



MCT

УДК 577.112:612.124.017.1:591.145.3-812

НОВЫЙ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЙ БЕЛКОВЫЙ ЭФФЕКТОР
КОМПЛЕМЕНТА ЧЕЛОВЕКА ИЗ ЯДА СРЕДНЕАЗИАТСКОЙ КОБРЫ
NAJA NAJA OXIANA

Бозлов Л. В., Соляков Л. С., Зинченко А. А.

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

Из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana* выделены шесть белковых эффекторов комплемента человека. Три белка (M_r 61 000, 5000 и 3000) имеют кислые свойства, а три других — основные белки с M_r 54 000, 9000 и 7000. Два низкомолекулярных основных белка, СFB-II и СFB-III, выделены в больших количествах — 115 и 85 мг на 1 г сухого яда. Все эффекторы ингибируют классический путь активации комплемента, а также, за исключением СFB-II и СFB-III, альтернативный. СFB-III усиливает альтернативный путь активации. Определение N-концевой аминокислотной последовательности СFB-III показало его идентичность ранее найденному цитотоксину II. Действие СFB-III на классический путь активации комплемента заключается в инактивации компонента С4. Предложен также механизм активации альтернативного пути эффектором СFB-III. СFB-III, по-видимому, превращает компонент С3 в С3b-подобный, образующий растворимую С3-конвертазу.

Антикомплементарное действие яда кобры известно давно (см. [1] и цитированные там более ранние работы). К настоящему времени установлены три антикомплементарные активности.

1. Наиболее изученный фактор яда кобры (CVF) — гликопротеид с M_r 144 000 (или 156 000, в зависимости от вида кобр), состоящий из трех цепей с $\sim M_r$ 70 000, 50 000 и 30 000, соединенных дисульфидными связями, с $pI \sim 5,2-6,4$. Это один из наиболее кислых белков яда [1-7]. CVF представляет собой аналог С3b и, по-видимому, является С3b-компонентом кобры, поскольку CVF иммунохимически близок компоненту С3 человека [8]. Так же, как и С3b, CVF в присутствии Mg^{2+} связывает фактор В и после активации фактором D образует растворимую С3-конвертазу — CVFBb. Последний комплекс существенно более стабилен, чем комплекс С3bBb, — его время полураспада измеряется часами, и, кроме того, он не атакуется контролируемыми белками — факторами Н и I [7]. Конвертаза CVFBb из *N. n. naja* расщепляет как компонент С3, так и С5, что обусловлено способностью данного фактора кобры связывать компонент С5 [3]. Однако конвертаза CVFBb из *N. n. haje* не расщепляет компонент С5 и соответствующий фактор CVF не связывает С5 [3].

2. Высокомолекулярный фактор яда кобры (H-CoF) был обнаружен при выделении CVF [1]. H-CoF имеет $M_r \sim 800 000$ и ингибирует комплемент, действуя, по-видимому, на ранние стадии активации. При инкубации H-CoF с сывороткой крови потребление компонента С3 не наблюдается. Механизм действия детально не исследовался.

3. Ингибитор из кобры (CI) был открыт фон Цаберном и сотр. [9] в яде кобры *N. haje*. Ингибитор представляет собой основной гликопротеид ($M_r \sim 26 000$, pI 8,6 [7, 9]) и образует обратимые комплексы с компонентами С3, С4 и их активированными фрагментами С3b и С4b. CI ингибирует связывание С2 на С4b и образование С3-конвертазы [9, 10]. CI не обладает высокой токсичностью: так, инъекция мышам в дозе 5 мкг/г не вызывает заметного действия.

Сокращения: EA — эритроциты барана, покрытые кроличьими антителами против них, EAC14 — комплексы EA с компонентами комплемента C1 и C4, VBS — верналовый изотонический буфер, VBS²⁺ — VBS, содержащий ионы Mg^{2+} и Ca^{2+} .

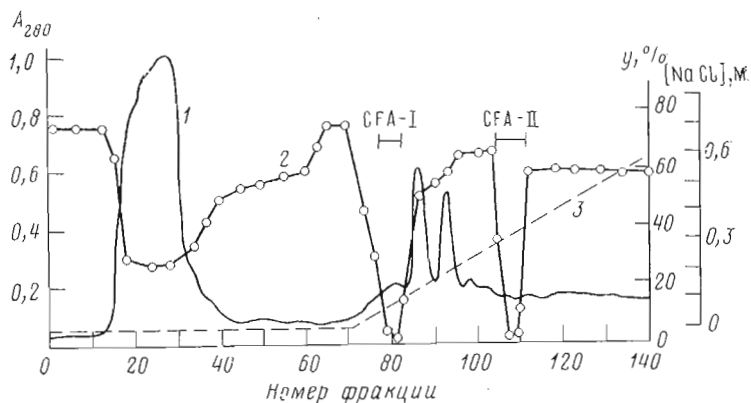


Рис. 1. Хроматография яда кобры на DEAE-сефарозе CL-6B: 1 — A_{280} , 2 — антикомплементарная активность (степень лизиса — y), 3 — градиент концентрации NaCl. Фракции 15–40 — «проскок»

