



НОВЫЙ ПЕПТИД ИЗ ЯДА МАДАГАСКАРСКОЙ КОШАЧЬЕГЛАЗОЙ ЗМЕИ *Madagascarophis colubrinus* БЛОКИРУЕТ НИКОТИНОВЫЙ ХОЛИНОРЕЦЕПТОР¹

© 2023 г. Е. В. Крюкова*, Д. А. Иванов**, Н. В. Копылова*, В. Г. Старков*, Т. В. Андреева*,
И. А. Иванов*, В. И. Цетлин*, Ю. Н. Уткин*.*

*ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

**ФКОО “Лабкорп”, Россия, 107045 Москва, ул. Трубная, 12

Поступила в редакцию 19.11.2022 г.

После доработки 21.12.2022 г.

Принята к публикации 22.12.2022 г.

При скрининге ядов различных видов змей мы обнаружили, что яд мадагаскарской кошачьеглазой змеи *Madagascarophis colubrinus* конкурирует с α -бунгаротоксином за связывание с никотиновым холинорецептором *Torpedo californica*. С использованием жидкостной хроматографии из яда выделен пептид, ингибирующий связывание α -бунгаротоксина с этим рецептором и названный маколуксином. Аминокислотная последовательность этого 23-членного пептида установлена методом автоматической деградации по Эдману. Сравнение с аминокислотными последовательностями известных белков показало, что последовательность маколуксина гомологична α -спиральному участку последовательности металлопротеиназ яда змей. Пептид маколуксин был синтезирован методом твердофазного пептидного синтеза. Исследование его биологической активности показало, что маколуксин ингибирует связывание α -бунгаротоксина с рецептором *Torpedo* ($IC_{50} = 47$ мкМ). Маколуксин также обратимо ингибировал токи, вызванные ацетилхолином в никотиновом холинорецепторе мышечного типа человека. Это первые данные о наличии в яде заднебороздчатых змей пептида, способного ингибировать никотиновый холинорецептор.

Ключевые слова: мадагаскарская кошачьеглазая змея, яд, никотиновый холинорецептор, пептид, ингибитор, маколуксин

DOI: 10.31857/S0132342323030156, EDN: PDSQUE

ВВЕДЕНИЕ

Одно из основных назначений яда у змей — его использование при охоте. Наиболее эффективный путь обездвигнуть жертву — это нарушить функцию нервной системы. Данная стратегия используется змеями семейства Elapidae, яд которых содержит нейротоксины, блокирующие нервно-мышечную передачу. Змеи этого семейства имеют хорошо развитый аппарат для впрыскивания яда, включающий передние зубы, поэтому их называют переднебороздчатыми змеями (в англоязычной классификации — proteroglyphous snakes). В русскоязычной классификации к переднебороздчатым относят также змей семейства

Viperidae (в англоязычной классификации — ophioglyphous snakes), яды которых обладают в основном гемотоксичностью. Укусы этих змей весьма опасны для человека. Следует отметить, что имеется многочисленная группа змей, объединенных в различные семейства, у которых зубы для впрыскивания яда расположены в заднем отделе челюсти, это так называемые заднебороздчатые змеи (в англоязычной классификации — opisthoglyphous snakes). Большинство из них не опасны для человека, а некоторые виды содержатся в качестве домашних питомцев. Так, довольно популярный и часто встречающийся у террариумистов вид — мадагаскарская кошачьеглазая змея *Madagascarophis colubrinus*.

M. colubrinus — вид змей семейства Lamprophiidae, подсемейства Pseudoxynophiidae, обитающего в основном на Мадагаскаре [1]. Эти змеи встречаются в самых разных средах обитания по всему острову Мадагаскар, от горных районов до тропических лесов. В основном ведут ночной на-

¹ Статья посвящается памяти академика РАН Иванова Вадима Тихоновича.

Сокращения: ALEXA488-Bgt — α -Bgt, флуоресцентно меченный красителем ALEXA 488; α -Bgt — α -бунгаротоксин; АХ — ацетилхолин; nXP — никотиновый холинорецептор.

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 336-65-22; эл. почта: yutkin@yandex.ru; utkin@ibch.ru).

земный образ жизни, умеют лазать и хорошо плавают. Они питаются разнообразной добычей, включая хамелеонов и грызунов. Их яд слаб и часто недостаточно силен, чтобы умертвить выбранную добычу, поэтому они также используют компрессию по мере необходимости. Для человека укус этой змеи умеренно ядовитый [2]. Отравление может вызвать острые локальные эффекты, которые включают боль, отек, образование пузырей и некроз тканей [3].

