



УДК 577.175.82+612.82.015

© 1992 г. Ю. Н. Уткин, И. Е. Кашеверов, В. И. Цетлин

ВЛИЯНИЕ ТОКСИЧЕСКИХ КОМПОНЕНТОВ ЯДОВ ЗМЕЙ
НА СВЯЗЫВАНИЕ ВЕЩЕСТВА P С МЕМБРАНАМИ МОЗГА КРЫСЫ

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина РАН, Москва

Ионообменная ВЭЖХ использована для очистки α -нейротоксинов, κ -бунгаротоксина, цитотоксина и фосфолипазы A_2 ядов змей. Среди очищенных полипептидов наиболее высокой способностью ингибировать связывание вещества P мембранами мозга крысы обладают фосфолипазы A_2 ($K_1 \sim 10^{-8}$ M). Остальные токсины являются слабыми ингибиторами ($K_1 > 10^{-4} - 10^{-5}$ M). Обнаруженный ранее высокий ингибирующий эффект α -бунгаротоксина обусловлен наличием в коммерческих препаратах примеси фосфолипазы A_2 .

Совместная локализация нейрорецепторов классических и пептидных нейротрансмиттеров делает возможным взаимодействие рецептора как с его собственным специфическим лигандом, так и с лигандами, являющимися специфическими для иных рецепторов. Взаимодействия последнего типа, хотя и менее эффективные, могут оказывать модулирующее влияние на рецепторную активность. Так, например, ранее в нескольких лабораториях было обнаружено влияние вещества P (SP) на характеристику связывания и функциональные свойства никотинового ацетилхолинового рецептора (АХР) [1-4]. В связи с этим нами было исследовано [5, 6] влияние различных лигандов АХР на связывание иодированного SP с тахикининовыми рецепторами (ТХР) мозга крысы. При этом оказалось, что такие соединения, как *d*-тубокурарин и фенциклидин, ингибируют связывание SP, однако в довольно высоких концентрациях (10^{-4} M). Интересно, что наличие взаимозависимости между центрами связывания SP и фенциклидина недавно было подтверждено ингибированием связывания радиоактивного производного фенциклидина с мозгом крысы эндогенным или добавленным синтетическим SP [7].

Среди различных проанализированных нами лигандов АХР наиболее эффективное ингибирование связывания иодированного производного SP с мембранами мозга крысы наблюдалось для нейротоксинов из ядов змей — особенно α -бунгаротоксина (α -БТ): $K_1 \sim 10^{-7} - 10^{-8}$ M [5]. Мы попытались применить токсины для дальнейшей характеристики и выделения рецептора SP из мозга крысы и обнаружили, что бунгаротоксины разных фирм и различных партий (обладающие примерно одинаковой способностью связываться с мембранами Torpedo*) проявляют плохо воспроизводимую ингибирующую активность по отношению к SP. Следует отметить, что обычно нейротоксины в ядах содержатся в значительно меньших количествах, чем другие токсические компоненты — цитотоксины и фосфолипазы A_2 [8]. Эти соединения, так же как и нейротоксины, как правило, имеют высокое содержание гидрофобных и заряженных остатков, существуют в одном и том же яде во многих вариантах, а их выделение в индивидуальном виде (в том числе и уда-

Сокращения: БТ — бунгаротоксин, АХР — ацетилхолиновый рецептор, SP — вещество P, ТХР — тахикининовый рецептор, НТ — нейротоксин.

* Определено по ингибированию связывания [3H]- α -БТ [9].

ление следовых примесей) представляет собой достаточно сложную задачу. Возможно, обнаруженная нами плохая воспроизводимость ингибирования бунгаротоксином связывания SP с мембранами свидетельствует о недостаточной гомогенности образцов токсина.

В настоящем сообщении описана очистка с помощью ионообменной ВЭЖХ α -БТ и других α -нейротоксинов, κ -БТ, цитотоксина и фосфолипазы A_2 , а также проверка влияния очищенных компонентов на связывание иодированного SP с ТХР из мозга крысы.