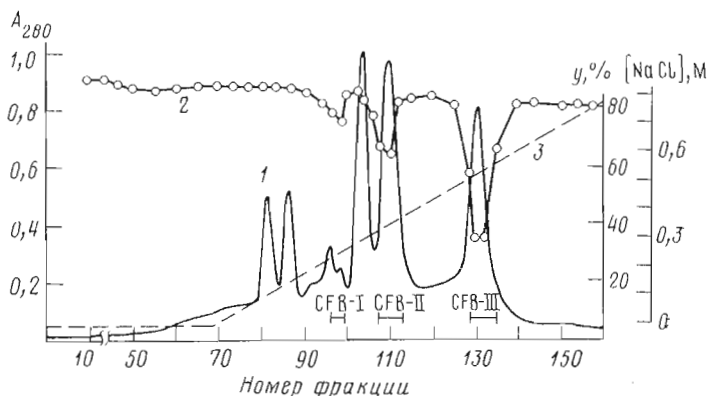


Рис. 2. Хроматография на CM-сефарозе CL-6B фракции не сорбируемых DEAE-сефарозой белков («проскока»). Обозначения те же, что и на рис. 1

Некоторые различия, наблюдающиеся для антикомплементарных белков яда различных кобр, побудили нас исследовать антикомплементарные свойства яда среднеазиатской кобры *N. n. oxiana*.

Раствор высушенного цельного яда кобры разделяли хроматографией на DEAE-сефарозе CI-6B. На рис. 1 видно, что антикомплементарной активностью обладали две фракции, элюируемые градиентом NaCl, и фракция не связавшихся на колонке белков («проскок»). Две первые фракции были обозначены как CFA-I и CFA-II (кислые факторы кобры). Фракция «проскока» с DEAE-сефарозы подвергалась хроматографическому разделению на катионите CM-сефарозе CI-6B (рис. 2). Антикомплементарная активность была обнаружена в трех белковых пиках, обозначенных как CFB-I, CFB-II и CFB-III (основные факторы яда кобры).

Активные фракции подвергали гель-фильтрации на сефакриле S-200 (рис. 3). Все фракции, кроме CFA-II, обнаружили при разделении по одному максимуму антикомплементарной активности, а фракция CFA-II дала два пика — оба активных. Были оценены молекулярные массы антикомплементарных белков (рис. 4). CFB-II, CFB-III, CFA-IIIa и CFA-IIIb оказались низкомолекулярными, поэтому к определению их молекулярных весов по данным гель-хроматографии на сефакриле S-200 следует относиться как к ориентировочному. Количества каждого из факторов определяли по поглощению при 280 нм, полагая, что величина A_{280} для концентрации 1 мг/мл соответствует ~ 1 ед. оптической плотности.

Для всех факторов была определена антикомплементарная активность по снижению активности комплемента по классическому пути активации после инкубации сыворотки с тестируемым фактором. Было определено также действие этих факторов на активацию альтернативного пути по-

