



УДК 595.799:591.145.3

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ТЕРТИАПИНА, НЕЙРОТОКСИНА ИЗ ЯДА ПЧЕЛЫ, С КАЛЬМОДУЛИНОМ

*Мирошников А. И., Бойков В. А., Снежкова Л. Г.*

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР, Москва*

*Северин С. Е., Швец В. И.*

*Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова*

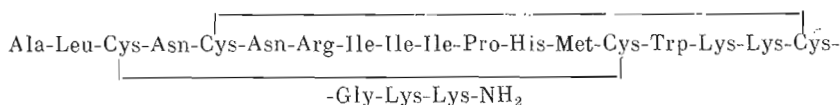
*Дудкин С. М.*

*Институт органической химии им. П. Д. Зелинского Академии наук СССР, Москва*

Тертиапин, нейротоксин из яда пчелы, в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  специфически взаимодействует с кальмодулином из мозга крупного рогатого скота. Природа взаимодействия детально изучена на системе кальмодулин — фосфодиэстераза сАМР. Тертиапин не изменяет базальную активность фосфодиэстеразы, однако полностью блокирует активирующую способность кальмодулина. Анализ зависимости степени активации фермента от концентрации кальмодулина в присутствии нейротоксина показал, что ингибирующее действие кальмодулина проявляется после того, как с ним связываются две молекулы тертиапина с константой диссоциации 2 мкМ. Возможно, что токсический эффект тертиапина обусловлен блокированием функции кальмодулина в сложном механизме регуляции нервного возбуждения.

Нейротоксины, обладающие исключительной специфичностью биологического действия, являются удобными инструментами исследования различных физиологических процессов. Так, с помощью  $\alpha$ -токсинов из яда змей семейства элапидов удалось выделить и охарактеризовать постсинаптический ацетилхолиновый рецептор никотинового типа; тетродотоксин, батрахотоксин, токсины яда морской анемоны и скорпиона оказались полезными при исследовании  $\text{Na}^+$ -каналов электровозбудимых мембран;  $\beta$ -бунгаротоксин, нотексин и другие токсины с фосфолипазной активностью используются при изучении процессов выделения нейромедиаторов из пресинаптической мембраны [1—3]. Поэтому токсины из различных источников и поиски мишени их действия могут оказаться полезными при исследовании ряда биологических процессов на молекулярном уровне.

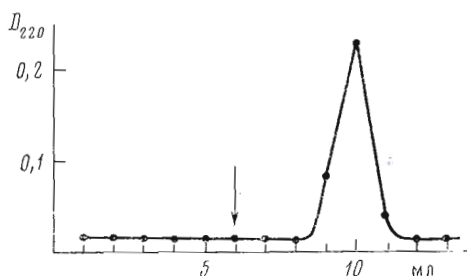
Ранее было показано, что тертиапин, нейротоксин из яда пчелы,



блокирует выделение нейромедиатора из пресинаптического нервного окончания, влияя на уровень ионизированного  $\text{Ca}^{2+}$  в аксоплазме, который в состоянии покоя определяется системами, стабилизирующими концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  на относительно низком уровне [4]. С другой стороны, недавно Вайсом и сотр. [5] было найдено, что некоторые нейропептиды как эндогенного, так и экзогенного происхождения существенно ингибируют модулирующее действие кальмодулина —  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающего белка, регулирующего активность достаточно большого набора  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых ферментов.

С учетом этих данных в поисках мишени действия токсинов из яда пчелы мы исследовали взаимодействие тертиапина с кальмодулином из мозга млекопитающих.

