сайтов связывания ФС на молекулярной поверхности ЦТ проводили методом молекулярного докинга, используя программу GOLD 2.0 [24].

В ходе расчетов использовали кристаллографическую модель пространственной структуры ЦТ A3 из яда *N. atra*

(PDB код: 2VNI) [17] и ЯМР-модели ЦТ II, полученные в водном окружении (PDB код: 1CB9, модели: 1, 14, 18) [25] и в присутствии мицелл додецилфосфохолина (ДФХ) (PDB код: 1FFJ, модели: 1, 10) [4].

С целью учета конформационной подвижности рецептора в ходе докинга для каждого из исследуемых ЦТ рассматривали набор пространственных моделей, характеризующих динамическое поведение токсинов в средах разной полярности. Используя экспериментальные модели токсинов в качестве стартовых, репрезентативный набор соответствующих трехмерных моделей ЦТ 4 и ЦТ II был получен с помощью расчета молекулярной динамики

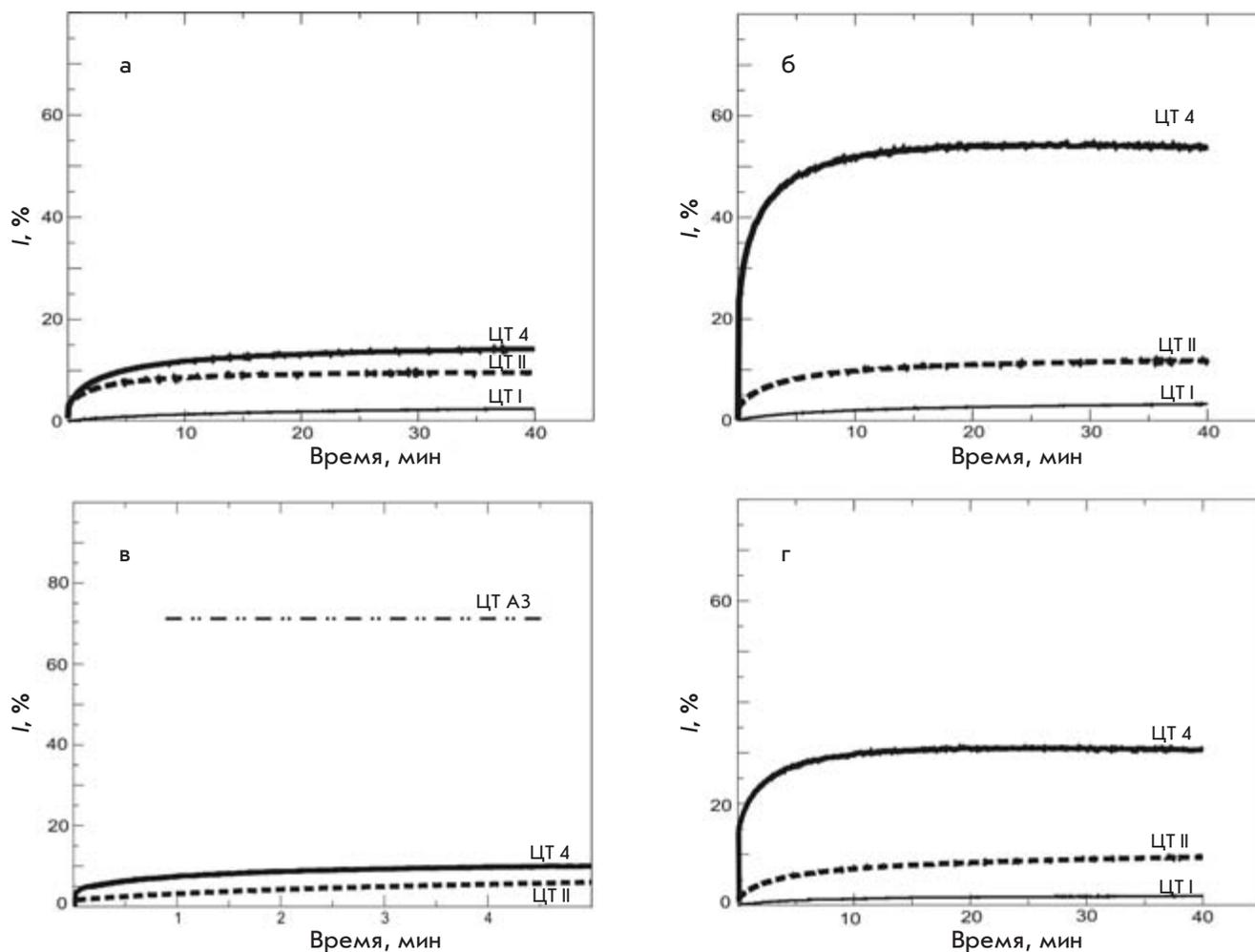


Рис. 2. Интенсивность вытекания флуорофора (кальцеин) из липосом состава ПОФХ (а), ПОФХ/ФС5% (б) и ПОФХ/Сф5% (г) в присутствии ЦТ I, ЦТ II (*N. oxiana*) и ЦТ 4 (*N. kaouthia*). в – Кинетика флуоресценции карбоксифлуоресцеина (6-CF) в первые минуты после добавления ЦТ 4 и ЦТ II. В данном эксперименте (в) состав буфера, флуоресцентный краситель, соотношение L/P = 62.5 и концентрация липид/токсин (10/0.16 мкМ) в измеряемом объеме повторяют условия работы [6]. Интенсивность флуоресценции 6-CF при действии ЦТ АЗ (*N. atra*), зарегистрированная в работе [6], отмечена (_ . . _).

в воде и применения метода Монте-Карло для поиска низкоэнергетических состояний в присутствии неявно заданной мембраны (данные не опубликованы).

Полярная головка липида фосфатидилсерина (гФС), используемая в расчетах, включала все атомы полярной головки данного липида с CH_3 -группами вместо жирнокислотных остатков (рис. 1а). Докинг гФС осуществляли в 16 и 15 пространственных моделей ЦТ 4 и ЦТ II соответственно.

Для каждой модели ЦТ было получено по 50 комплексов (решений докинга), из которых 10 лучших по значению оценивающей функции «gold_score» [26] использовали для дальнейшего анализа. Таким образом, всего для ЦТ 4 и ЦТ II было отобрано 160 и 150 лучших решений (TOP10) соответственно. Сайты связывания гФС с ЦТ выявляли,