Ранее ряд нейротоксинов был идентифицирован в ядах заднебороздчатых змей. Так, из ядов змей рода *Boiga* семейства Colubridae выделены нейротоксины, относящиеся к семейству трехпелтельных токсинов [4]. Нейротоксины этого же семейства идентифицированы в яде зеленой виноградной змеи *Oxybelis fulgidus* [5] и ложной коралловой змеи *Rhinobothrium bovallii* [6], оба этих вида также принадлежат семейству Colubridae. Следует отметить, что, хотя был проведен транскриптомный [7] и протеомный [8] анализ ядов заднебороздчатых змей семейства Lamprophiidae, данные об идентификации и выделении нейротоксинов из их ядов отсутствуют.

Что касается нейротоксинов змей семейства Viperidae, ранее мы показали, что фосфолипазы A2 из ядов этих змей обладают способностью ингибировать никотиновые холинорецепторы (нХР) [9, 10]. Еще несколько разных пептидно-белковых ингибиторов нХР были выделены нами из ядов змей этого семейства [11–13]. Приведенные данные свидетельствуют о перспективности ядов змей семейства Viperidae в качестве источника нейроактивных соединений.

Цель настоящей работы — изучение нейротоксической активности ядов ряда змей семейства Viperidae и мадагаскарской кошачьеглазой змеи *M. colubrinus*, а также выделение токсина, проявляющего нейротоксичность, из яда *M. colubrinus*. Поскольку наиболее ярко нейротоксичность проявляется при блокировании нервно-мышечной передачи, в качестве теста мы использовали ингибирование функции нХР, выступающего ключевым элементом нервно-мышечной передачи.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимодействие ядов змей с никотиновым холинорецептором. В настоящей работе активность ядов и их компонентов определяли по конкуренции с α -бунгаротоксином (α -Bgt) за связывание с нХР. Этот токсин — высокоэффективный антагонист нейронных нХР типов $\alpha 7$ и $\alpha 9$, а также нХР мышечного типа и до сих пор широко используется в качестве маркера этих рецепторов [14]. Мишень α -Bgt в нашей работе — нХР мышечного типа. Ранее мы успешно применяли флуоресцентно меченый α -Bgt для исследования токсин-рецеп-

торных взаимодействий [13, 15]. В настоящей работе мы использовали производное α -Bgt, флуоресцентно меченное красителем ALEXA 488, обозначаемое далее как ALEXA488-Bgt.

Конкурентный флуоресцентный анализ с использованием нХР электрического органа *Torpedo californica* проводили, как описано ранее [13]. Наряду с ядом мадагаскарской кошачьеглазой змеи *M. colubrinus* мы протестировали также яды щитомордника восточного *Glodyus blomhoffi*, щитомордника каменистого *G. saxatilis*, гадюки Орлова *Vipera orlovi*, желто-зеленой куфии *Protobothrops flavoviridis* и бушмейстера *Lachesis muta*. Как следует из полученных данных (рис. 1), заметную способность ингибировать связывание ALEXA488-Bgt с нХР *T. californica* проявили яд мадагаскарской кошачьеглазой змеи *M. colubrinus*, а также яды щитомордника восточного *G. blomhoffi* и щитомордника каменистого *G. saxatilis*. Яд мадагаскарской кошачьеглазой змеи *M. colubrinus* оказался одним из наиболее активных в отношении нХР мышечного типа, вытеснив 75% ALEXA488-Bgt при концентрации 2 мг/мл. Яд щитомордника восточного *G. blomhoffi* показал высокую активность, ингибируя 65% связывания ALEXA488-Bgt при концентрации 2 мг/мл. Яд щитомордника каменистого *G. saxatilis* проявил еще большую эффективность связывания с рецептором мышечного типа, полностью вытеснив ALEXA488-Bgt при концентрации 2 мг/мл.

На основании результатов, полученных с помощью метода флуоресцентного конкурентного анализа, можно сделать вывод о наличии в ядах компонентов, конкурирующих с ALEXA488-Bgt за связывание с нХР, но нельзя определить, выступают ли активные компоненты исследуемых ядов агонистами или антагонистами холинорецепторов. Дальнейшую работу было решено проводить с ядами, показавшими наиболее эффективное ингибирование связывания ALEXA488-Bgt с нХР *Torpedo*. Чтобы установить, влияют ли эти яды на функциональный ответ рецептора, мы провели их исследование методом кальциевого имиджинга. Исследование проводили на клеточных линиях эмбриональных почек человека HEK293 и нейробластомы мыши Neuro2a, трансфицированных плазмидами, кодирующими субъединицы мышечного нХР человека в соотношении $2\alpha 1 : 1\beta 1 : 1\delta : 1\epsilon$, а также кальциевый сенсор Case12. При активации рецептора через открывающийся канал кальций входит внутрь клетки и вызывает усиление флуоресценции сенсора. Сенсор позволяет напрямую оценивать изменения концентрации Ca^{2+} в диапазоне от нано- до микромолей с высоким отношением сигнала к шуму. Быстрое и обратимое связывание Case12 [16] с ионами кальция позволяет использовать сенсор для мониторинга уровня кальциевых осцилляций в клетке. В ответ на повышение концентрации