Рис. 1. Хроматография тертиапина на кальмодулин-сефарозе. На колонку (1×3,5 см), уравновешенную буферным раствором, содержащим 20 мМ трис-НСl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ CaCl<sub>2</sub>, 0,15 М NaCl (рН 7,5), наносили 0,2 мг тертиапина. Стрелкой обозначен момент добавления в буферный раствор 10 мМ EGTA



Для предварительной характеристики связывания тертиапина с кальмодулином мы использовали хроматографию нейротоксина на кальмодулин-сефарозе. Оказалось, что в том случае, когда носитель уравновешен буферным раствором, содержащим ионы Ca<sup>2+</sup>, тертиапина количественно сорбируется на аффинном сорбенте. Добавление в элюирующий раствор этиленгликольтетраацетата в концентрации, превышающей концентрацию Ca<sup>2+</sup>, приводит к количественной десорбции токсина (рис. 1). Это свидетельствует, что тертиапин специфически взаимодействует с активированной формой кальмодулина. Для детального выяснения характера взаимодействия тертиапина была использована кальмодулинзависимая фосфодиэстераза из мозга млекопитающих — наиболее употребляемая система в структурно-функциональных исследованиях кальмодулина и его аналогов. Изучение влияния тертиапина на активность фосфодиэстеразы в присутствии и в отсутствие кальмодулина показало, что нейротоксин не изменяет базальную активность фермента и в то же время полностью снимает активирующее действие модулятора.

Кальцийзависимый характер связывания тертиапина с кальмодулином позволил исследовать природу взаимодействия нейротоксина с системой модулятор — фермент. Ранее было показано [6], и это подтверждено в настоящей работе, что кальмодулин активирует фосфодиэстеразу по принципу V-активации, т.е. увеличивает число оборотов реакции, не влияя на скорость фермента к субстрату. Это позволило вычитать при анализе экспериментальных данных базальную активность фосфодиэстеразы, составляющую 10% от максимальной, и использовать степень активации фермента кальмодулином в качестве индикатора комплексообразования.

Данные, полученные при исследовании активации фосфодиэстеразы кальмодулином в присутствии нейротоксина в различных концентрациях (рис. 2), свидетельствуют о простом гиперболическом характере активации. Увеличение концентрации тертиапина не приводит к изменению степени максимальной активности фермента, но ухудшает константу связывания фосфодиэстеразы с кальмодулином. Контрольные эксперименты показали, что в соответствии со сказанным выше во всей исследованной области концентраций тертиапина (1–10 мкМ) активность апофермента не изменяется, т.е. в системе кальмодулин — фосфодиэстераза нейротоксин ингибирует только активирующее действие кальмодулина. Анализ данных, приведенных на рис. 2 в координатах Хилла, показал, что активация фосфодиэстеразы как в отсутствие, так и в присутствии тертиапина не имеет характера кооперативности и с одной каталитической субъединицей фермента связывается одна молекула модулятора (табл. 1).

На рис. 3 и в табл. 2 приведены результаты, полученные при исследовании ингибирования тертиапином действия кальмодулина при различных концентрациях последнего. Во всех случаях коэффициент Хилла приближается к 2. Это означает, что с одной молекулой кальмодулина связываются как минимум две молекулы нейротоксина и что это связывание имеет характер положительной кооперативности. В то же время отсутствие кооперативности при активации фосфодиэстеразы кальмодулином в присутствии нейротоксина (табл. 1) указывает на то, что обнаруженная положительная кооперативность имеет формальный характер. Простым объяснением этого факта может служить вывод, что молекула кальмоду-

Константы активации и коэффициенты Хилла для взаимодействия кальмодулина с фосфодиэстеразой в присутствии тертиапина

[Тертиапин], мкМ	$K_a(\text{каж})$ , нМ	$h$	[Тертиапин], мкМ	$K_a(\text{каж})$ , нМ	$h$
0	1,2	1,01	5	10,1	0,86
1,76	2,9	1,02	8	20,4	1,05
3	4,24	0,99	10	42,66	0,98

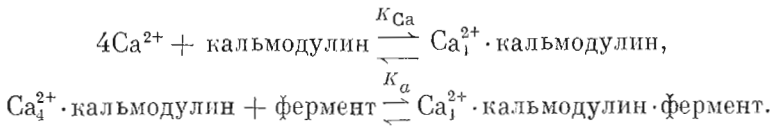
Таблица 2

Константы ингибирования и коэффициенты Хилла для взаимодействия тертиапина с кальмодулином при активации фосфодиэстеразы