анализируя локализацию гФС на поверхности молекулы токсина и частоту встречаемости соответствующих комплексов в TOP10-решениях. Поскольку молекулярная поверхность гФС полярна, основной вклад в энергию комплексов липид-токсин вносят водородные связи и электростатические взаимодействия. Полученные семейства решений докинга анализировали по числу и характеру распределения водородных связей и ионных контактов (с расстоянием между соответствующими заряженными группами меньше 6 Å), выявляя ключевые остатки сайтов, вовлеченные во взаимодействие с гФС в большинстве комплексов.

Наличие данных видов межмолекулярных взаимодействий оценивали с помощью программ PLATINUM [27] и GROMACS 3.3.1 [28].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Флуоресцентные измерения: ЦТ-индуцированное вытекание красителя из липосом

Зависимость активности ЦТ от вида минорного (5%) анионного липида (ФС, Сф). В настоящей работе литическая активность ЦТ II (*N. oxiana*), ЦТ 4 (*N. kaouthia*) и ЦТ I (*N. oxiana*), относящихся к Р- и S-типу соответственно, была оценена по выходу органического красителя кальцеина из липосом состава ПОФХ, ПОФХ/ФС5% и ПОФХ/Сф5%. Как видно из рис. 2, ЦТ I (S-тип) практически не взаимодействует ни с нейтральными (ПОФХ), ни с содержащими минорные количества анионных липидов (ФС, Сф) липосомами. Интенсивность вытекания кальцеина (*I*) во всех случаях составила менее 5%. При добавлении в суспензию липосом ЦТ II (Р-тип) наблюдали увеличение интенсивности вытекания красителя (в сравнении с ЦТ I). При этом вне зависимости от состава липосом средние значения *I* составили не более 10% (рис. 2).

Как показали измерения флуоресценции флуорофора при выходе из внутреннего объема везикул, наиболее выраженным повреждающим действием на все исследованные виды липосом обладает ЦТ 4 (рис. 2). На примере данного токсина наиболее отчетливо видно, что эффективность действия ЦТ зависит от наличия и вида анионного компонента в составе липосомы. Так, если выход из нейтральных липосом при действии данного токсина составил всего ~10%, то в случае Сф-содержащих везикул – 30%. Наиболее активным ЦТ 4 оказался в отношении липосом состава ПОФХ/ФС5%, где выход красителя достигал 50%. Следует отметить, что индивидуальные различия токсинов к разным анионным липидам в составе липосом также существенны. Так, если ЦТ II практически не различает ФС- и Сф-содержащие липосомы, то в случае ЦТ 4 эффективность лизиса ПОФХ/ФС везикул почти в 2 раза выше (рис. 2б, г).