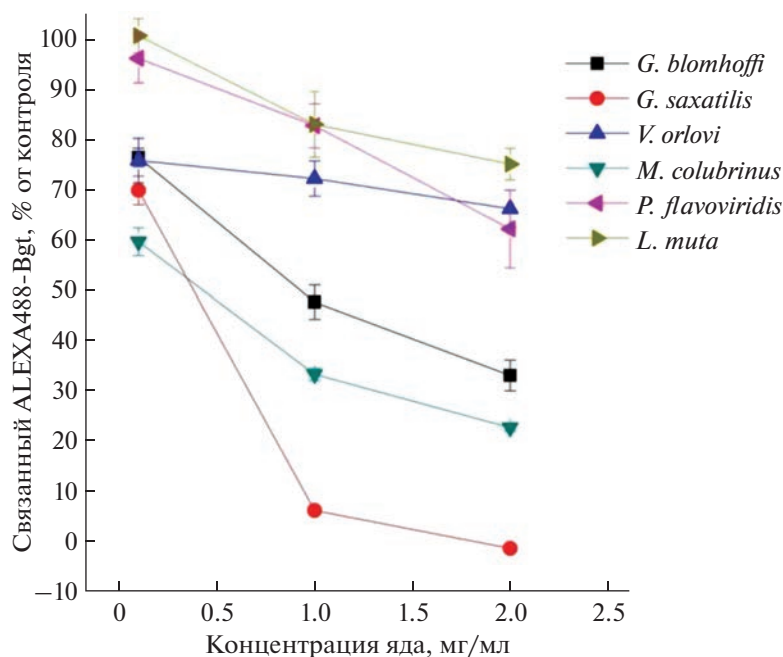


Рис. 1. Конкуренция ядов змей с ALEXA488-Bgt за связывание с нХР *T. californica*.

Ca^{2+} происходит увеличение интенсивности флуоресценции сенсора, которое может достигать 12-кратной величины.

Для исследования были выбраны клетки, ответившие на добавление 40 мкМ ацетилхолина увеличением эмиссии флуоресценции, что свидетельствовало о наличии на их поверхности экспрессированного рецептора. Далее проводили предварительную инкубацию клеток с ядами в течение 5 мин, добавляли ацетилхолин в такой же концентрации и оценивали изменение ответа на ацетилхолин. Результаты фиксировали для каждой отдельной клетки. Было установлено, что предварительная инкубация клеток исследуемых линий с ядом щитомордника каменистого *G. saxatilis* приводила к ингибированию ответа клеток на ацетилхолин на 73 и 85% для клеток линии НЕК293 и Neuro2a соответственно (рис. 2). При предварительной инкубации клеток с ядом мадагаскарской кошачьеглазой змеи *M. colubrinus* ингибирование ответа на ацетилхолин составило 75 и 100% для клеток линии НЕК293 и Neuro2a соответственно (рис. 2).

Таким образом, яды каменистого щитомордника и кошачьеглазой змеи ингибировали функциональный ответ мышечного нХР человека, проявив свойства конкурентных антагонистов. Результаты дальнейшего исследования яда каменистого щитомордника будут опубликованы отдельно. В данной работе яд кошачьеглазой змеи далее подвергали разделению методами жидкостной хроматографии для выделения активного компонента.

Выделение из яда кошачьеглазой змеи пептидного ингибитора нХР и определение его аминокислотной последовательности. Для выделения ингибитора сырой яд *M. colubrinus* разделяли с использованием трех стадий жидкостной хроматографии. На первом этапе использовали гель-фильтрацию на колонке с Superdex 75 (рис. 3а) и определяли способность полученных фракций конкурировать с α -Bgt за связывание с нХР *Torpedo*. Наиболее активной оказалась фракция II, которую затем разделяли с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (рис. 3б), у полученных фракций также определяли способность конкурировать с α -Bgt за связывание с нХР *Torpedo*. Наибольшую активность проявила фракция 18, которую дополнительно очищали с использованием обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием более плавного градиента концентрации ацетонитрила (рис. 4).