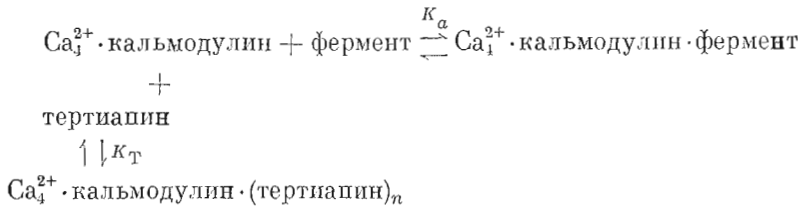
[Кальмодулин], нМ	$K_T(\text{каж})$ , мкМ	$h$	[Кальмодулин], нМ	$K_T(\text{каж})$ , мкМ	$h$
1	2,29	1,83	7	5	1,9
3	3,31	1,84	16	6,68	2,1

лина теряет способность к активации фермента после того, как все центры связывания с нейротоксином будут насыщены.

Общепринятая схема активации фосфодиэстеразы кальмодулином имеет следующий вид [7]:



В рамках этой схемы модель действия тертиапина в исследуемой системе можно описать схемой



где  $n$  — число молекул тертиапина, связывание которых приводит к ингибированию активирующего действия кальмодулина, а  $K_T$  — константа взаимодействия тертиапина с комплексом кальций — кальмодулин.

Для проверки адекватности предложенной модели полученным экспериментальным данным, а также для определения параметров  $n$  и  $K_T$  было получено простое кинетическое уравнение, описывающее предложенную схему. При его выводе в соответствии со сказанным выше считали, что приведенная активация ( $v_a/V_a$ ) соответствует фракции фермента, находящейся в комплексе с кальмодулином. Общее уравнение скорости, описывающее приведенную активацию фосфодиэстеразы, будет иметь вид, аналогичный уравнению Михаэлиса — Ментен:

$$\frac{v_a}{V_a} = \frac{[\text{CaM}]}{K_a + [\text{CaM}]}, \quad (1)$$

где  $\text{CaM}$  — комплекс кальмодулина с четырьмя ионами кальция. В соответствии с предложенной схемой в присутствии тертиапина уравнение 1

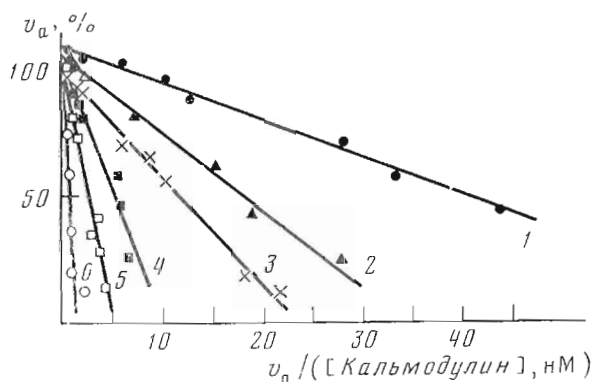


Рис. 2

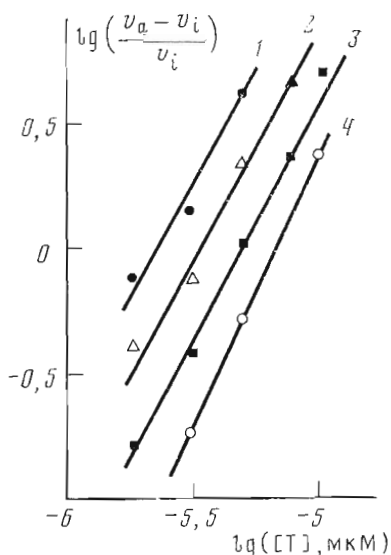


Рис. 3

Рис. 2. Зависимость степени активации фосфодиэстеразы от концентрации кальмодулина в отсутствие (1) и в присутствии 1,76 (2), 3 (3), 5 (4), 8 (5) и 10 мкМ (6) тертиапина. Состав инкубационной смеси см. «Экспериментальную часть»

