



УДК 547.962.02+591.145.3

СТРУКТУРА И ПРЕСИНАПТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ
ТЕРТИАПИНА — НЕЙРОТОКСИНА ИЗ ЯДА МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ
APIS MELLIFERA

Овчинников Ю. А., Мирошников А. И., Куделин А. Б.,
Костина М. Б., Бойков В. А.

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

Магазаник Л. Г., Готгильф И. М.

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. Н. М. Сеченова
Академии наук СССР, Ленинград

Из яда медоносной пчелы *Apis mellifera* выделен минорный низкомолекулярный компонент — тертиапин. Определена первичная структура тертиапина. Исследовано его влияние на синаптические процессы, происходящие в изолированных нервно-мышечных препаратах лягушки. Показано, что тертиапин обладает пресинаптическим действием, которое состоит в преимущественном снижении спонтанного освобождения медиатора, не требует присутствия Ca^{2+} в среде и не устраняется при отмывании токсина. По общему характеру пресинаптического эффекта тертиапин существенно отличается от других пресинаптических токсинов; высказывается предварительное суждение о его механизме действия.

Как и большинство ядов животного происхождения, яд медоносной пчелы *Apis mellifera* представляет собой сложную многокомпонентную смесь белков и низкомолекулярных биорегуляторов [1]. Особый интерес вызывают пептиды небольшого молекулярного веса ($M \leq 2500$), обладающие высокой физиологической активностью. К ним относятся мелиттин, mast-cell-degranulation (MCD) — пептид, дегранулирующий тучные клетки, и апамин, причем два последних специфически действуют на центральную нервную систему [2].

Трудности выделения полипептидов из яда пчелы связаны с большим содержанием в нем мелиттина (более 50%), образующего сложные комплексы с другими компонентами, и чрезвычайно малым содержанием других токсинов. Использование многоступенчатой ионообменной хроматографии позволяет, однако, из большого количества исходного материала выделить минорные полипептидные токсины. Так, например, при фракционировании 1 кг яда пчелы английскими исследователями [3] удалось выделить кроме названных соединений также небольшое количество секапина и тертиапина. Недавно для секапина была предложена первичная структура [4], уточненная нами [5]; строение же и свойства тертиапина до сих пор оставались неизвестными.

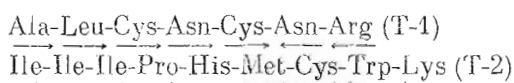
Настоящая работа посвящена выделению, установлению строения и изучению биологических свойств тертиапина — нового компонента пчелиного яда.

В основу выделения тертиапина из низкомолекулярной фракции пчелиного яда был положен метод, предложенный Гульди и сотр. [3]. Низкомолекулярная часть яда была лиофилизирована и разделена на фракции гелефильтрацией на биогеле Р-4 (рис. 1) в уксусной кислоте. Тонкослойная хроматография на силикагеле и определение N-концевой аминокислоты показали, что I фракция содержит в основном мелиттин, II и III содержат смесь нескольких компонентов пептидной природы, в остальных пептиды не были обнаружены. После лиофилизации объединенных фракций II и III полипептидная смесь была подвергнута хроматографии на СМ-целлюлозе СМ-52 в аммоний-ацетатном буфере с использованием линейного градиента ацетата аммония (рис. 2). Анализ каждой фракции тонкослойной хроматографией и определение N-концевой аминокислоты показали, что тертиапин (сравнение хроматографической подвижности с литературными данными [3]) задерживается на ионообменнике и вымывается при высоких концентрациях ацетата аммония в смеси со значительным количеством мелиттина. Окончательную очистку тертиапина проводили гелефильтрацией на биогеле Р-4 в присутствии 6 М мочевины (рис. 3). Выделенный тертиапин индивидуален по данным тонкослойной хроматографии на силикагеле, N-концевому аминокислотному анализу и электрофорезу в полиакриламидном геле.

Сравнение электрофоретической подвижности в полиакриламидном геле (в присутствии додецилсульфата натрия) тертиапина, апамина и МСD-пептида показало, что все эти олигопептиды имеют приблизительно одинаковый молекулярный вес (~2000). Титрование тертиапина реагентом Эллмана не выявило наличия свободных сульфгидрильных групп. После восстановления дисульфидных связей и карбоксиметилирования был определен аминокислотный состав (табл. 1).