В экспериментах по вытеснению радиоактивного производного SP различными препаратами одного и того же нейротоксина мы обнаружили, что они сильно различаются по ингибирующей активности. Так, α -БТ фирмы «Seriva» (496, Contr. No. 13108) практически полностью ингибировал связывание SP в концентрации $5 \cdot 10^{-6}$ М, в то время как другой образец α -БТ той же фирмы (160, Contr. No. 18060) в той же концентрации совсем не ингибировал связывания SP. Высокоэффективная ионообменная хроматография на колонке UltroPac TSK CM-3SW (рис. 1) показала, что оба образца не являются индивидуальными полипептидами. Ингибирующая способность очищенного токсина (по данным аминокислотного анализа пик А, рис. 1) существенно ниже по сравнению с исходным материалом (рис. 2).

Аналогично подвергали очистке и другие токсины: нейротоксин II *Naja naja oxiana* (НТИИ) и токсин *N. n. siamensis* (данные не приведены), исходная ингибирующая активность которых по отношению к SP была значительно ниже, чем у неочищенного α -БТ. В результате ВЭЖХ от токсинов, имевших приемлемую чистоту по критериям традиционной хроматографии, отделяется ряд минорных фракций, а ингибирующая активность очищенных токсинов снижается (рис. 2, таблица).

Определение ингибирующей способности полученных в результате ВЭЖХ α -БТ фракций (рис. 1) показало, что фракция С обладает высокой активностью ($K_i \sim 10^{-8}$ М). Определенная для пептида этой фракции N-концевая аминокислотная последовательность (14 остатков) полностью совпала с N-концевой аминокислотной последовательностью фосфолипазы A_2 *Bungarus multicinctus* [10]. Очевидно, именно наличием примеси фосфолипазы объясняется более высокая ингибирующая активность этого образца токсина.

С другой стороны, ни один из отделенных от НТИИ пиков не проявлял столь высокой ингибирующей активности. Возможно, более высокая ингибирующая активность препаратов НТИИ до очистки обусловлена наличием низких концентраций примесей основных фосфолипаз, которые в использованных нами условиях хроматографии не элюируются с колонки. Мы проверили имеющуюся в нашем распоряжении менее основную фосфолипазу A_2 *N. n. oxiana*, элюирующуюся при разделении яда на СМ-целлюлозе СМ-32 раньше НТИ и НТИИ [11]. Эта фосфолипаза, индивидуальная по данным ионообменной ВЭЖХ, по своим ингибирующим свойствам оказалась близка фосфолипазе *B. multicinctus* (пик С рис. 1, таблица). Весьма вероятно, что и более основные фосфолипазы A_2 *N. n. oxiana* также обладают высокой ингибирующей активностью.

Цитотоксин II *N. n. oxiana*, для которого нами ранее [5] была показана способность ингибировать связывание радиоактивного SP с мембранами мозга крысы ($K_i 10^{-5}$ М), оказался индивидуальным по данным ионообменной ВЭЖХ и сохранял свою ингибирующую активность после хроматографии (рис. 2, таблица).

В яде *B. multicinctus* наряду с α -БТ содержится κ -БТ, являющийся блокатором некоторых типов нейрональных АХР [12, 13]. Коммерческий препарат κ -БТ элюировался в виде одного пика в использованных нами условиях (см. «Экспериментальную часть»). Интересно, что не-