Рис. 3. Зависимость степени активации фосфодиэстеразы от концентрации тертиапина в присутствии 1 (1), 3 (2), 7 (3) и 16 нМ (4) кальмодулина в координатах Хилла

трансформируется в выражение, аналогичное уравнению для линейного конкурентного ингибирования:

$$\frac{v_a}{V_a} = \frac{[CaM]}{[CaM] + K_a(1 + [T]/K_T)^n}, \quad (2)$$

вид которого хорошо соответствует простой гиперболической кинетике, наблюдаемой при активации фосфодиэстеразы кальмодулином в присутствии тертиапина (Т). При этом, как и в схеме, делается предположение, что комплекс кальмодулина с нейротоксином полностью лишен модуляторной способности и что реакция проходит в условиях быстрого равновесия. Последнее было обусловлено выбором экспериментальных условий, при которых реакционную смесь, содержащую фосфодиэстеразу, кальмодулин и тертиапин, преинкубировали в течение 10 мин при 30° С, а реакцию начинали добавлением субстрата.

Уравнение 2 позволяет анализировать полученные экспериментальные результаты в координатах зависимости  $K_a^{1/n}$  от концентрации нейротоксина. При этом величину  $n$  определяют по графику, дающему прямую линию, величину  $K_T$  — по ее пересечению с осью абсцисс, а пересечение с осью ординат дает  $K_a^{1/n}$ .

Полученные результаты представлены на рис. 4. Видно, что график при  $n$ , равном 2, хорошо совпадает с экспериментальными данными. Это указывает на существование в молекуле кальмодулина, активированной  $Ca^{2+}$ , двух центров связывания тертиапина. Соответствующие значения для  $K_T$  и  $K_a$  составляют 2 мкМ и 0,8 нМ. Последняя величина хорошо согласуется с известными литературными данными по активации фосфодиэстеразы и других кальмодулинзависимых ферментов [8].

Таким образом, из полученных данных следует, что только тройной комплекс тертиапина<sub>2</sub>·кальмодулин теряет активирующие свойства. Соответственно двойной комплекс, тертиапин·кальмодулин, по-видимому, может связываться с фосфодиэстеразой, и его формирование не дает измеряемого эффекта на ферментативную активность. Соответствие между выбранной кинетической моделью и экспериментальными результатами показано на рис. 5. Видно, что во всей изученной области концентраций

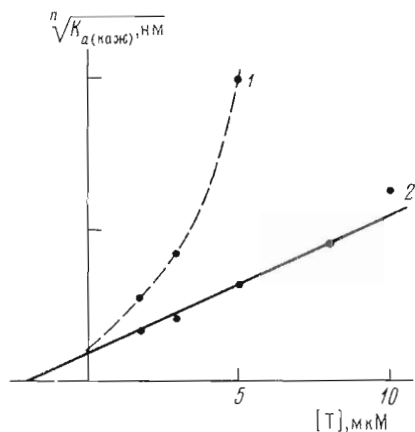


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость константы активации фосфодиэстеразы кальмодулином от концентрации тертиапина в соответствии с уравнением 2. 1 — зависимость при  $n$ , равном 1; 2 — зависимость при  $n$ , равном 2

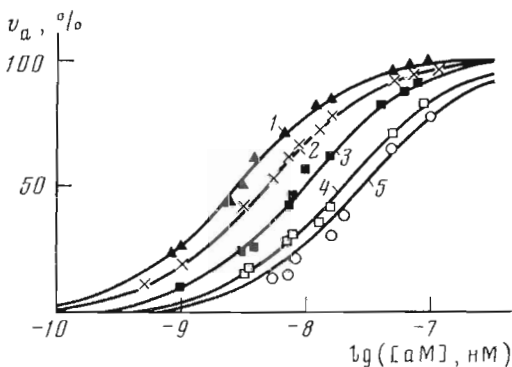


Рис. 5

Рис. 5. Зависимость степени активации фосфодиэстеразы от концентрации кальмодулина в присутствии 1,76 (1), 3 (2), 5 (3), 8 (4) и 10 мкМ (5) тертиапина. На графике точками отмечены все экспериментальные данные, представленные на рис. 2 и 3. Сплошные линии проведены в соответствии с уравнением 2, используя значения  $K_a$  0,8 нМ,  $K_T$  2 мкМ и  $n$  2

кальмодулина и нейротоксина наблюдается хорошая согласованность между теоретическими кривыми, полученными по уравнению 2, и степенью активации фосфодиэстеразы.