Интересно отметить, что специфического взаимодействия ЦТ 4, являющегося 100% аналогом ЦТ А3 из яда *N. atra*, с молекулами Сф не обнаружено. Более того, при повторении условий эксперимента [6] (см. «Экспериментальную часть») величина *I* после первых минут инкубации составила менее 10% (против >70% в [6]) (рис. 2в). Отметим, что в работе [6] использовали флуоресцентный краситель 6-СФ, который, имея меньший заряд молекулы, способен к спонтанному вытеканию из липосом (А.В. Феофанов, частное сообщение).

ЦТ-индуцированная пермеабиллизация ПОФХ-липосом с разным содержанием ФС. Измеряя величину *I* при действии ЦТ I, ЦТ II и ЦТ 4 на липосомы ПОФХ с разным содержанием ФС (20, 35, 50 и 70%), выявили определенную форму зависимости эффективности лизиса от концентрации анионного липида, сходную для всех трех токсинов (рис. 3). А именно, наличие максимума *I* при 20% содержания ФС в составе билayers. При этом шкала токсичности: ЦТ 4 > ЦТ II > ЦТ I сохраняется для всех видов липосом при данном соотношении липид/белок (L/P = 100). Эффективность действия ЦТ 4 и особенно ЦТ II резко возрастает в случае липосом ПОФХ/ФС20%, достигая более 90 и 70% соответственно. При меньшем (5%) или большем

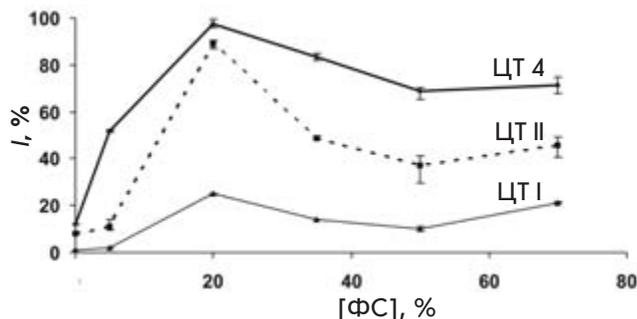


Рис. 3. Зависимость эффективности вытекания кальцеина от содержания ФС в составе мембраны ПОФХ/ФС в присутствии ЦТ 4, ЦТ I и ЦТ II. Интенсивность флуоресценции флуорофора измеряли спустя 10 мин после добавления токсина. Величины *I* рассчитывали и усредняли по 2–3 измерениям.

(35% и выше) содержанию ФС в составе липосомальной мембраны кривая активности (*I*) ЦТ II в сравнении с ЦТ 4 имеет более выраженное снижение. Отметим, что ЦТ I обладает слабой литической активностью во всем диапазоне концентраций ФС в составе липосом. Однако наблюдается слабый отклик на точку максимума (ФС20%) в виде повышения значений *I* при действии ЦТ I на липосомы ПОФХ/ФС20% (рис. 3).

Для объяснения наблюдаемых эффектов, предполагая распределение ФС в составе липосомы равномерным, мы рассчитали возможное число молекул ФС, приходящихся на молекулу токсина в липосомах (диаметром 1000 Å) разного состава. Оказалось, что число молекул ФС в случае липосом, в отношении которых ЦТ проявляют максимальную активность, совпадает с числом потенциальных сайтов связывания головки данного липида, выявленных методом молекулярного докинга. При условии полного связывания токсинов при L/P = 100 компенсация заряда липосом как раз достигается в липосомах ПОФХ/ФС20%. Таким образом, на каждую молекулу токсина приходится 10–12 молекул ФС (из которых в среднем 3.5 ФС на участке связывания токсина). Всего на молекулу ЦТ приходится 50–60 липидов, из них 16–18 располагаются непосредственно в области контакта с токсином.

Для сравнения, в липосомах ПОФХ/ФС5% компенсация по заряду достигается при очень низких концентрациях ЦТ (L/P ~300), а значит, с увеличением содержания токсина (L/P = 100) часть молекул ЦТ может находиться в не связанном с мембраной состоянии. Но даже при условии полного связывания ЦТ с поверхностью липосомы ПОФХ/ФС5% в области контакта с молекулой токсина может не оказаться ни одной молекулы ФС (в среднем 0.8 молекул ФС приходится на участок поверхности, занимаемый токсином).