Фракция 5 (рис. 4) обладала способностью ингибировать связывание α -Bgt с нХР *Torpedo* и была подвергнута дальнейшему анализу. По данным масс-спектрометрии, молекулярная масса выделенного продукта составила 2786.3 Да. Эта масса соответствует пептиду длиной ~25 а.о. Учитывая этот факт, аминокислотную последовательность пептида определяли методом автоматической деградации по Эдману, используя секвенатор белков и пептидов PPSQ-33A (Shimadzu Corp., Япония). Установленная аминокислотная последовательность пептида, названного маколуксином (англ. macoluxin — от *Madagascarophis colubrinus*

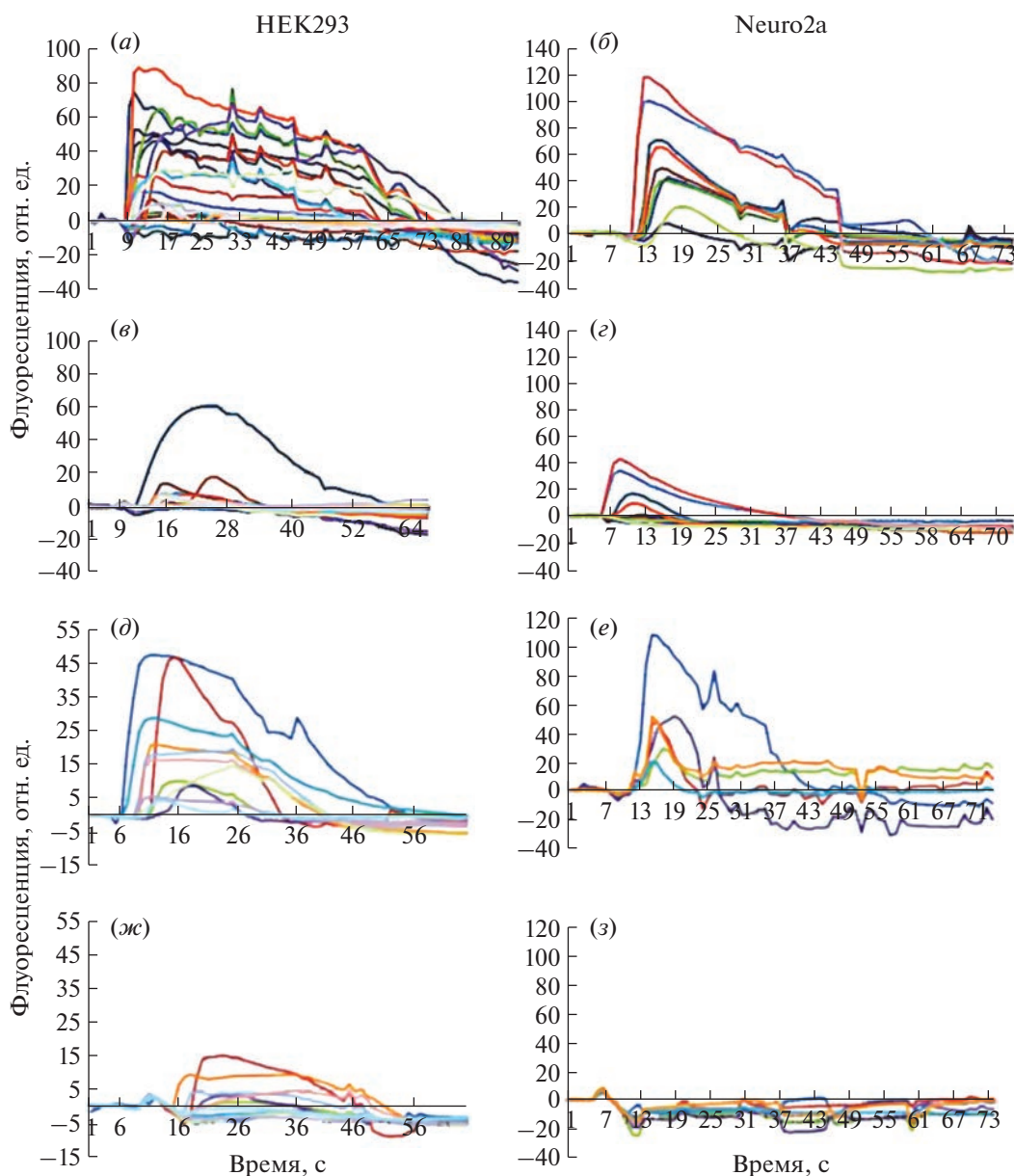


Рис. 2. Изменение интенсивности флуоресценции, соответствующее изменению внутриклеточной концентрации ионов кальция в клетках линий HEK293 и Neuro2a. Разными цветами представлены ответы, полученные от отдельных клеток. (а, б, д, е) — Ответ на инкубацию с 40 мкМ ацетилхолином в течение 5 с; (в, г, ж, з) — ответ на инкубацию с 40 мкМ ацетилхолином в течение 5 с после предварительной инкубации с ядом змей *G. saxatilis* (в, г) и *M. colubrinus* (ж, з) в течение 5 мин.