Для подтверждения специфичности действия тертиапина на кальмодулин аналогичные исследования были проведены с апамином — нейротоксином, выделенным из того же источника [9]. Несмотря на структурную аналогию токсинов, апамин не связывался с кальмодулином и не ингибировал кальмодулинзависимую активность фосфодиэстеразы в широком диапазоне концентраций.

Поскольку Ди Лоренце [10] было показано участие кальмодулина в процессах выделения нейромедиатора из пресинаптических нервных окончаний, можно предположить, что эффект тертиапина обусловлен блокированием функции кальмодулина в сложном механизме регуляции нервного возбуждения. Следует подчеркнуть, что ингибирование тертиапином фосфодиэстеразы может не быть ключевым этапом токсического действия этого токсина, однако несомненно его влияние на регуляцию биологических процессов, происходящих с участием белкового модулятора — кальмодулина.

### Экспериментальная часть

Тертиапин получали из низкомолекулярной фракции яда пчелы *Apis mellifera* аналогично работе [4]. Полипептид был индивидуален по данным тонкослойной хроматографии на пластинках силикагеля Eastman 6060 (США) в системе *n*-бутанол — пиридин — вода — уксусная кислота, 15 : 10 : 18 : 3, и аминокислотному анализу. Кальмодулин выделяли из мозга быка по методу [11]. Выход белка составлял 40—50 мг/кг мозга, он был гомогенен при электрофорезе в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, этиленгликольтетраацетата (EGTA) или  $Ca^{2+}$  [12]. Фосфодиэстеразу сАМР получали из мозга быка аналогично [13]. Фермент активировался в 8—10 раз кальмодулином, и его удельная активность составляла 240—260 ед. акт./мг. Кальмодулин-сефарозу получали по методу, описанному в работе [14].

В работе использовали целлюлозы CM-52 и DE-52 (Whatman, Англия), сефадекс G-15, ультрагели АсА 44 и АсА 34, (ЛКВ, Швеция), сефарозу 4В,

голубую сефарозу (Pharmacia, Швеция), биогель Р-4, ионообменную смолу AG 1×2 (200–400 меш; Bio-Rad, США). Для приготовления буферных растворов применяли имидазол (Pierce, Англия), трис-основание (Sigma, США), EGTA, EDTA, дитиотреит (Serva, ФРГ). Остальные реактивы отечественного производства квалификации ос.ч. Все растворы готовили на деионизованной воде.