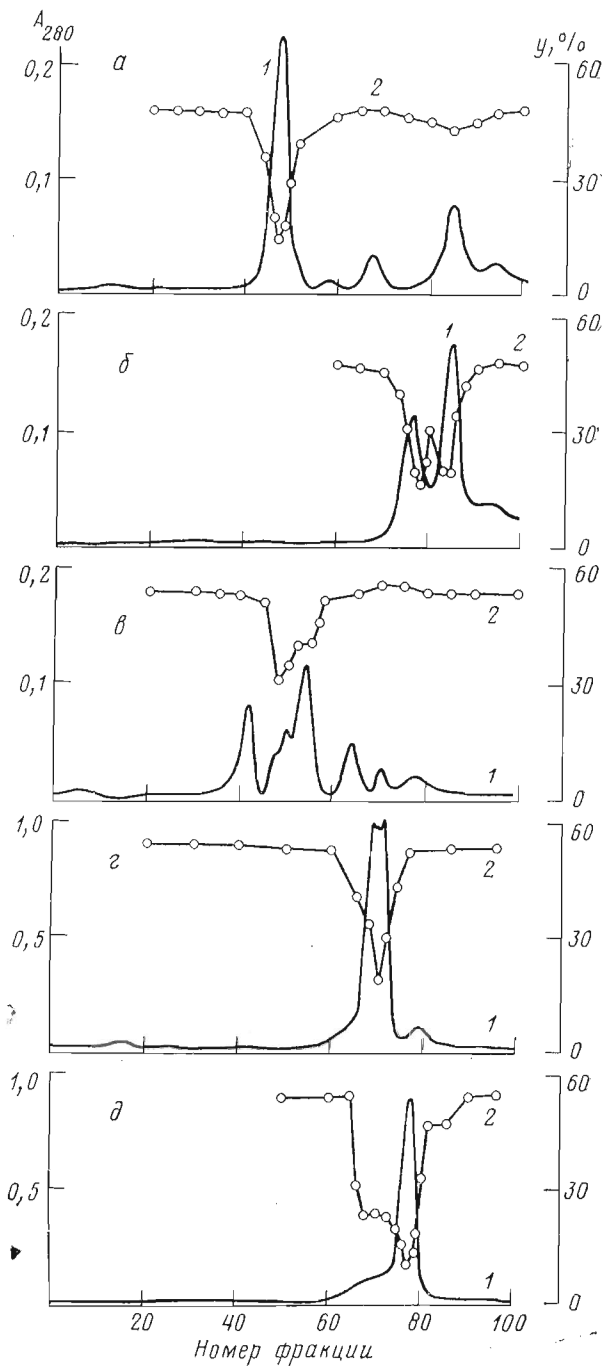


Рис. 3. Гель-фильтрация на сефакриле S-200 активных фракций после хроматографических разделений яда кобры: а — CFA-I, б — CFA-II, в — CFB-I, г — CFB-II, д — CFB-III. Обозначения те же, что и на рис. 1

уменьшению или увеличению определяемой активности фактора В в сыворотке крови. Результаты приведены в табл. 1.

Как следует из табл. 1, в яде среднеазиатской кобры не были обнаружены описанные для других кобр антикомлементарные факторы. По хроматографическому поведению близки ингибитор Cl [9] и фактор CFB-I, однако они различаются по молекулярным массам. H-CoF и CVF в *N. n. oxiana* обнаружены не были. Наибольшую антикомлементарную активность проявляют белки с наибольшими молекулярными массами — CFA-I и CFB-I. Однако наше внимание привлек низкомолекулярный фак-

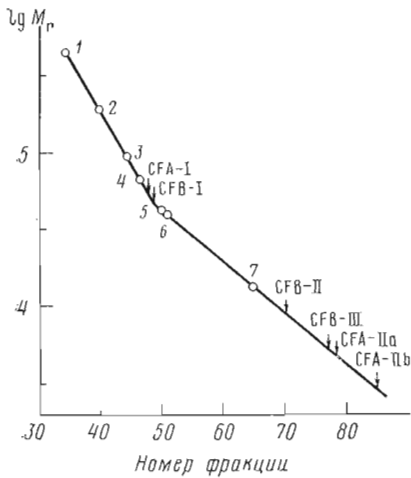


Рис. 4

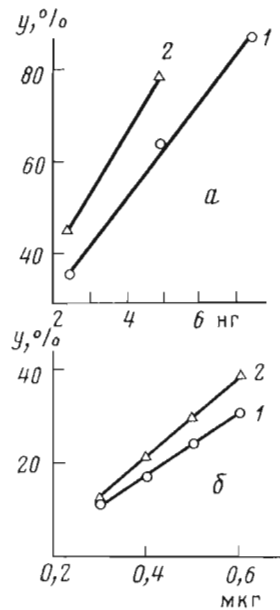


Рис. 6

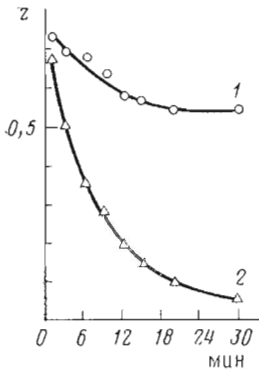


Рис. 5

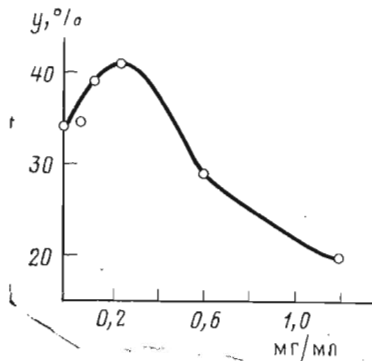


Рис. 7

Рис. 4. Определение молекулярных масс фракций по данным гель-фильтрации на сефакиле S-200: 1 — ферритин (M_r 450 000), 2 — компонент С3 (190 000), 3 — фактор В (93 000), 4 — бычий сывороточный альбумин (68 000), 5 — яичный альбумин (43 000), 6 — пепсиноген (42 000), 7 — рибонуклеаза (13 700)

Рис. 5. Инактивация компонента С4 (5 мкг/мл): 1 — спонтанная, 2 — в присутствии 165 мкг/мл фактора СFB-III; z — активность С4 (доля эффективных молекул С4 на эритроцит)

Рис. 6. Влияние СFB-III на титрование фактора D (а) и фактора В (б): 1 — определение без СFB-III, 2 — то же в присутствии 26,4 (а) и 120 мкг/мл (б) СFB-III. По оси ординат — количество соответствующего фактора в пробе, y — степень лизиса эритроцитов

Рис. 7. Зависимость степени лизиса (y) при титровании фактора В от концентрации СFB-III

тор — СFB-III, главным образом благодаря его стимулирующему действию на альтернативный путь активации. (Стимулирующий эффект был ранее обнаружен лишь для CVF при предварительной обработке им эритроцитов кролика, подвергавшихся в дальнейшем обычному гемолизу по альтернативному пути [1]). Кроме того, фактор СFB-III был обнаружен в яде кобры в больших количествах, что создавало возможность его более подробного изучения.