toxin), приведена на рис. 5а. Расчетная молекулярная масса маколуksина составила 2786.2 Да, в пределах ошибки она совпадает с экспериментально установленной величиной. Далее был проведен поиск гомологичных аминокислотных последовательностей в неповторяющихся базах данных белковых последовательностей, включая GenBank, PDB, SwissProt, PIR и PRF, с использованием алгоритма BLAST [17] (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Результаты поиска показали, что маколуksин гомологичен фрагменту аминокислотной после-

довательности металлопротеиназ ядов змей различных семейств (рис. 5б). При этом степень сходства очень высокая и достигает 91%. Интересно, что в пространственной структуре металлопротеиназ этот фрагмент образует α -спираль, расположенную на поверхности белковой глобулы (например, структура 3K7N_A [18]). Этим, возможно, объясняется выщепление фрагмента такого размера. Интересно отметить, что ранее пептиды Pm1 и Pm2, обладающие способностью ингибировать нХР, были идентифицированы в

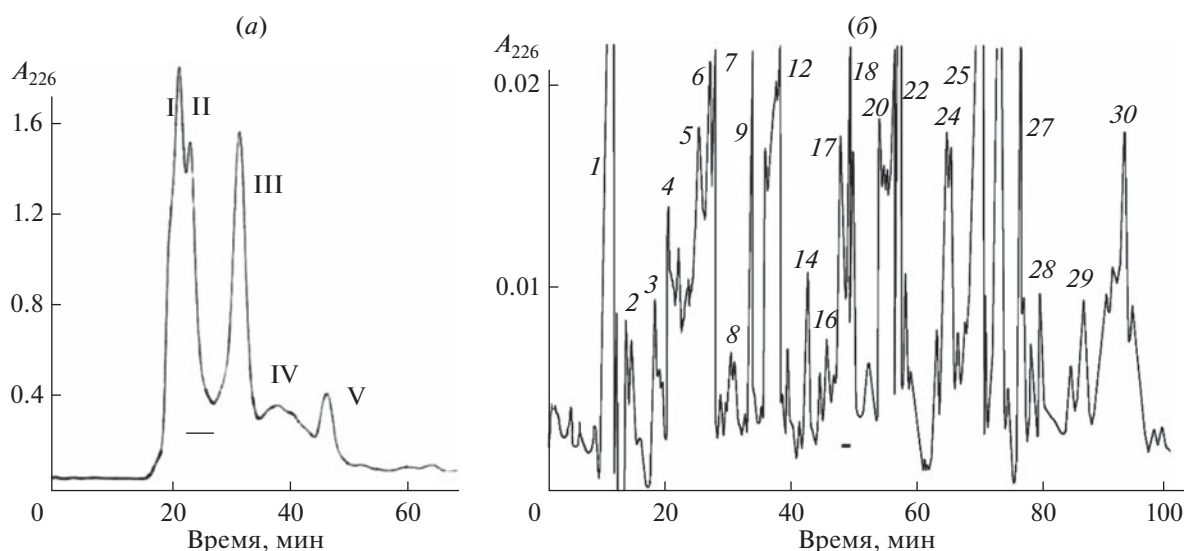


Рис. 3. Выделение активного соединения из яда *M. colubrinus*: (а) — гель-фильтрация на колонке Superdex 75 (10 × 300 мм), уравновешенной 0.1 М ацетатом аммония (pH 6.2), при скорости потока 0.5 мл/мин; (б) — разделение фракции II методом обращенно-фазовой хроматографии на колонке Jupiter C18 (10 × 250 мм) в градиенте концентрации ацетонитрила 10–55% за 90 мин при скорости потока 2 мл/мин. Горизонтальные линии под пиками обозначают активные фракции.

пропептидном домене металлопротеиназы оливковой песчаной змеи *Psammophis mossambicus* при анализе эволюции генов этих многофункциональных ферментов [19]. В процессе биосинтеза пропептидный домен отщепляется от белка-предшественника с образованием зрелой металлопротеиназы, обладающей протеолитической активностью. Ферменты, участвующие в процессинге белков змеиного яда, мало изучены; в частности, неизвестно, какие протеазы отщепляют пропептидный домен. Металлопротеиназы широко распространены в змеиных ядах, в некоторых ядах их содержание очень высоко, однако данные об идентификации фрагментов пропептидных доменов в ядах весьма ограничены. Такие фрагменты были, в частности, обнаружены при протеомном анализе яда *Bothrops jararaca* [20]. Что касается пептидов Pm1 и Pm2, данные о наличии этих соединений в яде змеи *P. mossambicus* отсутствуют. Эта змея, подобно *M. colubrinus*, также заднебороздчатая, но принадлежит семейству Psammophiidae. Поскольку маколуксин и пептиды Pm1 и Pm2 идентифицированы в разных доменах металлопротеиназ, гомология между ними отсутствует. Тем не менее обнаружение этих нейротоксичных пептидов свидетельствует о том, что крупные белки ядов могут выступать в качестве предшественников пептидов, обладающих иной активностью, нежели исходный токсин. В частности, металлопротеиназы (фрагментом одной из которых, по-видимому, является маколуксин) представляют собой группу многодоменных белков, проявляющих несколько видов биологиче-