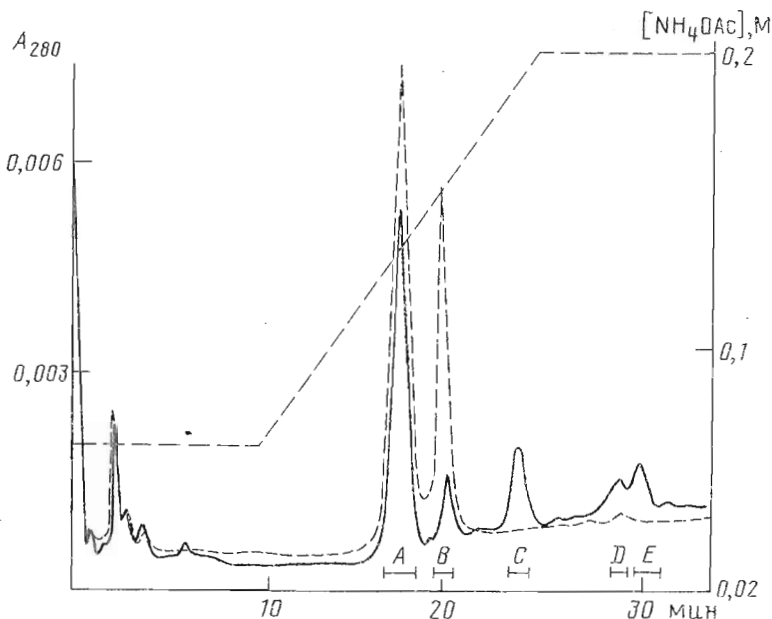


Рис. 1. Разделение α -БТ на колонке UltroPac TSK CM-3SW (7,5×75 мм) в градиенте концентрации ацетата аммония (рН 6,5); образцы 496, contr. № 13108 (сплошная линия) и 160, contr. № 18060 (штриховая)

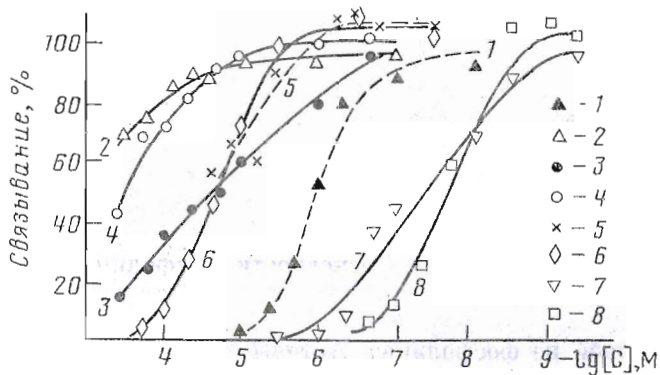


Рис. 2. Ингибирование связывания радиоактивного производного SP (0,26 нМ) различными компонентами яда змей: α -БТ (образец 496) до (1) и после очистки (2), НТII до (3) и после очистки (4), κ -БТ (5), цитотоксин II после очистки (6), фосфолипаза $A_2 N. n. oxiata$ (7), фосфолипаза $A_2 B. multicinctus$ (8). Каждая точка на графике соответствует среднему значению двух измерений

давно [14] ионообменная ВЭЖХ была использована для разделения изоформ κ -нейротоксинов, что свидетельствует о высокой разрешающей способности метода. Из рис. 2 видно, что κ -БТ обладает несколько более высокой ингибирующей активностью, чем другие нейротоксины.

Для очищенных α -нейротоксинов $K_1 > 10^{-4}$ М, что коррелирует с величинами, характеризующими ингибирование веществом Р связывания α -БТ с АХР в мембранах мозга крысы и цыпленка или в электроцитах *Torpedo* ($K_1, 10^{-5} - 10^{-4}$ М) [4]. Таким образом, высказанное нами ранее предположение [5, 6] о взаимосвязи ТХР с α -БТ-связывающими поли-

Компонент яда	K_i , М
α -БТ до очистки	$(7,5 \pm 0,9) \cdot 10^{-7}$
после очистки	$\geq 10^{-4}$
НТII до очистки	$(1,4 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$
после очистки	$\geq 10^{-4}$
κ -БТ	$> 3 \cdot 10^{-6}$
Цитотоксин II после очистки	$(1,3 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$
Фосфолипаза A_2 <i>N. n. oxiana</i>	$(4,1 \pm 1,8) \cdot 10^{-8}$
Фосфолипаза A_2 <i>B. multicinctus</i>	$(1,7 \pm 0,4) \cdot 10^{-8}$

Значения K_i определялись по соответствующим значениям IC_{50} .