Автоматическая деградация по Эдману карбоксиметилированного образца тертиапина позволила определить последовательность 16 аминокислотных остатков:

Ala-Leu-Cys-Asn-Cys-Asn-X-Ile-Ile-X-Pro-X-Met-Cys-Trp-Lys-
Идентифицировать аминокислоты в положениях 7, 10 и 12 стандартными методами не удалось. После триптического гидролиза карбоксиметилированного образца тертиапина препаративной тонкослойной хроматографией на силикагеле были выделены два пептида (Т-1 и Т-2), аминокислотная последовательность которых была установлена деградацией по Эдману (→) в сочетании с C-концевым анализом карбоксипептидазами А и В (←).



Таким образом удалось идентифицировать остатки Arg-7, Ile-10, His-12. Фрагмент, отвечающий C-концевой последовательности тертиапина, после триптического гидролиза выделить не удалось.

Для получения недостающих данных о структуре тертиапина было проведено расщепление карбоксиметилированного образца по единственному остатку метионина-13. Гель-фильтрацией на сефадексе G-25f были выделены два пептида (табл. 1). Пептид, отвечающий C-концевой последовательности тертиапина (CN-2), подвергался ручной деградации по Эдману. Хотя по данным аминокислотного анализа этот пептид содержит 8 аминокислотных остатков, в связи с ограниченной растворимостью C-концевого остаточного фрагмента удалось идентифицировать только последовательность Met-Cys-Trp-Lys-Lys-.

Поэтому для определения структуры C-концевого участка молекулы тертиапина было проведено расщепление карбоксиметилированного образца по остатку триптофана-15 бромистым водородом в диметилсульфоксиде. Этот метод был успешно использован ранее при установлении первичной структуры фосфолипазы A₂ [6]. Тонкослойной хроматографией на силика-

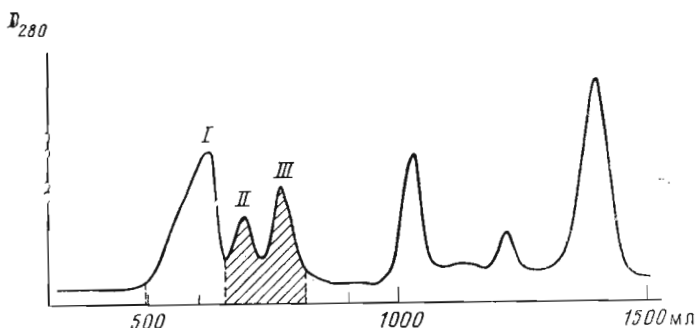


Рис. 1. Гель-фильтрация низкомолекулярных компонентов пчелиного яда на колонке (5×90 см) с биогелем Р-4 в 1,5% уксусной кислоте. Скорость элюции 40 мл/ч. Здесь и на рис. 2 и 3 отмечены фракции, содержащие тертиапин

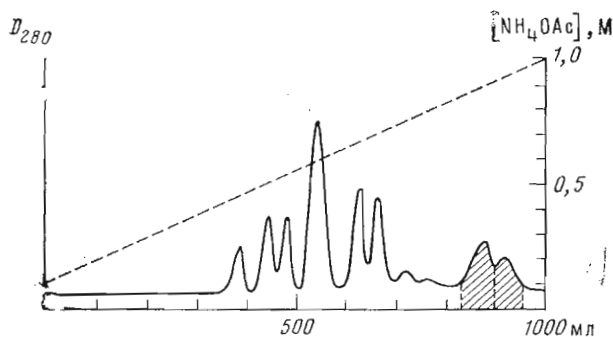
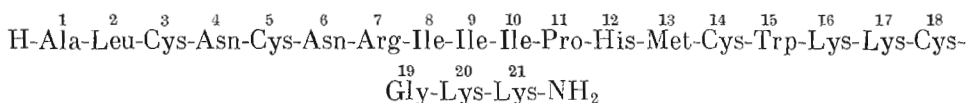


Рис. 2. Хроматография пептидов фракций II и III (рис. 1) на колонке (2,5×25 см) с СМ-целлюлозой в градиенте аммоний-ацетатного буфера (рН 4,7)

геле был выделен С-концевой фрагмент и определена его первичная структура: Lys-Lys-Cys-Gly-Lys-Lys.