Было исследовано действие СFB-III на классический путь активации. Оказалось, что инкубация в течение 30 мин разбавленной (1:30) сыворотки крови человека с СFB-III (165 мкг/мл) приводит к падению общей комплементарной активности, определяемой по гемолизу сенсibilизиро-

Характеристика и свойства антикомплемментарных факторов
яда среднеазиатской кобры

Фактор	Содержание в 1 г яда, мг	M _r	Ингибирование классического пути (20 мкг в пробе), %	Действие на аль- тернативный путь (15-30 мкг в про- бе), % *
CFA-I	3,5	61 000	88	18(-)
CFA-IIa	2,0	5000	15	21(-)
CFA-IIb		3000		
CFB-I	0,5	54 000	84	21(-)
CFB-II	115	9000	3	0
CFB-III	85	7000	11	31(+)

* (-) — подавление, (+) — усиление.

Таблица 2

Действие фактора CFB-III на классический путь активации
комплемента *

Определяемая актив- ность	Наличие CFB-III	EA		EAC14	
		0	30	0	30
Комплемент	+	16,5	3,0	42,0	32,0
	+	16,3	3,0	40,0	30,0
	-	25,0	13,5	53,0	38,0
Компонент C2	-	24,0	13,0	55,0	38,0
	+	32,0	29,0	56,0	51,0
	+	32,0	29,0	56,0	51,0
	-	36,0	31,0	65,0	55,0
	-	40,0	31,0	65,0	54,0

* Приведена степень гемолиза (γ , %) сенсibilизированных эритроцитов (EA) и комплекса EAC14 при определении активности до и после (30 мин) инкубации CFB-III с сывороткой.

ванных эритроцитов (EA), значительно меньшему падению активности комплемента, определяемому по гемолизу комплекса EA с компонентами C1 и C4 (EAC14), и сохранению активности компонента C2 (табл. 2). Данные этих опытов свидетельствуют в пользу того, что CFB-III действует на компонент C4 в растворе, не действует на компонент C2 и на фрагмент C4b, связанный с мембраной.

Для проверки предположения, не является ли потребление компонента C4 в присутствии CFB-III результатом активации классического или альтернативного [11] путей, мы провели эксперименты по инактивации с помощью CFB-III компонента C4 в отсутствие C1 (в реагенте R1), а также факторов D (в реагенте RD) и B (в реагенте RB). Оказалось (табл. 3), что действие CFB-III на C4 не связано с активацией комплемента.

Был также выделен из сыворотки крови человека функционально чистый компонент C4 и исследовано действие на него CFB-III. На рис. 5 показана кинетика падения активности компонента C4 в отсутствие и в присутствии фактора CFB-III. Как следует из этих данных, действие CFB-III на классический путь активации комплемента связано с инактивацией компонента C4, причем процесс развивается во времени.

Необычным оказалось действие CFB-III на альтернативный путь активации комплемента. Определение активности факторов D и B в присутствии CFB-III показало более высокую степень гемолиза (рис. 6a, б). Увеличение степени гемолиза при титровании фактора B зависит от концентрации CFB-III (рис. 7). При высоких концентрациях стимулирование сменяется подавлением гемолиза. Если проследить за кинетикой лизиса эритроцитов кролика, происходящего при определении активности фактора B (рис. 8), то можно отметить, что в присутствии CFB-III (0,2 мг/мл) лизис после 30 мин инкубации продолжает нарастать, в то время как в

Таблица 3

Потребление компонента С4 в реагентах R1, RD и RB под действием СFB-III (до и после 30 мин инкубации)

Образец	Наличие СFB-III (0,2 мг/мл)	Активность С4 (степень гемолиза — у, %)	
		0	30
R1	+	44	25
	+	45	25
	—	56	58
RD	—	58	58
	+	80	38
	+	82	37
RB	—	82	95
	—	78	95
	+	74	23
	+	74	22
	—	74	76
	—	73	75

Таблица 4

Влияние СFB-III на потребление фактора В при образовании растворимой С3-конвертазы

Состав системы	Активность фактора В, %				
	время инкубации, мин				
	0	5	10	15	20
В, С3, D, СFB-III	100	88	74	23	2,5
В, С3, D	100	91	87	54	6,3
В, С3, СFB-III	100	90	87	78	63
В, С3	100	99	90	88	85

отсутствие СFB-III нарастание лизиса прекращается. Это может свидетельствовать об увеличении времени работы С3/С5-конвертазы альтернативного пути активации благодаря либо большему ее количеству, либо большей стабильности. При этом, как было показано, прямое литическое действие СFB-III на эритроциты кролика отсутствует.