пептидами мозга, имеющими K_d для α -нейротоксинов 10^{-9} – 10^{-7} М [15, 16], нуждается в пересмотре. В свете представленных в настоящей работе данных маловероятной кажется роль SP как эндогенного лиганда α -БТ-связывающих полипептидов мозга. Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о том, что такую функцию может выполнять тимопоэтин, для которого продемонстрирована взаимная конкуренция с α -БТ с $K_i \sim 10^{-9}$ М [17]. Следует отметить, что для образца тимопоэтина, любезно предоставленного проф. Г. Гольдштейном, мы наблюдали конкуренцию с радиоактивным токсином *3 N. n. siamensis* за связывание с мембранами мозга крысы, тогда как тимопоэтин в концентрации до $3 \cdot 10^{-5}$ М на связывание радиоактивного SP с этими мембранами не оказывал влияния.

Обнаруженная сравнительно высокая чувствительность взаимодействия SP с ТХР к фосфолипазам A_2 представляет интерес в связи с тем, что различные фосфолипазы A_2 , в том числе и ферменты мозга, активируются рядом G-белков, сопряженных с G-белокзависимыми рецепторами [18]. Мембранные рецепторы и ферменты могут в большей или меньшей степени ингибироваться в результате катализируемого фосфолипазой A_2 гидролиза фосфолипидов. Так, например, недавно было показано [19], что различающиеся по основности фосфолипазы A_2 заметно различаются по ингибирующей способности в отношении Na^+ , K^+ -АТФ-азы мозга крысы, при этом изоформы АТФ-азы различались и по чувствительности к одной из фосфолипаз. Авторы предположили, что клеточные фосфолипазы способны специфически взаимодействовать с собственно Na^+ , K^+ -АТФ-азой или аннулярными липидами и выполнять роль эндогенного регулятора [19]. Такие же эффекты фосфолипазы A_2 можно ожидать и в отношении тахикининовых рецепторов.

Экспериментальная часть

Синтез радиоактивного производного вещества SP, модифицированного реагентом Болтона — Хантера (^{125}I -SP), и анализ его связывания с мембранами мозга крысы описаны в работах [20, 21]. В работе использованы компоненты яда *B. multicinctus* — α -бунгаротоксин (Serva, ФРГ), [^3H]- α -бунгаротоксин (Amersham, Великобритания) и κ -бунгаротоксин (Calbiochem, Швейцария), а также компоненты яда *N. n. oxiana* — нейротоксин II (Kemotex, Эстония), цитотоксин и фосфолипаза A_2 . Выделение цитотоксина проводили по методике работы [22], а фосфолипазы A_2 — по методике [11]. Токсин *3 N. n. siamensis* любезно предоставлен Е. Карлссоном (Институт биохимии, Уппсала, Швеция). Разделение токсинов и фосфо-