Следует отметить, что при использовании карбоксипептидаз А, В и У С-концевая аминокислота не была определена ни для карбоксиметилированного тертиапина, ни для С-концевых фрагментов, полученных после химических методов расщепления полипептидной цепи. Это, по-видимому, связано с тем, что С-концевая аминокислота присутствует в виде амида, что характерно для других полипептидов из яда пчелы (мелиттин, апамин, МСД-пептиг [1]). Таким образом, для тертиапина можно предложить следующую структуру:



Что касается расположения дисульфидных связей, то можно предположить, что они образованы остатками цистеина-3, -14 и цистеина-5, -18 по аналогии с известными структурами апамина и MCD-пептида [1]. В принципе остается еще одна возможность образования дисульфидных связей между остатками цистеина-3, -18 и цистеина-5, -14. Третий вариант (цистеин-3, -5 и цистеин-14, -18) исключается, так как расщепление нативной молекулы тертиапина бромцианом в этом случае должно было привести к образованию двух пептидов. Однако, по данным тонкослойной хроматографии на силикагеле и N-концевому анализу, в этих условиях образуется только один пептид, который имеет две N-концевые аминокислоты — аланин и цистеин.

Ранее было показано, что компоненты пчелиного яда оказывают влияние на процессы передачи нервного импульса: фосфолипаза A_2 блокирует

Таблица 1

Данные аминокислотного анализа тертиапина и пептидов, выделенных при триптическом гидролизе и бромциановом расщеплении карбоксиметилированного тертиапина

Аминокислоты	Тертиапин	T-1	T-2	CN-1	CN-2
Asp	1,96 (2)	1,90 (2)	—	2,10 (2)	—
Pro	1,21 (1)	—	1,01 (1)	1,20 (1)	—
Gly	1,05 (1)	—	—	—	1,06 (1)
Ala	0,99 (1)	1,05 (1)	—	1,03 (1)	—
Cys (Cm)	3,78 (4)	2,21 (2)	0,75 (1)	1,83 (2)	—
Met	0,55 (1)	—	0,63 (1)	6	—
Ile	3,08 (3)	—	2,81 (3)	2,73 (3)	—
Leu	0,86 (1)	0,94 (1)	—	0,96 (1)	—
His	0,96 (1)	—	1,03 (1)	0,93 (1)	—
Lys	3,87 (4)	—	1,11 (1)	—	3,78 (4)
Arg	1,10 (1)	1,21 (1)	—	1,01 (1)	—
Trp *	0,83 (1)	—	0,78 (1)	—	0,81 (1)
Общее кол-во	21	7	9	12	8

* Триптофан определен после кислотного гидролиза в присутствии тиогликолевой кислоты.

Таблица 2

Показатели функции нервно-мышечного импульса (% к контролю) после 30-минутного контакта с тертиапином в присутствии (А) и в отсутствие (Б) ионов кальция *

Показатели	А		Б	
	[Тертиапин], мкг/мл			
	5—10	20—50	5—10	25—50
Амплитуда МПКП	97,8±5,3(9)	88,5±3,6(8)	75,5±11,3(6) **	59,7±9,3(3)
Частота МПКП	76,4±9,1(9)	54,0±10,3(8)	57,0±9,6(6)	14,0±3,9(5)
Квантовый состав ПКП	84,3±5,8(9)	82,7±5,7(7)		

* Даны средние значения для нескольких опытов (число опытов приведено в скобках) ± стандартная ошибка; состав среды А: 0,5—0,6 мМ Са²⁺, 3—6 мМ Mg²⁺; Б: 3 мМ Mg²⁺, 1 мМ EGTA.

** Статистически недостоверно ($P > 0,5$).

освобождение ацетилхолина из двигательных нервных окончаний [7]; апамин нарушает передачу нервного импульса через пуринергические синапсы [8, 9]. В связи с этим было исследовано влияние тертиапина на синаптические процессы, происходящие в изолированных нервно-мышечных препаратах лягушки. Изменения основных показателей функции нервно-мышечного синапса, вызванные 30-минутным воздействием тертиапина, приведены в табл. 2.