В пользу стабилизации и (или) увеличения количества альтернативной конвертазы говорит также следующий эксперимент. Было изучено потребление компонента С3 при образовании растворимой С3-конвертазы [12, 13]. Добавление СFB-III в систему, содержащую С3, фактор В и фактор D, увеличивало потребление С3 (рис. 9).

Если в присутствии СFB-III количество альтернативной конвертазы увеличивается, то СFB-III должен увеличивать и потребление фактора В в условиях образования растворимой С3-конвертазы. Действительно, если С3 предварительно инкубировать с СFB-III, то скорость потребления фактора В в системе, содержащей факторы В и D и компонент С3, возрастает (табл. 4). Поскольку образование растворимой С3-конвертазы альтернативного пути инициируется молекулами С3b или С3b-подобными (гемолитически неактивными молекулами С3, обработанными различными денатурантами [13]), можно сделать вывод, что СFB-III переводит С3 в форму С3b-подобного.

Таким образом, выделенный из яда средиземноморской кобры *Naja n. oxiana* основной низкомолекулярный белок обладает антикомплементарным действием в отношении классического пути активации благодаря инактивации компонента С4 и усиливающим действием на альтернативный путь активации благодаря инициации образования растворимой С3-конвертазы вследствие денатурирующего действия на компонент С3.

В литературе известны низкомолекулярные основные белки яда кобры. Это цитотоксический фактор из яда *Naja naja* [14] с рI выше 9,4 и

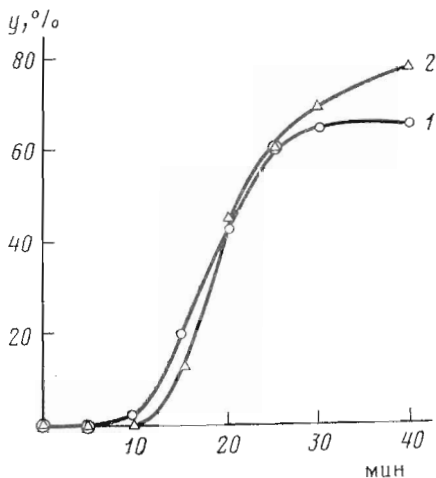


Рис. 8

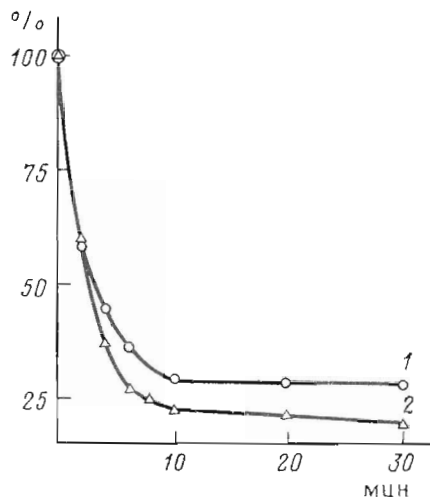


Рис. 9

Рис. 8. Зависимость степени лизиса (y) при определении фактора В от времени инкубации в отсутствие (1) и в присутствии (2) 0,2 мг/мл СФВ-III

Рис. 9. Потребление компонента С3 при действии растворимой альтернативной конвертазы в отсутствие (1) и в присутствии (2) 0,4 мг/мл СФВ-III. Концентрация (мгк/мл): С3 — 30, фактора В — 50, фактора D — 1,25

M_r 10 500. Его LD_{50} 44,5 мг/кг. Кроме того, из яда кобры *Naja n. oxiana* выделены два цитотоксина с rI выше 12, $M_r \sim 7000$ и LD_{50} 1,1 мг/кг (цитотоксин I) и 1,75 мг/кг (цитотоксин II) [15].

Фактор СФВ-III также обладает основными свойствами. Судя по хроматографии на СМ-сефарозе CL-6В, это самый основной белок яда кобры (рис. 2). Его $M_r \sim 7000$. Ориентировочное определение токсичности на мышцах дало значение $LD_{50} \sim 6$ мг/кг веса или ниже. Следовательно, СФВ-III по свойствам похож на цитотоксины I и II.

Была определена N-концевая последовательность СФВ-III: Leu-Lys-X-Lys-Lys-Leu-Val-X-Leu-Phe-X-Lys, которая полностью совпадает с последовательностью ранее описанного цитотоксина II [15]. Таким образом, можно считать, что СФВ-III является цитотоксином II (M_r 6710). Это весьма основной белок, содержащий 10 остатков лизина и остаток аргинина. Сильноосновные свойства, а также способность цитотоксина II сорбироваться на гидрофобных участках других белков, обусловленная наличием гидрофобной «петли» — Leu-Val-Pro-Leu-Phe, объясняют специфическое его действие на компоненты комплемента С3 и С4. Оба эти компонента являются мембранными белками, при активации которых обнажается подверженная гидролизу и действию нуклеофильных реагентов тиолсложноэфирная связь, которая участвует в ацилировании подходящих групп поверхности мембраны. Эта связь может разрушаться при обработке нативных молекул С3 и С4 аминами и хаотропными агентами [13], причем С4 лабильнее, чем С3. Следует также отметить, что для действия на С3 и С4 необходимо сохранение нативной структуры СФВ-III (цитотоксина II). Так, хранение водных растворов этого белка при комнатной температуре в течение нескольких дней приводит к полной потере антикомплементарной активности. Это еще раз свидетельствует о том, что антикомплементарные свойства данного белка являются, по-видимому, специфическими и функциональными.