Молекулярный докинг

Методом молекулярного докинга гФС в пространственные модели ЦТ 4 и ЦТ II на молекулярной поверхности обоих токсинов выявлены три сайта связывания гФС (обозначает-

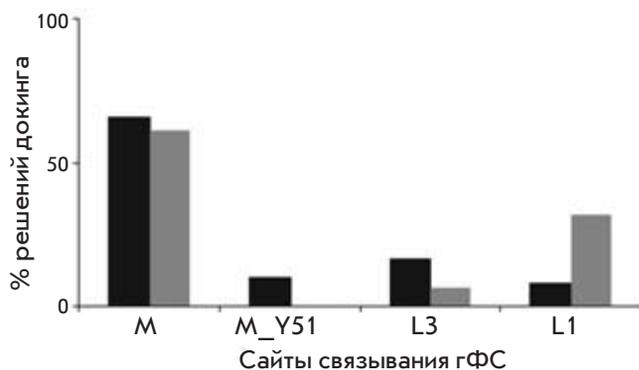


Рис. 4. Распределение решений молекулярного докинга по сайтам связывания гФС в ЦТ. Частота встречаемости решений докинга для ЦТ II (серый) и ЦТ 4 (черный), соответствующих сайтам M, M_Y51, L3 и L1, среди лучших TOP10-решений.

мые далее как «M», «L3» и «L1»), состоящие преимущественно из консервативных остатков. Ввиду наличия нескольких донорных/акцепторных групп для образования водородных связей как в лиганде, так и в рецепторе, характерной особенностью комплексов является мультивариантное расположение лиганда в сайтах (рис. 1).

Сайт M. Среди TOP10-решений докинга лидирует сайт M, наблюдающийся в 75 и 60% решений для ЦТ 4 и ЦТ II соответственно (рис. 4). Сайт M представляет собой «лизиновый» кластер (K5, K12, K18, K35), который окружает полярную поверхность («ложе» сайта), сформированную атомами основной цепи остатков L6, R36, G37, C38, а также Y22-ОН (рис. 1в, г). Более 60% решений для обоих токсинов имеют 3 и более водородных связей между ключевыми остатками сайта M (K12, Y22, R36, C38) и гФС и, как правило, несколько ионных контактов.

За счет подвижности боковых цепей остатков лизина сайт M адаптирует различные конформации гФС (рис. 1в, г). Данный сайт присутствует в десятке лучших решений докинга для большинства моделей как ЦТ 4, так и ЦТ II, включая экспериментально полученные структуры токсинов.

В отличие от ЦТ II, в наборе TOP10 ЦТ 4 присутствует группа решений (в дальнейшем «M_Y51»), где в связывании головки липида участвует гидроксильная группа остатка Y51 (рис. 1б, г). В большинстве решений M_Y51 (10 из 16 комплексов) хвостовая часть гФС ориентирована в сторону окончания петли III (рис. 1б). В остальных решениях M_Y51 глицериновая группа гФС ориентирована к петле I, при этом число водородных связей с лигандом меньше. Таким образом, положение лиганда в данной группе решений можно рассматривать в качестве промежуточного звена между положениями лиганда в сайтах M_Y51 и M. При этом Y22 оказывается ключевым остатком, с которым лиганд сохраняет взаимодействие (водородную связь) вдоль предполагаемого пути перехода от M_Y51 к сайту M (рис. 1б).

Сайты L3 и L1. Кроме основного (по числу решений) сайта M среди набора TOP10 присутствуют два сайта, L1 и L3,

локализованные на вогнутой стороне поверхности молекул ЦТ в районе петель I и III соответственно. В случае ЦТ II и ЦТ 4 данные сайты имеют разную частоту появления среди TOP10-решений докинга (рис. 4).

Сайт L3 сформирован атомами основной цепи консервативных остатков R43, Y51, C53, а также S45, в том числе боковой цепью последнего. При этом в большинстве комплексов ЦТ-гФС карбонильные группы остатков R43 и Y51, а также ОН-группа S45 фиксируют положение NH_3^+ -группы лиганда, образуя с ней водородную связь (рис. 1д, е). В ряде решений остаток глицерина гФС ориентирован в направлении окончаний петель I–III, при этом боковые цепи K44 и K50 оказываются вблизи фосфатной группы гФС (рис. 1е).

Сайт L1 ЦТ 4/ЦТ II представляет собой участок с высоким электростатическим потенциалом, включающий боковые группы остатков N4/K4, K23, R36, R58/K58, N60, которые образуют электростатически выгодные контакты с гФС. В большинстве решений как ЦТ II, так и ЦТ 4 NH_3^+ -группа гФС располагается вблизи остатка N60, образуя с карбоксильной или карбонильной группой боковой цепи водородную связь (рис. 1ж, з). Молекула гФС имеет различные ориентации относительно молекулы токсина и предполагаемого бислоя, в том числе соответствующие положению липида в составе бислоя (рис. 1ж).