Постсинаптическое действие тертиапина на нервно-мышечном препарате практически отсутствовало. Не наблюдалось заметных изменений мембранного потенциала мышечных волокон. Амплитуда спонтанных мионаторных потенциалов концевой пластинки (МПКП), которая служит критерием чувствительности постсинаптической мембраны к действию медиатора, практически не изменялась под влиянием тертиапина в концентрациях 5—10 мкг/мл и незначительно снижалась при концентрациях 20—50 мкг/мл.

В то же время влияние тертиапина на пресинаптические процессы было отчетливым. Так, снижение частоты МПКП, свидетельствующее об уменьшении спонтанного освобождения медиатора, наступало уже через 5—

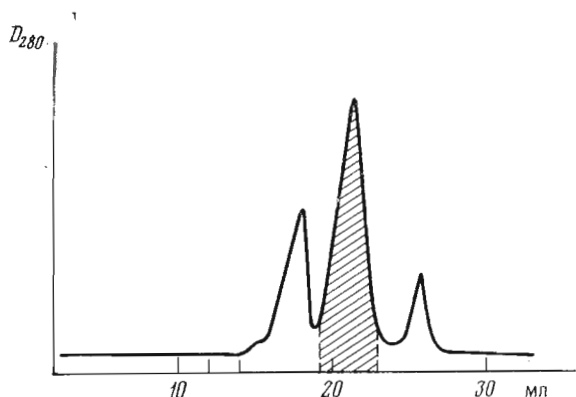


Рис. 3. Гель-фильтрация тертиапинодержащих фракций (рис. 2) на колонке (0,8×120 см) с биогелем Р-4 в 1,5% уксусной кислоте в присутствии 6 М мочевины. Скорость элюции 1 мл/ч

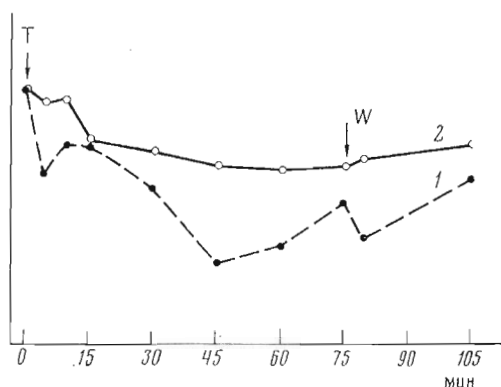


Рис. 4. Частота миниатюрных потенциалов концевой пластинки (1) и квантовый состав потенциалов концевой пластинки (2) в зависимости от времени воздействия тертиапина (5 мкг/мл) на орган. Приведены значения величины по отношению к контролю (%). Добавление тертиапина (T) и его удаление путем отмывки (W) показано стрелками

10 мин после добавления тертиапина и наблюдалось на протяжении всего времени контакта; оно не устранялось после 30-минутной отмывки раствором, не содержащим тертиапина (рис. 4). Одновременное снижение квантового состава потенциалов концевой пластинки (ПКП), т. е. вызванного нервным импульсом освобождения медиатора, было выражено гораздо слабее; оно составляет всего 14–16% по сравнению с 24–46% снижения частоты МПКП.

Поскольку другой пресинаптический токсин из яда пчелы, фосфолипаза A_2 , проявлял свое пресинаптическое действие только в присутствии ионов Ca^{2+} [7], мы исследовали действие тертиапина также в бескальциевой среде. В этом растворе уровень кальция поддерживался ниже 10^{-8} М добавлением 1 мМ этиленгликоля тетрауксусной кислоты (EGTA), в качестве заменителя кальция для поддержания клеточной стабильности добавляли 3 мМ Mg^{2+} . В этих условиях тертиапин действовал даже несколько сильнее; частота МПКП при концентрации токсина 25–50 мкг/мл снижалась почти в 4 раза (табл. 2).

Таким образом, пресинаптическое действие тертиапина развивается быстро, состоит в преимущественном снижении спонтанного освобождения медиатора, но не требует присутствия кальция в среде и практически не устраняется при отмывании.