Экспериментальная часть

В работе использовали 5,5-диэтилбарбитуровую кислоту, ее натриевую соль, белки-стандарты для определения молекулярного веса (Serva, ФРГ), этиленгликоль-бис(β-аминоэтиловый эфир)-N,N'-тетрауксусную кислоту (EGТА) фирмы Sigma (США), DEAE-сефарозу CL-6В, СМ-сефарозу CL-6В, DEAE-сефацелл, сефакрил S-200 (Pharmacia, Швеция), альбу-

мин бычий сывороточный лиофилизированный марки В, ϵ -аминокапроновую кислоту Олайнского завода химреактивов, остальные реактивы (квалификации не ниже ч.д.а.) отечественного производства.

Получение высокоочищенных факторов В и D описано в работе [16], пепсиногена — в [17], приготовление реагентов R1, R2, R3, R4 — в работе [18], RD — в [16], RB — в [19], определение активности компонентов C2, C3 и C4 — в работе [18], факторов В и D — в [16, 19].

Фракционирование яда кобры. К 1 г сухого яда среднеазиатской кобры *N. n. oxiana* добавляли 100 мл 0,01 М трис-НСl-буфера, рН 7,8, содержащего 0,01% NaN_3 , и оставляли на 15 ч при 4° С для растворения. Нерастворившиеся частицы удаляли фильтрованием через бумажный фильтр. Раствор диализовали против того же буфера 2×1 л в течение 25 ч и наносили на колонку (25,5×3,5 см) с DEAE-сефарозой CL-6B, уравновешенной тем же буфером, со скоростью 50 мл/ч. После промывания колонки стартовым буфером проводили элюирование NaCl (линейный градиент концентрации: 500 мл стартового буфера и 500 мл буфера, содержащего 1 М NaCl) со скоростью 50 мл/ч. Фракции собирали через 10 мин (рис. 1). Фракции 15–40 («проскок») диализовали против 0,05 М фосфатного буфера, рН 6,5, содержащего 0,01% NaN_3 , в течение 19 ч (2×2,5 л) и наносили на колонку (27×3,5 см) с CM-сефарозой CL-6B, уравновешенной тем же буфером, со скоростью 50 мл/ч. Колонку промывали стартовым буфером и элюировали NaCl (линейный градиент концентрации: 500 мл того же буфера и 500 мл буфера, содержащего 1 М NaCl) со скоростью 50 мл/ч (рис. 2). Фракции собирали через 10 мин. Фракции, содержащие антикомплементарную активность (CFA-I, CFA-II — после фракционирования на DEAE-сефарозе CL-6B и CFB-I, CFB-II и CFB-III — после CM-сефарозы CL-6B), подвергали гель-фильтрации на колонке (90×2,5 см) с сефакрилом S-200 в вероналовом изотоническом буфере с рН 7,4 (VBS — см. [18]) со скоростью 50 мл/ч, собирая фракции по 5 мл. Перед гель-фильтрацией фракции CFA-I и CFA-II лиофильно высушивали и растворяли в 3 мл VBS. CFB-I и CFB-III предварительно концентрировали ультрафильтрацией, CFB-II не концентрировали.

Антикомплементарную активность во фракциях яда кобры определяли по снижению гемолитической активности (по классическому пути активации) разбавленной сыворотки крови человека после ее инкубации с образцами фракций. 200 мкл сыворотки крови человека, разбавленной 1:50 VBS, содержащим ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} (VBS²⁺ — см. [18]), инкубировали 20 мин при 37° С с аликвотами по 20–40 мкл хроматографических фракций, доведенных до 300 мкл буфером VBS²⁺. В инкубационную смесь вносили 200 мкл суспензии сенсibiliзированных эритроцитов барана (ЕА — [18]) и продолжали инкубацию еще 30 мин. Контрольная проба не содержала тестируемой фракции. После инкубации в каждую пробу добавляли по 2,5 мл 0,15 М NaCl, пробы центрифугировали и определяли степень гемолиза по величине A_{412} . Пониженный гемолиз в опытной пробе по сравнению с контрольной свидетельствовал о наличии антикомплементарной активности.