ОБСУЖДЕНИЕ

Функциональная активность цитотоксинов обусловлена их взаимодействием с мембраной клетки. Однако механизм такого взаимодействия на молекулярном уровне остается неизвестным. Олигомеризация ЦТ, необходимая при формировании пор в мембране [5, 6], но отсутствующая в растворе, по-видимому, происходит в примембранной области. При этом характеристики процесса и геометрия супрамолекулярного комплекса неясны. Поэтому начальные этапы связывания токсина с мембраной крайне важны для понимания механизма цитотоксической активности ЦТ.

Полученные в настоящей работе данные по интенсивности вытекания кальцеина из липосом состава ПОФХ, ПОФХ/ФС5%, ПОФХ/Сф5% в зависимости от типа ЦТ (Р или S) согласуются с представлениями о том, что характеристики мембраносвязывающего мотива (окончания петель I–III) влияют на литическую активность ЦТ в отношении клеточных мембран. Известно, что представители Р-типа ЦТ сильнее взаимодействуют с бислоем [2, 29, 30]. Действительно, оба представителя ЦТ Р-типа, ЦТ II и ЦТ 4, обладают более выраженными литическими свойствами в отношении липосом (ПОФХ/ФС5%, ПОФХ/Сф5%) в сравнении с ЦТ I, где интенсивность вытекания красителя не превышает 5%. Предполагается, что из-за наличия полярных остатков в петле II (S28 и D29 у ЦТ I) ЦТ S-типа имеют моду взаимодействия с бислоем, характеризующуюся вовлечением меньшего числа остатков, преимущественно петли I [2, 31]. При одинаковой геометрии встраивания в бислой рассчитанная свободная энергия связывания ЦТ I выше, чем ЦТ II [30].

В ходе эксперимента также было показано, что все исследуемые токсины наиболее активны в отношении ФС-содержащих липосомальных мембран, а кривые зависимости интенсивности вытекания красителя при действии

токсина от содержания ФС в составе липосом имеют сходную колоколообразную форму с пиком интенсивности лизиса в случае липосом ПОФХ/ФС20%. Приближенная оценка числа молекул ФС в липосомах диаметром 1000 Å при соотношении липид/белок = 100 показывает, что указанный пик интенсивности наблюдается при наличии не менее трех молекул ФС на поверхности бислоя, оказывающейся в контакте с молекулой токсина в процессе встраивания. При этом различия в показателях интенсивности вытекания кальцеина между ЦТ 4 и существенно менее активным ЦТ II становятся минимальными (90 и ~70%) в сравнении с липосомами с иным содержанием ФС. Можно предположить, что оптимальное для лизиса содержание ФС в составе мембраны, обеспечивающее вовлечение всех трех сайтов токсина, оказывает значительное влияние на эффективность его взаимодействия с мембраной. Слабый отклик, наблюдаемый в случае практически неактивного ЦТ I, вероятно, связан с недостаточной глубиной встраивания этого токсина в бислой и/или альтернативной геометрией связывания с бислоем одной или двумя петлями и, соответственно, меньшей доступностью сайтов связывания для ФС.

Существенное снижение эффективности лизиса липосом ПОФХ/ФС5% при действии ЦТ указывает на то, что связывание сильно основного токсина с анионной мембраной, очевидно, включает стадию неспецифического электростатического притяжения. В результате из-за малой плотности заряда на мембране, а также отсутствия достаточного числа молекул потенциальных лигандов – ФС (меньше одного на участке контакта токсина с мембраной), связывание ЦТ с мембраной не приводит к эффективному встраиванию в бислой.

Уменьшение активности ЦТ 4 и ЦТ II в отношении липосом с содержанием ФС 35% и выше, также наблюдаемое для обоих токсинов, видимо, связано с изменением свойств бислоя, в частности – повышением плотности его упаковки в зоне интерфейса. Например, более вероятным становится процесс формирования мини-кластеров из молекул ФС. По данным расчетов молекулярной динамики бислоев с содержанием ФС 20 и 50%, в последнем случае число водородных связей в зоне интерфейса между полярными головками ФС в 2 раза выше (данные не опубликованы).

Приближенная оценка числа молекул ФС, взаимодействующих с ЦТ в липосомах ПОФХ/ФС20%, совпадает с числом ФС-связывающих сайтов на токсине, предсказанных методом молекулярного докинга. Отметим также, что встраивание исследуемых токсинов в липидный бислой гидрофобными окончаниями петель I–III подтверждается данными ЯМР-спектроскопии по взаимодействию с мицеллами ЦТ II [4], ЦТ АЗ (*N. atra*) [6].