липаз проводили на колонке UltroPac TSK CM-3SW (Pharmacia-LKB, Швеция). Для хроматографии НТ II использовали 160 мМ ацетат аммония (рН 6,5), для фосфолипазы A_2 *N. n. oxiana* — градиент ацетата аммония от 20 до 200 мМ (рН 5,5) за 25 мин, для цитотоксина II *N. n. oxiana* — градиент от 20 до 500 мМ (рН 6,5) за 25 мин и для α -бунгаротоксина — от 65 до 200 мМ (рН 6,5) за 15 мин. Скорость элюции 1 мл/мин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stallcup W. B., Patric J. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1980. V. 77. № 1. P. 634–638.
2. Role L. W. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 9. P. 2924–2928.
3. Bcyd N. D., Leeman S. E. // J. Physiol. 1987. V. 389. № 1. P. 69–97.
4. Weiland G. A., Durkin J. A., Henley J. M., Simasko S. M. // Mol. Pharm. 1987. V. 32. № 5. P. 625–632.
5. Utkin Yu. N., Lazakovich E. M., Kasheverov I. E., Tsetlin V. I. // FEBS Lett. 1989. V. 255. № 1. P. 111–115.
6. Tsetlin V. I., Utkin Yu. N., Lazakovich E. M. // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1990. V. 594. P. 423–424.
7. Jaffe H., O'Neil J. B., Hallberg D. L., Kingan T., Barbour G., Lawson M., Kwart L. D., Ruff M. R., Pert C. B., Rao K. R. // Int. J. Biochem. 1990. V. 22. № 3. P. 239–245.
8. Bougis P. E., Marchot P., Rochat H. // Biochemistry. 1986. V. 25. № 22. P. 7235–7243.
9. Conti-Tronconi B. M., Tang F., Walgrave S., Gallagher W. // Biochemistry. 1990. V. 29. № 5. P. 1046–1054.
10. Kondo K., Toda H., Narita K. // J. Biochem. (Tokyo). 1981. V. 89. № 1. P. 37–47.
11. Ансалон У. Р., Шахборант О. Г., Мирошников А. И. // Биоорган. химия. 1977. Т. 3. № 11. С. 1553–1559.
12. Wolf K. M., Ciarleglio A., Chiappinelli V. A. // Brain Res. 1988. V. 439. № 1/2. P. 249–258.
13. Loring R. H., Schulz D. W., Zigmond R. E. // Progress in Brain Research. 1989. V. 79. P. 109–116.
14. Chiappinelli V. A., Wolf K. M., Grant G. A., Chen S.-J. // Brain Res. 1990. V. 509. № 2. P. 237–248.
15. Lukas R. J. // Biochemistry. 1984. V. 23. № 8. P. 1160–1164.
16. Wonnacott S. // J. Neurochem. 1986. V. 47. № 6. P. 1706–1712.
17. Quik M., Afar R., Audhya T., Goldstein G. // J. Neurochem. 1989. V. 53. № 4. P. 1320–1323.
18. Axelrod J., Burch R. M., Jelsema C. L. // Trends Neurosci. 1988. V. 11. № 3. P. 117–123.
19. Bougis P. E., Khelif A., Rochat H. // Biochemistry. 1989. V. 28. № 7. P. 3037–3043.
20. Лазакович Е. М., Мугале И. Э., Уткин Ю. Н., Цетлин В. И. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 3. С. 313–317.
21. Уткин Ю. Н., Лазакович Е. М., Кашеверов И. Е., Архипова С. Ф., Цетлин В. И. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 8. С. 1030–1036.
22. Гришин Е. В., Сухих А. П., Адамович Т. Б., Овчинников Ю. А. // Биоорган. химия. 1976. Т. 2. № 7. С. 1018–1034.

Поступила в редакцию
31.X.1991

Yu. N. UTKIN, I. E. KASHEVEROV, V. I. TSETLIN

EFFECTS OF PURIFIED SNAKE VENOM TOXIC COMPONENTS ON SUBSTANCE P BINDING TO RAT BRAIN MEMBRANES

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

Ion-exchange HPLC is used for purification of the snake venom α -neurotoxins, α -bungarotoxin, cytotoxins, and phospholipases A_2 . Among these purified polypeptides, phospholipases A_2 are found to be the most potent in inhibiting the substance P binding to rat brain membranes, $K_i \sim 10^{-3}$ M. Other toxins are weak inhibitors ($K_i \geq 10^{-3}$ – 10^{-5} M), earlier data on the inhibiting activity of α -bungarotoxin being caused by the commercial preparations' contamination with phospholipase A_2 .