По общему характеру пресинаптического эффекта тертиапина существенно отличается от других пресинаптических токсинов, как обладающих фосфолипазной активностью (α -бунгаротоксин, нотексин, тайпоксин и др.), так и не обладающих способностью к гидролизу фосфолипидов (бутулинический и столбнячный токсины, токсин из яда кара-курта) [10].

Пока можно высказать лишь самые предварительные суждения о механизме действия тертиапина на первые окончания. Преимущественное действие на спонтанное освобождение нейромедиатора заставляет отвести предположение о влиянии на конечное звено процесса освобождения — взаимодействие синаптического пузырька с пресинаптической мембраной или на потенциалзависимые кальциевые ионные каналы в ней. Можно предположить влияние тертиапина на уровень ионизированного кальция в аксоплазме, который определяется состоянием систем, стабилизирующих Ca^{2+} в состоянии покоя на относительно низком уровне — 10^{-7} М (связывание специфическими белками, активный транспорт за пределы терминали и др.). В рамках такого предположения становится понятным усиление эффекта тертиапина в бескальциевой среде: устраняется поступление кальция в нервное окончание по каналам утечки, что способствует снижению уровня Ca^{2+} в аксоплазме.

Пресинаптический эффект тертиапина имеет сравнительно мало аналогий, поскольку большинство изученных фармакологических препаратов вызывает учащение МПКП. Если все же наблюдается снижение частоты МПКП, то, как правило, оно сопровождается таким же или даже более сильным уменьшением квантового состава. В какой-то степени действие тертиапина напоминает эффект простагландинов, преимущественно уменьшающих спонтанное освобождение медиатора в нервно-мышечных синапсах лягушки, что предположительно объясняется усилением работы системы элиминации ионизированного кальция в аксоплазме [11]. Таким образом, тертиапин может быть использован как уникальный инструмент для исследования пресинаптических процессов.

Экспериментальная часть

Низкомолекулярная фракция яда пчелы была получена по методике, описанной в предыдущей работе [12]. После лиофилизации низкомолекулярной фракции 2,5 г полипептидной смеси разделяли геле-фильтрацией на колонке (5×90 см) с биогелем Р-4 (Bio-Rad, США) (рис. 1) в 1,5% уксусной кислоте. Смесь пептидов фракций II и III лиофилизовали и далее хроматографировали на колонке с СМ-целлюлозой СМ-52 (Whatman, Англия) ($2,5 \times 25$ см) в 0,1 М аммоний-ацетатном буфере (рН 4,7). Колонку промывали 500 мл стартового буфера и затем линейным градиентом аммоний-ацетатного буфера от 0,1 до 1,0 М (рис. 2). Фракции, содержащие пептидный материал, анализировали хроматографией в тонком слое силикагеля (Eastman 6060 silica gel, США) в системе *n*-бутанол — пиридин — вода — уксусная кислота, 15:10:12:3 (проявление нингидрином, сравнение с литературными данными [3]) и подвергали N-концевому аминокислотному анализу дансильным методом. Фракции, содержащие тертиапин, объединяли, лиофилизовали и хроматографировали на колонке ($0,8 \times 120$ см) с биогелем Р-4 в 1,5% уксусной кислоте в присутствии 6 М мочевины. Обессоливание проводили на колонке с сефадексом G-15 ($2,5 \times 20$ см) (Pharmacia, Швеция) в 1,5% уксусной кислоте. Фракции анализировали как указано выше. Выход тертиапина ~2,5 мг.

Автоматический анализ последовательности аминокислот осуществляли на секвенаторе 890 С (Beckman, США) по стандартной методике.

Восстановление и карбоксиметилирование образцов проводили по [13].

Условия расщепления пептида по остатку триптофана НВг в диметилсульфоксиде даны в работе [6]. Расщепление тертиапина бромцианом по остатку метионина проводили по методике [14]. Пептиды после триптиче-

ского гидролиза (условия стандартные) и химического расщепления тертиапина выделяли в тонком слое силикагеля в системе, описанной выше.

В работе использовали трипсин, карбоксипептидазы А и В (Worthington, США), карбоксипептидазу Y (Pierce, США). Гидролиз карбоксипептидазы А и В проводили по методике [15], карбоксипептидазой Y — по методике [16].