Лидирующий по числу решений докинга сайт М (остатки К5, К12, К18, Y22, R36, С38) совпадает с сульфатидсвязывающим карманом, расположенным на «выпуклой» стороне молекулы токсина [17]. Действительно, по данным химической модификации остатков лизина и тирозина, ключевые сайты сайта, такие, как Y22, К12, существенно влияют на функциональную активность ЦТ [32, 33]. По числу межмолекулярных водородных связей и ионных контактов, наблюдаемых в решениях докинга, сайт М имеет наилучшие характеристики для образования стабильного комплекса

с лигандом. Возможность связывания с данным сайтом различных анионных компонент в составе мембраны подтверждается наличием кристаллической структуры комплекса ЦТ АЗ с сульфатидом [17]. В то же время суперпозиция моделей ЦТ, используемых в молекулярном докинге, в соответствии с модой встраивания их в бислой, указывает на разную степень доступности сайтов для головки липида ФС. В частности, остатки сайта М непосредственно не взаимодействуют с бислоем. Для попадания в сайт М молекуле липида необходимо преодолеть энергетический барьер, связанный с попаданием ацильной части липида в полярную зону интерфейса.

Интересно отметить, что в моделях семейства М_Y51, полученных с помощью докинга для ЦТ 4, сайт посадки липида предполагает образование водородной связи NH₃⁺-группой липида с ОН-группами обоих остатков тирозина, Y22 и Y51. При этом фосфатная группа оказывается вблизи поверхности мембраны. Таким образом, можно предположить, что попадание в сайт М_Y51, в отличие от сайта М, происходит быстрее. А наличие решений в М_Y51, отличающихся разной степенью вовлеченности ключевых остатков сайта М и ориентацией остатка глицерина молекулы липида, может указывать на возможный путь миграции головки липида от сайта М_Y51 к сайту М.

Прямых экспериментальных доказательств существования выявленных методом докинга сайтов L3 и L1 нет. В то же время сайт L3, находящийся в районе петли III, имеет сходный с сайтом М принцип устройства: атомы основной цепи остатков данного сайта (P43, Y51, С53), принадлежащих к стабильным элементам структуры, образуют водородные связи с полярной головкой липида, которая дополнительно электростатически удерживается заряженными группами остатков лизина (K44, K50). Кроме того, недавно консенсусная последовательность L/PKSSLL, выведенная на основе выравнивания пептидных фрагментов (имеющих сходство к антителам, нейтрализующим действие яда *N. atra*), выявленных методом фагового дисплея, предложена в качестве эпитопа, вовлеченного в цитотоксическую активность ЦТ АЗ из яда *N. atra* [34]. Данный эпитоп соответствует фрагменту последовательности петли III и включает остатки сайта L3 (P43–S45). Учитывая моду связывания ЦТ с мембраной, сайт L3 наименее доступен для ФС в составе бислоя. Можно предположить, что на более поздних этапах встраивания, когда ЦТ погружается глубже и сайт становится более доступным, связывание дополнительного липида увеличивает эффективность взаимодействия ЦТ с мембраной.

Напротив, среди решений докинга с участием сайта L1 (полярный кластер в основном заряженных остатков в основании петель I и II) присутствуют модели комплексов, где гФС находится в зоне интерфейса мембрана–вода (при условии встраивания ЦТ петлями в мембрану). Это указывает на доступность данного сайта для гФС, являющейся частью бислоя. Ранее на основании данных спектроскопии ЯМР было показано, что некоторые остатки сайта L1 участвуют в связывании дезоксиаденозинтрифосфата [16].

Интересно отметить, что всего 5 аминокислотных замен в ЦТ II превращают его в гораздо более литически активный ЦТ 4 (рис. 5). При этом общий заряд молекулы (+9) одинаков для обоих ЦТ. Неудивительно, что при высокой

Петли:		I		II		III	
Вторич. структура:		bbb	bbb	bbbbbbb	bbbbbb	bbbbbb	bbbbbb
ЦТ I	<i>N. oxiana</i>	LKCNKLVPIA	YKTCPEGK	NLCYKMFMS	DLTI	PVKRGCIDV	CPKNSLLVKYVCCNTDRCN
ЦТ II	<i>N. oxiana</i>	LKCKKLVPLF	SKTCPAGK	NLCYKMFVAA	P	HPVPVKRGCIDV	CPKSSLLVKYVCCNTDKCN
ЦТ A3	<i>N. atra</i>	LKCNKLVPLF	YKTCPEGK	NLCYKMFVAT	P	KVPVKRGCIDV	CPKSSLLVKYVCCNTDRCN
ЦТ 4	<i>N. kaouthia</i>	LKCNKLVPLF	YKTCPEGK	NLCYKMFVAT	P	KVPVKRGCIDV	CPKSSLLVKYVCCNTDRCN

Рис. 5. Выравнивание аминокислотных последовательностей исследуемых токсинов. Участки β-структуры отмечены символами «b». Аминокислотные замены, отличающие ЦТ II от ЦТ 4, отмечены подчеркиванием.

