



УДК 547.993.04

**СПЕЦИФИЧЕСКОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НЕЙРОТОКСИНА
ИЗ ЯДА ПЧЕЛЫ АПАМИНА С ПЛАЗМАТИЧЕСКИМИ
МЕМБРАНАМИ ПЕЧЕНИ КРЫС***Говалевская Г. И., Мирончиков А. И.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Найдено, что плазматические мембраны печени крыс специфически связывают апамин. Определены константа ассоциации и число мест связывания, равные соответственно $(7,4 \pm 1,7) \cdot 10^{12} \text{ M}^{-1}$ и $(8,5 \pm 2,4) \cdot 10^{-12}$ моль/мг белка. Обнаружено, что ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} ингибируют связывание апамина с плазматическими мембранами.

Апамин, наименьший из белковых нейротоксинов животного происхождения полипептид, поражает прежде всего центральную нервную систему [1]. Недавно было найдено, что его специфическое действие на специализированные нервные окончания (синапсомы из мозга крыс) связано с угнетением высокоаффинного захвата γ -аминомасляной кислоты [2]. В то же время рядом лабораторий было показано, что мембранные эффекты апамина обусловлены блокированием K^{+} -каналов в периферической нервной системе [3, 4].

Продолжая поиски мишени действия апамина как на центральной, так и на периферической нервной системе и исходя из данных [3] об ингибировании им увеличения калиевой проницаемости на гепатоцитах, вызванного АТР и норадреналином, мы исследовали взаимодействие апамина с плазматическими мембранами печени крыс, используя его радиоактивное производное.

Радиоактивное производное апамина мы получали с помощью метода восстановительного метилирования, наиболее благоприятного в отношении сохранения биологической активности [5, 6]. Условия реакции и методика очистки продукта метилирования были предварительно отработаны с меченым NaBH_4 . Полученное меченое производное апамина имело удельную радиоактивность 1,35 Ки/ммоль и биологическую активность, сравнимую с активностью природной молекулы. Спектры кругового дихроизма полученного производного и природной молекулы были идентичны [7].

Выделенная фракция плазматических мембран гепатоцитов обладала удовлетворительной степенью чистоты, что подтверждалось анализом ферментативной активности мембранных ферментов. Так, активность 5'-нуклеотидазы в плазматических мембранах в 13 раз превышала активность этого фермента в гомогенате печени, а активность АТР-азы — в 8 раз. Активность глюкозо-6-фосфатазы не была обнаружена. Кроме того, был проведен электронно-микроскопический анализ полученных плазматиче-

ских мембран*, свидетельствующий о высокой гомогенности полученного препарата.

Взаимодействие плазматических мембран с апаминном характеризуется насыщением (рис. 1), однако при этом наблюдается высокий уровень неспецифического связывания. Лишь 30–40% радиоактивного апаминна, полученного в комплексе с плазматическими мембранами, замещалось природным нейротоксином. Высокую степень неспецифического связывания апаминна отмечали и ранее при работе с синаптосомами [6]. Анализ кривых специфического связывания радиоактивного производного апаминна с плазматическими мембранами в координатах Скотчарда по методу Розенталя [8] позволил определить значение константы ассоциации, которое составило $(7,4 \pm 1,7) \cdot 10^{12} \text{ M}^{-1}$, и число мест связывания, $(8,5 \pm 2,4) \cdot 10^{-12} \text{ моль/мг}$ общего белка плазматических мембран, считая, что одна молекула нейротоксина связывается с одной молекулой рецептора (рис. 2).

Интересно, что добавление 4 мМ CaCl_2 в инкубационную среду снижает связывание радиоактивного производного апаминна с плазматическими мембранами приблизительно на 30%. Увеличение концентрации CaCl_2 до 40 мМ приводит к уменьшению связывания до 35% (рис. 3). Ca^{2+} -Зависимый характер взаимодействия апаминна с мембранами был отмечен и ранее при исследовании высвобождения γ -аминомасляной кислоты из синапсом [2]. В среде без Ca^{2+} апамин даже в высоких концентрациях не оказывал влияния на захват нейромедиатора синаптосомами. Предварительные данные, полученные при изучении влияния ионов магния на связывание радиоактивного производного апаминна с плазматическими мембранами, показывают, что их действие аналогично.