ской активности, таких как способность вызывать геморрагию, протеолитическую деградацию фибриногена и фибрина, индукцию апоптоза и ингибирование агрегации тромбоцитов. Данных

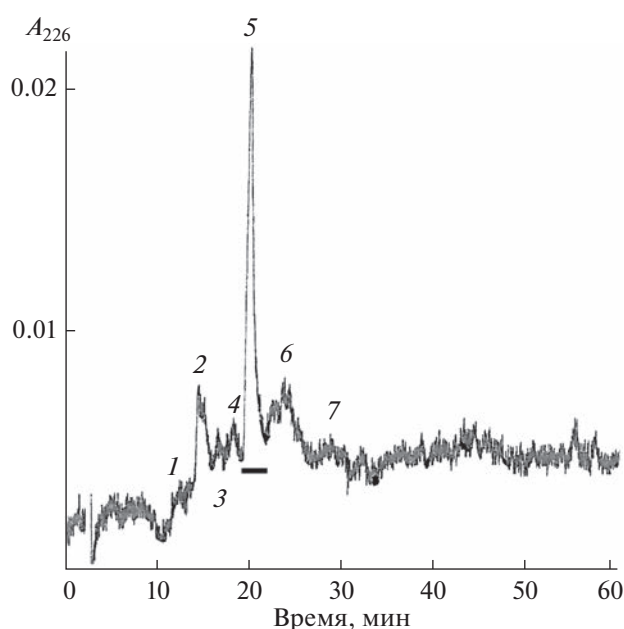


Рис. 4. Разделение фракции 18 (рис. 3б) методом обращенно-фазовой хроматографии на колонке Jupiter C18 (4.6 × 250 мм) в градиенте концентрации ацетонитрила 20–30% за 60 мин при скорости потока 1 мл/мин. Горизонтальная линия обозначает активную фракцию.

(a)				
1	10	20		
LKSFGEWRKTDLLPRKRNDNAQL				
(б)				
		Идентичность, %	Идентификатор в GenBank	
1	LKSFGEWRKTDLLPRKRNDNAQL	23	100	Маколуksин
274	LKSFGEWRKTVLLPRRRNDNAQL	296	91	QSI84039.1
274	LNSFGEWRKTVLLPRKRNDNAQL	296	91	ABK63559.1
274	LKSFGEWRET VLLPRKRNDNAQL	296	91	D6PXE8.1
268	LKFFGNWRKTDLLNRKRHDNAQL	290	83	KAG5858171.1
262	LDSFGEWRKTDLLNRKSHDNAQL	284	83	Q8QG89.1
267	LNAFGEWRKTDLLTRKKHDNAQL	289	78	Q2QA02.1

Рис. 5. (a) — Аминокислотная последовательность маколуksина; (б) — выравнивание аминокислотной последовательности маколуksина с гомологичными фрагментами известных белков: QSI84039.1 — металлопротеиназа *Calliophis bivirgatus*; ABK63559.1 — металлопротеиназа *Demansia vestigiata*; D6PXE8.1 — цинк-металлопротеиназа-дезинтегрин-подобная АТРаза В *Naja atra*; KAG5858171.1 — металлопротеиназа *Bothrops jararaca*; Q8QG89.1 — металлопротеиназа BITM02A *Bothrops insularis*; Q2QA02.1 — металлопротеиназа *Crotalus durissus durissus*.

о нейротоксической активности металлопротеиназ обнаружить не удалось.

Как указывалось во введении, ранее в ядах заднебороздчатых змей были идентифицированы трехпетельные токсины — блокаторы нХР [4–6]. Эти токсины представляют собой белки с молекулярной массой ~10 кДа и содержат пять дисульфидных связей, в то время как в маколуksине дисульфидные связи отсутствуют. Близких структурных аналогов маколуksина среди токсинов, действующих на нХР, обнаружить не удалось. Следует отметить, что помимо Pm1 и Pm2, пептиды, ингибирующие нХР и не содержащие дисульфидные связи, ранее были выделены нами из ядов бирманской гадюки *Azemiops feae* (пептид аземиопсин) [11] и шумящей гадюки *Bitis arietans* (пептиды баптиды) [12]. Однако эти змеи, в отличие от *M. colubrinus*, относятся к семейству Viperidae. Еще один пример пептидов, не содержащих дисульфидных связей и ингибирующих нХР, — конорфамиды из яда мексиканской морской улитки *Conus austini* [21]. Все эти пептиды, за исключением баптидов, характеризуются высоким содержанием основных аминокислот, но при этом гомология между ними отсутствует.