гомологии последовательности и сходстве пространственной упаковки результаты докинга также в целом совпадают, различаясь лишь частотой появления соответствующих сайтов среди решений докинга. Большинство аминокислотных замен (4 из 5) локализованы в окрестности сайта L1 (частота наблюдения которого в случае ЦТ II выше), а три из них – в наиболее важных для токсина участках – петлях I и II. Так, положительный заряд в ЦТ II (K4/N4 в ЦТ II/ЦТ 4) перемещается в петлю II (H31/K31 в ЦТ II/ЦТ 4) ЦТ 4. С одной стороны, это нарушает гидрофобный паттерн петли II, с другой – известно о способности остатков лизина «заякориваться» на интерфейсе, взаимодействуя с фосфатными группами липидов [35], что может уменьшать константу диссоциации белка. Замечено, что наличие положительного заряда в окончании петли II коррелирует с наличием гемолитической активности у ЦТ [36]. Несмотря на то что замены K4/N4 и K58/R58 в токсинах локализируются довольно далеко от поверхности мембраны (в предположении, что ЦТ встраивается окончаниями петель I–III), оба остатка являются частью сайта L1, образуя водородную связь и/или ионный контакт с сериновой головкой липида в решениях докинга. Замена S11/Y11 усиливает гидрофобные свойства петли I у ЦТ 4, так как появляются спаренные ароматические остатки F10 и Y11, которые могут являться хорошим гидрофобным «якорем». Можно предположить, что ввиду менее благоприятных условий для связывания в сайте M_Y51 (это отражается в отсутствии данного сайта среди TOP10 ЦТ II) уменьшается доступность сайта M для головки анионного липида в случае ЦТ II. Локальные конформационные отличия ЦТ II от ЦТ 4 также могут влиять на перераспределение мест связывания гФС в случае сайтов L1 и L3. Вместе с тем очевидно, что данных моделирования недостаточно для количественной оценки возможных изменений констант связывания липида в предсказанных сайтах и, следовательно, для детального объяснения различий в активности ЦТ II и ЦТ 4.

Отметим также, что проведенные нами эксперименты по вытеканию кальцеина из липосом ПОФХ/Сф5%, а также повторение условий эксперимента [6] с использованием флуорофора 6-СФ не выявили более высокого сродства ЦТ

(в частности, ЦТ 4) в отношении Сф, что противоречит данным [6]. Вместе с тем возможность связывания различных анионных компонент в составе мембраны подтверждается наличием кристаллической структуры комплекса ЦТ A3 с Сф в сайте M, а ряд экспериментов с использованием Сф-специфичных антител и ферментов показал зависимость между функциональной активностью ЦТ A3 и наличием Сф в составе мембраны [17]. Данный гликолипид в незначительных количествах присутствует во внешнем монослое мембраны клеток кардиомиоцитов крыс, чем объясняется пристальное внимание к Сф как потенциальной мишени действия цитотоксинов. Отсутствие четкой воспроизводимости результатов на модельных мембранах, помимо важности технической стороны (влияние природы красителя), указывает на необходимость осторожной экстраполяции результатов, полученных на модельных системах, на клетки. Функциональная активность токсина, вероятно, опосредована целым рядом факторов и далеко не исчерпывается показателями сродства к тому или иному компоненту мембраны.

Резюмируя, на основании данных флуоресцентных измерений активности ЦТ 4, ЦТ I и II по интенсивности вытекания красителя из анионных липосом с разным содержанием анионного липида, а также результатов молекулярного докинга гФС в ЦТ 4 и ЦТ II выдвинута гипотеза о наличии на поверхности токсина специфических липид-связывающих сайтов с разной аффинностью. Концепция двухстадийного связывания ЦТ с поверхностью мембраны (сначала – за счет электростатических, затем – гидрофобных взаимодействий), детерминантами которого являются специфические комплексы токсина с полярными головками анионного липида, позволяет качественно объяснить характер зависимости интенсивности вытекания флуоресцентного красителя от содержания ФС в составе липосомы ПОФХ. ●