Увеличение времени инкубации от 10 до 45 мин не приводит к заметному изменению связывания радиоактивного аналога апаминна с плазматическими мембранами.

Фракции, полученные в процессе выделения плазматических мембран после сахарозного градиента, также были проверены на связывание с радиоактивным производным апаминна. Оказалось, что фракции, расположенные между слоями сахарозы с плотностями 1,18 и 1,20, а также 1,20 и 1,22 (мембраны эндоплазматического ретикулума, митохондриальные фрагменты и другие клеточные органеллы), не взаимодействуют с апаминном, за исключением осадка на дне центрифужной пробирки, содержащего неразрушенные клетки, ядерные и митохондриальные фрагменты. Константа ассоциации имела тот же порядок, что и константа ассоциации радиоактивного производного апаминна с фракцией плазматических мембран. Таким образом, результаты, полученные в настоящей работе, дают основание полагать, что апамин специфически связывается с плазматическими мембранами гепатоцитов.

Авторы выражают благодарность акад. Ю. А. Овчинникову за участие в обсуждении результатов и критические замечания.

Экспериментальная часть

Апамин из яда медоносной пчелы выделяли как описано ранее [7]. Восстановительное метилирование проводили по Е. Хаберманну и сотр. [5]. Для этого использовали NaB^3H_4 с удельной радиоактивностью 9,7 Ки/ммоль (Amersham, Англия) и формальдегид (Fluka, Швейцария). После реакции радиоактивное производное апаминна отделяли гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-25, уравновешенной 0,05 М аммоний-ацетатным буфером (рН 7,8). Полученный препарат имел радиоактивность 1,35 Ки/ммоль.

* Электронно-микроскопический анализ проведен в лаборатории электронной микроскопии Всесоюзного онкологического научного центра АМН СССР ст. науч. сотр. Ю. В. Машковцевым.

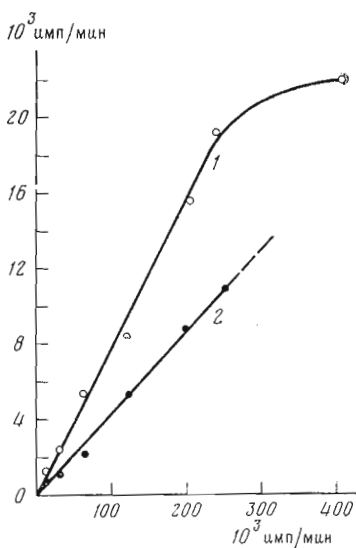


Рис. 1

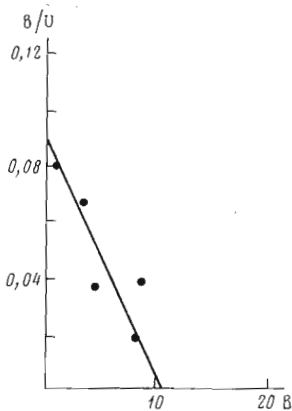


Рис. 2

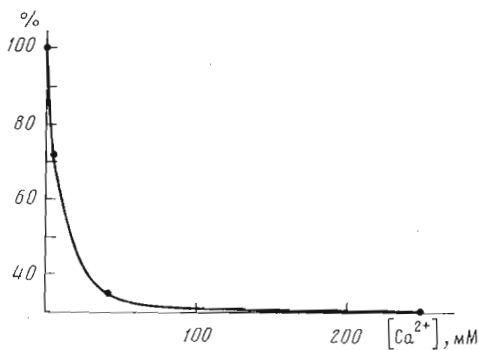


Рис. 3

Рис. 1. Связывание радиоактивного производного апамина плазматическими мембранами гепатоцитов крыс в отсутствие (1) и с добавлением в инкубационную среду нативного апамина, $5 \cdot 10^{-5}$ М (2). По оси абсцисс и по оси ординат — соответственно концентрация добавленного и связанного $[^3\text{H}]$ апамина