Взаимодействие маколуksина с нХР. Для более детального изучения биологической активности пептид маколуksин получали методом твердофазного пептидного синтеза. Чистоту полученного пептида подтверждали методом аналитической обращенно-фазовой хроматографии, а структуру — методом масс-спектрометрии.

Эффективность взаимодействия маколуksина с нХР оценивали по его конкуренции с радиоак-

тивным α -бунгаротоксином (^{125}I - αBgt) за связывание с мембранами электрического органа ската *T. californica*, содержащими рецепторы мышечно-го типа ($\alpha_1\beta_1\gamma\delta$), и с клетками линии GH_4C_1 , экспрессирующими нейронные нХР типа $\alpha 7$ человека. При этом установлено, что пептид ингибирует связывание ^{125}I - αBgt с мембранами *Torpedo* с величиной $\text{IC}_{50} = 46.8 \pm 3.9$ мкМ (рис. 6). Маколуksин в концентрации 50 мкМ не ингибировал связывание ^{125}I - αBgt с $\alpha 7$ нХР, а при концентрации 100 мкМ ингибирование составило лишь 10%. Интересно, что в отличие от маколуksина, ранее упоминавшиеся пептиды Pm1 и Pm2 ингибировали нХР типа $\alpha 7$ человека, показывая величины $\text{IC}_{50} \sim 12$ мкМ [19].

Чтобы проверить, служит ли маколуksин функциональным ингибитором нХР, были проведены электрофизиологические эксперименты с использованием нХР мышечного типа, гетерологически экспрессированного в ооцитах шпорцевой лягушки. Пептид сам по себе ионных токов не индуцировал. Однако маколуksин ингибировал ток, вызванный ацетилхолином (рис. 7). При этом его ингибирующий эффект полностью исчезал после стандартной отмывки длительностью 5 мин. Следовательно, маколуksин — обратимый антагонист нХР мышечного типа.

Таким образом, из яда кошачьеглазой змеи *M. colubrinus* выделен пептид маколуksин, обладающий способностью обратимо ингибировать нХР мышечного типа. Маколуksин имеет высокую степень подобия с фрагментом металлопротеиназы змеиного яда и, по-видимому, образуется в результате протеолиза этого фермента.

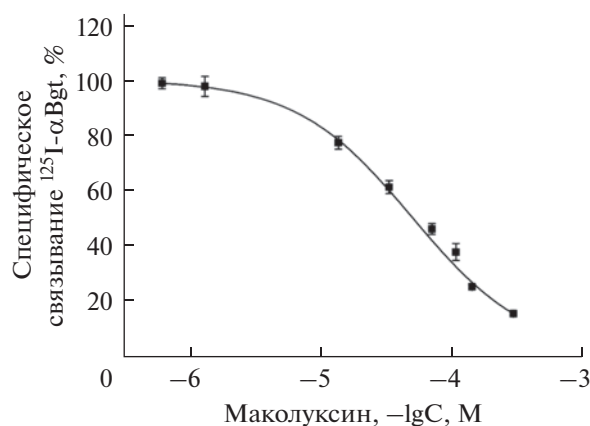


Рис. 6. Ингибирование связывания радиоактивного α -Bgt с нХР *T. californica* маколуksином ($IC_{50} = 46.8 \pm 3.9$ мкМ).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. Мембраны *Torpedo californica* любезно предоставлены проф. Ф. Хухо (Свободный Университет Берлина, Германия). α -Bgt, меченный ALEXA 488 (ALEXA488-Bgt), был приобретен у Thermo Fisher Scientific (Waltham, США). Все использованные в работе реактивы имели чистоту “ч.д.а.” или выше.

Получение яда *M. colubrinus*. Яд получали от экземпляров *M. colubrinus*, содержащихся в серпентарии ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН. После отбора яд высушивали над безводным $CaCl_2$ и хранили при $-20^\circ C$.

Выделение пептида. Яд растворяли в 0.1 М ацетате аммония (pH 6.2) и наносили на колонку с Superdex 75 (10×300 мм; Cytiva, США), уравновешенную тем же буфером. Элюцию проводили при скорости потока 0.5 мл/мин. Оптическую плотность элюента регистрировали при 226 нм с исполь-

зованием проточного УФ-детектора Uvocord SII (ЛКВ, Швеция). Фракцию II (рис. 3а) лиофилизировали и далее разделяли методом обращенно-фазовой хроматографии на колонке Jupiter C18 (10×250 мм; Phenomenex, США) в градиенте ацетонитрила 0–55% в течение 90 мин в присутствии 0.1% трифторуксусной кислоты при скорости потока 2 мл/мин (рис. 3б). Фракцию 18 (рис. 3б) лиофилизировали и дополнительно очищали методом обращенно-фазовой хроматографии на колонке Jupiter C18 (4.6×250 мм; Phenomenex, США) в градиенте ацетонитрила 20–30% за 60 мин в присутствии 0.1% трифторуксусной кислоты при скорости потока 1 мл/мин (рис. 4).