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований, Программами Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и «Основы фундаментальных исследований нанотехнологий и наноматериалов».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dufton M.J., Hider R.C. // *Pharmacol. Ther.* 1988. V. 36. P. 1–40.
2. Chien K.Y., Chiang C.M., Hseu Y.C., et al. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 14473–14483.
3. Dauplais M., Neumann J.M., Pinkasfeld S., Menez A., Roumestand C. // *Eur. J. Biochem.* 1995. V. 230. P. 213–220.
4. Dubovskii P.V., Dementieva D.V., Bocharov E.V., Utkin Y.N., Arseniev A.S. // *J. Mol. Biol.* 2001. V. 305. P. 137–149.
5. Frouhar F., Huang W.N., Liu J.H., et al. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 21980–21988.
6. Tjong S.C., Wu P.L., Wang C.M., et al. // *Biochemistry.* 2007. V. 46. P. 12111–12123.
7. Kumar T., Jayaraman G., Lee C., et al. // *J. Biomol. Struct. & Dyn.* 1997. V. 15. P. 431–463.
8. Wang C.H., Wu W. // *FEBS Lett.* 2005. V. 579. P. 3169–3174.
9. Feofanov A.V., Sharonov G.V., Astapova M.V., et al. // *Biochem. J.* 2005. V. 390. P. 11–18.
10. Chiou S.H., Raynor R.L., Zheng B., Chambers T.C., Kuo J.F. // *Biochemistry.* 1993. V. 32. P. 2062–2067.
11. Raynor R.L., Zheng B., Kuo J.F. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. P. 2753–2758.
12. Wu P.L., Lee S.C., Chuang C.C., et al. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. P. 7937–7945.
13. Lee S. C., Guan H. H., Wang C. H., et al. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 9567–9577.
14. Sue S. C., Brisson J. R., Tjong S. C., et al. // *Biochemistry.* 2001. V. 40. P. 10436–10446.
15. Tjong S.C., Chen T.S., Huang W.N., Wu W.G. // *Biochemistry.* 2007. V. 46. P. 9941–9952.
16. Jayaraman G., Krishnaswamy T., Kumar S., Yu C. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 17869–17875.
17. Wang C.H., Liu J.H., Lee S.C., Hsiao C.D., Wu W.G. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. P. 656–667.
18. Dufourcq J., Faucon J.F., Bernard E., et al. // *Toxicol.* 1982. V. 20. P. 165–174.
19. Chen K.C., Kao P.H., Lin S.R., Chang L.S. // *Toxicol.* 2007. V. 50. P. 816–824.
20. Osorio e Castro V.R., Vernon L.P. // *Toxicol.* 1989. V. 27. P. 511–517.
21. Osorio e Castro V.R., Rogers A., Vernon L.P. // *J. Nat. Toxins.* 2001. V. 10. P. 255–268.
22. Феофанов А.В., Шаронов Г.В., Дубинный М.А. и др. // *Биохимия.* 2004. Т. 69. № 10. С. 1410–1421.
23. Кухтина В.В., Вайзе К., Осипов А.В. и др. // *Биоорган. химия.* 2000. Т. 26. С. 803–807.
24. Jones G., Willett P., Glen R.C., et al. // *J. Mol. Biol.* 1997. V. 267. P. 727–748.
25. Dementieva D.V., Bocharov E.V., Arseniev A.S. // *Eur. J. Biochem.* 1999. V. 263. P. 152–162.
26. Jones G., Willett P., Glen R.C. // *J. Mol. Biol.* 1995. V. 245. P. 43–53.
27. Pyrkov T.V., Chugunov A.O., Krylov N.A., et al. // *Bioinformatics.* 2009. V. 25. P. 1201–1212.
28. Lindahl E., Hess B., van der Spoel D. // *J. Mol. Model.* 2001. V. 7. P. 306–317.
29. Dubovskii P.V., Lesovoy D.M., Dubinnyi M.A., et al. // *Eur. J. Biochem.* 2003. V. 270. P. 2038–2046.
30. Dubovskii P.V., Lesovoy D.M., Dubinnyi M.A., et al. // *Biochem. J.* 2005. V. 387. P. 807–815.
31. Efremov R.G., Volynsky P.E., Nolde D.E., et al. // *Biophys. J.* 2002. V. 83. P. 144–153.
32. Gatineau E., Toma F., Montenay-Garestier T., et al. // *Biochemistry.* 1987. V. 26. P. 8046–8055.
33. Gatineau E., Takechi M., Bouet F., et al. // *Biochemistry.* 1990. V. 29. P. 6480–6489.
34. Wang P.C., Loh K.S., Lin S.T., et al. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 2009. V. 387. P. 617–622.
35. Désormeaux A., Laroche G., Bougis P.E., Pézolet M. // *Biochemistry.* 1992. V. 31. P. 12173–12182.
36. Hider R.C., Khader F. // *Toxicol.* 1982. V. 20. P. 175–179.