Рис. 2. Специфическое связывание радиоактивного производного апамина плазматическими мембранами гепатоцитов крыс. По оси абсцисс — концентрация связанного $[^3\text{H}]$ апамина, фмоль/мкг мембранного белка (B); по оси ординат — отношение связанного $[^3\text{H}]$ апамина к свободному $[^3\text{H}]$ апамину (B/U)

Рис. 3. Зависимость связывания радиоактивного производного апамина от концентрации CaCl_2 в растворе. Приведены усредненные данные, полученные для концентраций апамина $5 \cdot 10^{-8}$, $15 \cdot 10^{-8}$, $5 \cdot 10^{-7}$ М

Для получения плазматических мембран использовали печень самцов крыс линии «Вистар» (200–250 г). Плазматические мембраны печени выделяли в ступенчатом градиенте плотности сахарозы на центрифуге «Spinco L-2-50» (Beckman, США) по методу Невилла в модификации Рея [9] (фракция, находящаяся между слоями с плотностями 1,18 и 1,16). Эксперименты по выделению плазматических мембран и связыванию их с апаминном проводили при 4°C . Концентрацию мембранного белка определяли по методу Лоури в модификации для мембран и липопротеидов [10]. В качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин (Serva, ФРГ). Чистоту мембран проверяли по активности маркерных ферментов: 5'-нуклеотидазы [11], Na^+ , K^+ -АТФ-азы [11] и глюкозо-6-фосфатазы [12]. Неорганический фосфор определяли по методу [13]. В экспериментах использовали трис-хлорид (Merck, ФРГ), АМР, АТР и NaHCO_3 (Sigma, США), додецилсульфат Na (Serva, ФРГ), молибдат аммония (Fluka, Швейцария), сахарозу (х.ч., «Союзреактив»). Остальные реактивы ос.ч. («Союзреактив»).

Связывание радиоактивного производного апамина с плазматическими мембранами. Плазматические мембраны инкубировали с радиоактивным производным апаминна при 4°C в течение 10 мин в буфере А (50 мМ трис-

HCl, pH 7,4), 1% бычий сывороточный альбумин. Концентрация плазматических мембран в инкубационной смеси 0,6–0,9 мг белка в 1 мл буфера А, концентрация апамина $5 \cdot 10^{-8}$ – $5 \cdot 10^{-7}$ М.

В отдельном эксперименте плазматические мембраны (0,6 мг/мл) инкубировали 1 ч с $5 \cdot 10^{-7}$ М апамином, отбирая аликвоты (0,5 мл) через каждые 10 мин.

После инкубации 0,5 мл инкубационной смеси разбавляли 1 мл холодного буфера А и несвязанный радиоактивный апамин удаляли, промывая плазматические мембраны дважды центрифугированием при 9000g по 3 мин на центрифуге К24 (Janetzi, ГДР). Полученный осадок ресуспендировали в 0,5 мл 50 мМ трис-HCl-буфера (pH 7,4) и измеряли радиоактивность проб, добавляя по 5 мл тритон-толуольного (1 : 2) сцинтиллятора в счетчике «Mark III» (Nuclear Chicago, США).

Для исследования конкуренции апамина с радиоактивным производным за места связывания плазматические мембраны инкубировали в буфере А с 10^{-5} М апамином и радиоактивным производным $5 \cdot 10^{-8}$ – $5 \cdot 10^{-7}$ М. Инкубацию проводили как описано выше. В качестве контроля использовали инкубационные смеси, не содержащие нативный апамин.