Физиологическую активность тертиапина исследовали на изолированных нервно-мышечных препаратах лягушки. Общепринятыми микроэлектродными методами [17] регистрировали частоту и амплитуду спонтанных мишлаторных потенциалов концевой пластинки (МПКП) и квантовый состав вызванных стимуляцией нерва потенциалов концевой пластинки (ПКП). Тертиапин в виде водного концентрированного раствора вносили в ванночку с изолированным препаратом. Показатели функции нервно-мышечного синапса рассчитывали по отношению к контрольным (до добавления тертиапина), принятым за 100%. Статистически достоверными принимали различия при $P \leq 0,05$ [18].

ЛИТЕРАТУРА

1. Habermann E. (1972) *Sciences*, **177**, 314–322.
2. Habermann E. (1977) *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **300**, 189–191.
3. Gaudie J., Hanson J. M., Shipolini R. A., Vernon C. A. (1978) *Eur. J. Biochem.*, **83**, 405–410.
4. Gaudie J., Hanson J. M., Rumjanek F. D., Shipolini R. A., Vernon C. A. (1976) *Eur. J. Biochem.*, **61**, 369–376.
5. Kudelin A. B., Martynov V. I., Kudelina I. A., Miroshnikov A. I. (1978) *Abstracts 15-th meeting Eur. Peptide Symp.*, p. 84. Gdansk.
6. Овчинников Ю. А., Мирошников А. И., Назимов И. В., Апсалон У. Р., Солдатов Л. П. (1979) *Биоорг. химия*, **5**, 805–813.
7. Камелская М. А., Магазаник Л. Г., Котова Е. Р., Сатыбалдина Н. К., Мирошников А. И., Апсалон У. Р., (1979) *Бюл. экпер. биол. и мед.*, **87**, 396–399.
8. Байдан Л. В., Владимирова И. А., Мирошников А. И., Таран Г. А. (1978) *Докл. АН СССР*, **241**, 1224–1227.
9. Владимирова И. А., Шуба М. Ф. (1978) *Нейрофизиология*, **10**, 295–299.
10. Chang C. C. (1979) in: *Snake Venoms* (Lee C.-Y., ed.), pp. 309–376, Springer Verlag, Berlin–Heidelberg–New York.
11. Hies P., Magazani L. G., Knoll J. (1977) *Acta physiol. hung.*, **49**, 235–239.
12. Мирошников А. И., Елякова Е. Г., Куделин А. Б., Сепявина Л. Б. (1978) *Биоорг. химия*, **4**, 1022–1028.
13. Crestfield A. M., Moore S., Stein W. H. (1963) *J. Biol. Chem.*, **238**, 622–627.
14. Steers E. Jr., Cravan C. R., Anfinsen C. B., Bethune J. L. (1965), **240**, 2478–2484.
15. Ambler R. P. (1967) in: *Methods in Enzymology* (Hirs C. H. W., ed.) vol. XI, pp. 156–166. Acad. Press, N. Y.—London.
16. Hugli T. E. (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 1712–1718.
17. Готгильф И. М., Магазаник Л. Г. (1977) *Нейрофизиология*, **9**, 415–421.
18. Белевский М. Л. (1963) *Элементы количественной оценки фармакологического эффекта*, «Медицина», М.

Поступила в редакцию
9.X.1979

STRUCTURE AND PRESYNAPTIC ACTIVITY OF TERTIAPIN—NEUROTOXIN FROM BEE VENOM *APIS MELLIFERA*

OVCHEVNIKOV Yu. A., MIROSHNIKOV A. I., KUDELIN A. B.,
KOSTINA M. B., VOIKOV V. A., MAGAZANIK L. G., GOTGIL'F I. M.

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow; I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Leningrad

Tertiapin, a minor low-molecular component, has been isolated from the venom of the *Apis mellifera* and the primary structure of tertiapin has been established. It has been studied how tertiapin influences (affects, acts on) the synaptic press, taking place (occurring) in the isolated nerve muscle frog's preparations. Tertiapin is shown to have a presynaptic action, it can mainly reduce spontaneous release of the mediator. Tertiapin neither needs Ca^{2+} in medium nor can be washed off. It differs much from the other presynaptic toxins according to general properties of presynaptic (effect) action. The mechanism of activity of the toxin is being discussed now.