Определение влияния фракций яда кобры на альтернативный путь активации по определению фактора В. 100 мкл сыворотки крови человека, разбавленной 1:50 буфером VBS-Mg-EGTA [19], инкубировали 20 мин при 37° С с фракциями яда кобры в общем объеме 220 мкл, добавляли 80 мкл реагента RB [19] и 200 мкл суспензии эритроцитов кролика [19] и продолжали инкубацию еще 30 мин. Контрольная проба не содержала тестируемой фракции. После инкубации в каждую пробу добавляли 2,5 мл 0,15 М NaCl, центрифугировали и определяли степень гемолиза по поглощению при 412 нм. Действие на альтернативный путь выявляли путем сравнения степени гемолиза в тестируемых пробах и в контроле.

Получение препарата компонента C3. К 46 мл сыворотки крови человека добавляли 0,939 мл 0,5 М EDTA (до конечной концентрации 10 мМ) и доводили рН до 5,6, добавляя 0,15 М HCl под поверхность раствора и

перемешивая. Раствор диализовали 24 ч против 2 л 10 мМ EDTA, pH 5,6. Выпавший осадок отделяли центрифугированием и дважды промывали 0,15 М NaCl. Надосадочную жидкость использовали в дальнейшем для получения компонента С4. Осадок эглобулинов растворяли в 30 мл 0,02 М фосфатного буфера, pH 7,4, содержащего 0,3 М NaCl и 10 мМ ϵ -аминокапроновую кислоту. Раствор диализовали 18 ч против 3 л 0,02 М фосфатного буфера, pH 7,6, содержащего 10 мМ ϵ -аминокапроновую кислоту. Образовавшийся осадок удаляли центрифугированием и отбрасывали, а надосадочную жидкость наносили на колонку (19×2,5 см) с DEAE-сефацеллем, уравновешенным 0,02 М фосфатным буфером, pH 7,6, содержащим 10 мМ ϵ -аминокапроновую кислоту, со скоростью 40 мл/ч. Колонку промывали стартовым буфером, а белок элюировали NaCl (линейный градиент концентрации: 200 мл 0,02 М фосфатного буфера, pH 7,6, и 200 мл того же буфера, содержащего 0,3 М NaCl) со скоростью 40 мл/ч, собирая фракции по 8 мл. Активность компонента С3 во фракциях определяли методом [18]. Фракции, проявляющие активность, объединяли, концентрировали ультрафильтрацией и хранили при -70°C .

Получение препарата функционально чистого компонента С4. 20 мл сыворотки человека (или псевдоглобулиновой фракции) наносили на колонку (25×2 см) с DEAE-сефацеллем, уравновешенным 0,01 М фосфатным буфером, pH 7,4, содержащим 10 мМ ϵ -аминокапроновую кислоту, со скоростью 48 мл/ч. После промывания колонки стартовым буфером белок элюировали NaCl (линейный градиент концентрации: 500 мл 0,01 М фосфатного буфера, pH 7,6, содержащего 10 мМ ϵ -аминокапроновую кислоту, и 500 мл того же буфера, но с 1,0 М NaCl). Активность компонента С4 во фракциях определяли методом [18]. Фракции, проявляющие активность, диализовали против стартового буфера и подвергали рехроматографии в аналогичных условиях, используя градиент концентрации NaCl (0—0,5 М, общий объем 770 мл). Фракции, содержащие компонент С4, объединяли, концентрировали ультрафильтрацией и хранили при -70°C . Полученный препарат С4 не содержал активности компонента С3.

Влияние фактора CFB-III на компонент С2 и общую комплементарную активность. 6 мкл сыворотки человека инкубировали с 75 мкл раствора CFB-III (концентрация 0,66 мг/мл) в VBS²⁺ (объем пробы 300 мкл). В контрольном опыте CFB-III не добавляли. В пробах определяли до начала инкубации и через 30 мин общую активность комплемента, а также активность компонента С2. Для определения гемолитической активности добавляли 200 мкл суспензии EA или EAC14 [18].

Влияние фактора CFB-III на компонент С4 в реакнтах R1, RВ и RD. 6 мкл реагентов RВ, RD или R1 инкубировали при 37°C с 94 мкл раствора CFB-III (0,66 мг/мл) в VBS²⁺ (объем пробы 300 мкл). Определяли активность С4 [18] до начала инкубации и через 30 мин.

Действие фактора CFB-III на компонент С4. 10 мкл раствора С4 (0,1 мг/мл) и 50 мкл раствора CFB-III (0,66 мг/мл) инкубировали при 37°C в VBS²⁺ (общий объем 200 мкл). В контроле CFB-III отсутствовал. Отбирали пробы по 20 мкл во времени для определения активности С4.

Влияние CFB-III на гидролиз компонента С3 альтернативной С3-конвертазой. 10 мкл раствора фактора В (1 мг/мл), 5 мкл раствора фактора D (50 мкг/мл), 60 мкл раствора С3 (0,1 мг/мл), 5 мкл 0,1 М MgCl₂ и 120 мкл раствора CFB-III (0,66 мг/мл) в VBS (общий объем 200 мкл) инкубировали при 37°C . В контроле CFB-III отсутствовал. Определяли активность С3 [18] в пробах в различные времена инкубации.