Активность фосфодиэстеразы определяли в буферном растворе, содержащем 40 мМ имидазол, 40 мМ трис, 0,1 мМ дитиотреит, 5 мМ ацетат магния, 0,1 мМ хлористый кальций, доведенный до pH 8 ледяной уксусной кислотой. Реакционную смесь (конечный объем 100 мкл), содержащую фосфодиэстеразу, кальмодулин и/или токсин, преинкубировали 10 мин при 30° С и реакцию начинали добавлением сАМР (конечная концентрация 1 мМ; Reanal, Венгрия) и [<sup>3</sup>H]сАМР (200 000 имп/мин; Amersham, Англия). Гидролиз проводили 15 мин при 30° С и реакцию останавливали кипячением в течение 2 мин на водяной бане. После охлаждения в реакционную смесь добавляли 10 мкл раствора яда дальневосточного щитомордника (ТИБОХ АН СССР) с концентрацией 2 мг/мл и инкубировали ее еще 10 мин при 30° С. Непрореагировавший сАМР отделяли сорбцией на AG 1×2. Для этого к реакционной смеси добавляли 1 мл суспензии ионообменника в формиатной форме в воде в соотношении 1 : 2 (по объему), перемешивали и центрифугировали. Из водного слоя, содержащего аденозин, отбирали 0,5 мл и добавляли 10 мл сцинтилляционной жидкости ЖС-8 (Союзреактив). Неспецифическую сорбцию аденозина на ионообменнике учитывали, проводя полный гидролиз сАМР в тех же условиях. Во всех случаях концентрацию фосфодиэстеразы подбирали таким образом, чтобы степень превращения субстрата не превышала 10%. Каждое измерение проводили минимум два раза, и ошибка определения начальных скоростей ферментативной реакции не превышала ±10%. Прямые на графиках проводили с помощью линейного регрессионного анализа наименьших квадратов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Albuquerque E. X., Elderfawi A. T., Eldefrawi M. E.* In: Snake venom/Ed. Lee C.-Y. Berlin — Heidelberg — New York: Springer-Verlag, 1979, p. 377–402.
2. *Catterall W. A.* Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 1980, v. 20, № 1, p. 15–43.
3. *Karlsson E.* In: Snake venom/Ed. Lee C.-Y. Berlin — Heidelberg — New York: Springer-Verlag, 1979, p. 159–212.
4. *Овчинников Ю. А., Мирошников А. И., Куделин А. Б., Костина М. Б., Бойков В. А., Магазаник Л. Г., Гогильф И. М.* Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 3, с. 359–365.
5. *Weiss B., Slinger-Bornette M.* In: Basic Pharmacology. V. 1. Apomorphine and other dopaminomimetics/Eds Gesse G. L., Corsini G. U. N. Y.: Raven Press, 1981, p. 179–192.
6. *Morrill M. E., Thompson S. I., Stellwagen E. J.* Biol. Chem., 1979, v. 254, № 11, p. 4371–4374.
7. *Lin J. M., Liu J. P., Cheung W. G.* FEBS Lett., 1975, v. 49, № 2, p. 356–360.
8. *Calcium and Cell Function. V. 1/Ed. Cheung Y. U. N. Y.: Acad. Press, 1980, p. 128–165, 167–182, 305–328.*
9. *Мирошников А. И., Елякова Е. Г., Куделин А. Б., Сенявина Л. Б.* Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 8, с. 1022–1028.
10. *DeLorenzo R. J.* Fed. Proc., 1982, v. 41, № 3, p. 2265–2272.
11. *Dedman J. R., Potter J. D., Jackson R. L., Ionson I. D., Means A. R.* J. Biol. Chem., 1977, v. 252, № 23, p. 8415–8422.
12. *Burgess W. H., Jemiolo D. K., Kretsinger R. H.* Biochim. et biophys. acta, 1980, v. 623, № 1, p. 257–270.
13. *Sharma R. K., Wang T. H., Wirch E., Wang J. H. J.* Biol. Chem., 1980, v. 255, № 12, p. 5916–5923.
14. *Klee C. B., Krinks M. H.* Biochemistry, 1978, v. 17, № 1, p. 120–126.

Поступила в редакцию  
16.VII.1982

# INTERACTION BETWEEN TERTIAPIN, A NEUROTOXIN FROM BEE VENOM, AND CALMODULIN

MIROSHNIKOV A. I., BOIKOV V. A., SNEZHKOVA L. G., SEVERIN S. E.,  
SHVETS V. I., DUDKIN S. M.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow; M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow; N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Tertiapin, a neurotoxin from the honey bee venom, interacts specifically with calmodulin in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ . The nature of this interaction was studied using calmodulin - cAMP phosphodiesterase system. Tertiapin does not affect the unstimulated basal activity of phosphodiesterase. However, it totally inhibits the enzyme-activating capacity of calmodulin. Analysis of the dose-dependent activation of phosphodiesterase by calmodulin in the presence of tertiapin indicated that inhibition is caused by the interaction of two tertiapin molecules with calmodulin ( $K_d$  2  $\mu\text{M}$ ). The data obtained suggest that the toxic effect of tertiapin in nervous tissue is mediated by blockade of calmodulin function.