Для изучения влияния двухвалентных катионов на связывание радиоактивного производного апамина с плазматическими мембранами в инкубационную смесь, содержащую плазматические мембраны и радиоактивное производное апамина ($5 \cdot 10^{-8}$, $15 \cdot 10^{-8}$ и $5 \cdot 10^{-7}$ М), добавляли CaCl_2 или MgCl_2 до концентраций 4, 40 и 250 мМ. В качестве контроля использовали инкубационные смеси, не содержащие CaCl_2 или MgCl_2 . Связывание, полученное в контрольных опытах, принимали за 100%.

Связывание радиоактивного производного апамина с клеточными фракциями, полученными после сахарозного градиента в процессе выделения плазматических мембран, исследовали с фракциями, расположенными на дне центрифужной пробирки, между слоями сахарозы с плотностями 1,22 и 1,20, а также 1,20 и 1,18, как описано выше.

Достоверность различий при статистической обработке результатов оценивали по критерию Стьюдента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Habermann E. Bee and wasp venoms.— Science, 1972, № 177, p. 314–322.
2. Елякова Е. Г., Луценко В. К., Подрезова Е. И., Луценко Н. Г., Мирошников А. И. Исследование взаимодействия нейротоксина из яда пчелы апамина с синапсомамп.— Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 11, с. 1651–1659.
3. Banks B. E. S., Brown C., Burgess G. M., Burnstock G., Claret M., Cocks T. M., Jenkinson D. H. Apamin blocks certain neurotransmitter-induced increases in potassium permeability.— Nature, 1979, № 282, p. 415–417.
4. Maas A. J. J., Den Hertog A., Ras R., Van Den Akker J. The action of apamin on guinea-pig taenia caeci.— Eur. J. Pharmac., 1980, v. 67, p. 265–274.
5. Cheng-Raude D., Treloar M., Habermann E. Preparation and pharmacokinetics of labeled derivatives of apamin.— Toxicon, 1976, v. 14, p. 467–476.
6. Cavey D., Vincent J.-P., Lazdunski M. A search for the apamin receptor in the central nervous system.— Toxicon, 1979, v. 17, p. 176–179.
7. Мирошников А. И., Елякова Е. Г., Куделин А. Б., Сенявина Л. Б. Исследование физико-химических характеристик нейротоксина апамина из яда медоносной пчелы *A. mellifica*.— Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 8, с. 1022–1028.
8. Rosenthal H. E. A graphic method for the determination and presentation of binding parameters in a complex system.— Anal. Biochem., 1967, v. 20, p. 525–532.
9. Ray T. K. A modified method for the isolation of the plasma membrane from rat liver.— Biochim. et biophys. acta, 1970, v. 196, p. 1–9.
10. Markwell M. A. K., Haas B. M., Bieber L. L., Tolbert N. E. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples.— Anal. Biochem., 1978, v. 87, p. 206–210.
11. Wright G. H. Changes in plasma membrane enzyme activities during liver regeneration in the rat.— Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 470, p. 368–381.
12. Cori G. T., Cori C. F. Glucose-6-phosphatase of the liver in glycogen storage disease.— J. Biol. Chem., 1952, v. 199, p. 661–667.
13. Rajan J. C., Klein L. Determination of inorganic phosphorus in the presence of organic phosphorus and high concentrations of proteins.— Anal. Biochem., 1976, v. 72, p. 407–412.

Поступила в редакцию
16.VI.1981

SPECIFIC BINDING OF APAMIN, A NEUROTOXIN FROM BEE VENOM,
WITH RAT LIVER PLASMA MEMBRANES

KOVALEVSKAYA G. I., MIROSHNIKOV A. I.

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

It was found that plasma membranes of rat liver specifically bind apamin. The association constant and the number of binding sites were estimated as $(7,4 \pm 1,7) \cdot 10^{12} \text{ M}^{-1}$ and $(8,5 \pm 2,4) \cdot 10^{-12} \text{ mol/mg protein}$, respectively. Ca^{2+} and Mg^{2+} ions were shown to inhibit apamin binding with the plasma membranes.