Влияние фактора CFB-III на кинетику гемолиза. 0,75 мкг фактора В, 80 мкл реагента RВ, 100 мкг CFB-III в 0,3 мл буфера VBS — Mg — EGTA инкубировали с 0,2 мл суспензии эритроцитов кролика [19] при 37°C . Реакцию через определенные интервалы времени останавливали, добавляя 2,5 мл 0,15 М NaCl. Степень лизиса определяли после центрифугирования по поглощению при 412 нм. В контроле инкубацию проводили без CFB-III.

Влияние фактора CFB-III на потребление фактора В при образовании

растворимой С3-конвертазы. 1,25 мкг/мл фактора D, 0,01 M MgCl₂, 37,5 мкг/мл С3 и 1,2 мг/мл СFB-III в VBS инкубировали 30 мин при 37° С, добавляли 100 мкг/мл фактора В и продолжали инкубацию, отбирая во времени пробы по 18 мкл для определения активности фактора В. Контрольные пробы не содержали: 1) СFB-III, 2) СFB-III и D и 3) D.

Авторы выражают благодарность И. В. Назимову за определение N-концевой последовательности и В. П. Мальковой за определение токсичности СFB-III.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ballow M., Cochrane C. G. J. Immunol., 1969, v. 103, № 5, p. 944-952.
2. Pepys M. B., Tomkins C., Smith A. D. J. Immunol. Meth., 1979, v. 30, № 2, p. 105-107.
3. Zabern von I., Hinsch B., Przyklenk H., Schmidt G., Vogt W. Immunobiology, 1980, v. 157, № 4/5, p. 499-514.
4. Zabern von I., Przyklenk H., Vogt W. Scand. J. Immunol., 1982, v. 15, № 4, p. 357-362.
5. Eggertsen G., Lind P., Sjoquist J. Mol. Immunol., 1981, v. 18, № 2, p. 125-133.
6. Takahashi H., Hayashi K. Biochim. et biophys. acta, 1982, v. 701, № 1, p. 102-110.
7. Vogt W. Toxicon, 1982, v. 20, № 1, p. 299-303.
8. Alper C. A., Balavith D. Science, 1976, v. 191, № 4233, p. 1275-1276.
9. Zabern von I., Przyklenk H., Damerau B., Zimmerman B. Scand. J. Immunol., 1981, v. 14, № 2, p. 109-120.
10. Vogt W., Hinsch B., Schmidt G., Zabern von I. FEBS Lett., 1982, v. 144, № 2, p. 195-198.
11. Козлов Л. В., Чих В. П., Соляков Л. С. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 6, с. 817-821.
12. Fearon D. T., Austen K. F. J. Immunol., 1975, v. 115, № 5, p. 1357-1361.
13. Zabern von I., Nolte R., Vogt W. Scand. J. Immunol., 1981, v. 13, № 5, p. 413-431.
14. Braganca B. M., Patel N. T., Badrinath P. G. Biochim et biophys. acta, 1967, v. 136, № 3, p. 508-520.
15. Гришин Е. В., Сузих А. П., Адамович Т. Б., Овчинников Ю. А. Биоорган. химия, 1976, т. 2, № 8, с. 1018-1034.
16. Соляков Л. С., Козлов Л. В. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 4, с. 462-469.
17. Козлов Л. В., Крылова Ю. И., Антонов В. К. Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 7, с. 1083-1090.
18. Козлов Л. В., Крылова Ю. И., Чих В. П., Молчанова Н. Н. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 5, с. 652-659.
19. Козлов Л. В., Соляков Л. С. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 3, с. 342-348.

Поступила в редакцию
19.IX.1983

A NEW LOW MOLECULAR PROTEIN EFFECTOR OF HUMAN COMPLEMENT FROM THE VENOM OF THE CENTRAL ASIAN COBRA *NAJA NAJA OXIANA*

KOZLOV L. V., SOLYAKOV L. S., ZINCHENKO A. A.

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

Six protein effectors of human complement were isolated from the whole venom of the Central Asian cobra *Naja naja oxiana*. Three of them have acidic properties and molecular weights of 61 000, 5000 and 3000, and the rest are basic proteins with molecular weights of 54 000, 9000 and 7000. Two low molecular weight basic proteins CFB-II and CFB-III are isolated in as high amounts as 115 and 85 mg per g of dry venom. All the effectors inhibit the classical pathway of complement activation and, with the exception of CFB-II and CFB-III, the alternative pathway. The latter, on the contrary, enhances the alternative pathway of activation. N-Terminal sequence determination for CFB-III demonstrated its identity to the earlier characterized cytotoxin II. The action of CFB-III on the classical pathway of complement activation consists in the component C4 inactivation. A mechanism for the CFB-III activation of the alternative pathway is proposed implying the CFB-III induced transformation of the C3 component into a C3b-like one producing a soluble C3 convertase.