Определение аминокислотной последовательности. Первичную структуру пептида определяли методом деградации по Эдману с помощью автоматического секвенатора белков и пептидов PPSQ-33A (Shimadzu Corp., Япония) по протоколу производителя.

Пептидный синтез. Пептид маколуksин синтезировали по методике, описанной ранее [22].

Биологическая активность маколуksина. Конкурентный флуоресцентный анализ. Все опыты проводили в 96-луночном круглодонном планшете с низкой сорбцией (MICROTEST TM U-Bottom, Thomas Scientific, США). Буфер для связывания имел следующий состав: 137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 1.46 мМ KH_2PO_4 , 10 мМ Na_2HPO_4 , 0.1% Tween-20, pH 7.4. В лунки планшета вносили исследуемый раствор мембран в концентрации 0.125 мкг/мл белка (0.31 нМ токсин-связывающих участков), инкубировали в течение часа в 100 мкл буфера для связывания с ядами *G. blomhoffi*, *G. saxatilis*, *V. orlovi*, *M. colubrinus*, *P. flavoridis* и *L. muta* в диапазоне концентраций 0.1–2.0 мг/мл. Далее добавляли 20 мкл ALEXA488-Bgt в буфере для связывания в конечной концентрации 0.293 пМ, инкубацию продолжали еще 5 мин. Реакцию останавливали фильтрацией на фильтрах

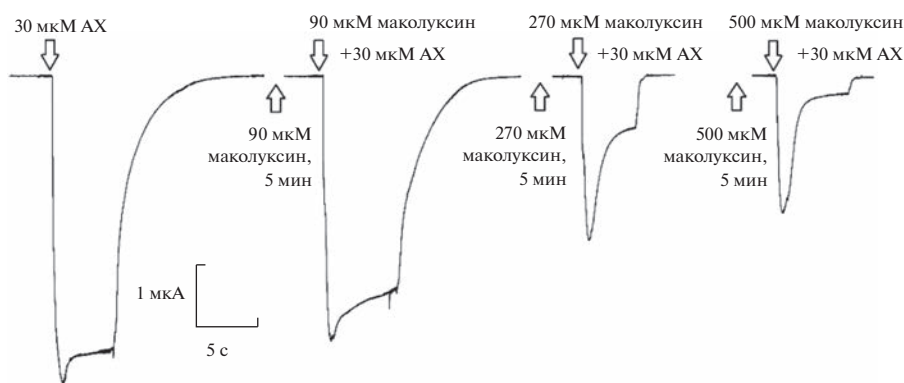


Рис. 7. Ингибирование маколуksином токов, индуцируемых ацетилхолином (AX) в нХР мышечного типа. Регистрировали ответ ооцита на добавление 30 мкМ ацетилхолина, далее шла отмывка (не менее 5 раз по 100 мкл), инкубация с маколуksином (5 мин) и добавление маколуksина в смеси с 30 мкМ ацетилхолином.

GF/C (Whatman, Великобритания), предварительно замоченных в растворе 0.5%-ного полиэтиленimina, и промывали холодным буфером для связывания 3 раза по 200 мкл. Количество связавшегося ALEXA488-Bgt определяли на флуориметре ФФМ-01 (ООО "Кортек", Россия). Длина волны возбуждающего света составляла 482 нм, регистрацию сигнала проводили при длине волны 538 нм. Неспецифическое связывание определяли в присутствии 200-кратного избытка α -кобратоксина. Каждый эксперимент проводили дважды в четырех повторах.

Для построения графиков использовали программу OriginPro 7.5 (OriginLab Corporation, США).

Культирование клеток и их транзистентная трансфекция. Для трансфекции использовали клетки нейробластомы мыши Neuro2a и почек эмбриона человека HEK293. Клетки получены из Российской коллекции клеточных культур позвоночных (Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали в среде DMEM (ПанЭко, Россия), содержащей 10% фетальной сыворотки (HyClone, США), 5 мМ L-глутамин, гентамицин (10 мкг/мл) и амфотерицин В (0.25 мкг/мл). Культуру клеток выращивали в инкубаторе MCO-15AC (5% CO₂, 37°C; Sanyo, Япония).

Трансфекцию клеток проводили с помощью Липофектамина 2000 (Invitrogen, США). Плазмиды, кодирующие субъединицы мышечного nHR, были любезно предоставлены проф. В. Витцеманном (Институт медицинских исследований Макса Планка, Германия). Смесь для трансфекции содержала 250 мкл DMEM без сыворотки, 2.5 мкл Липофектамина 2000, 1 мкг смеси ДНК плазмид субъединиц мышечного nHR мыши (в соотношении 2 α 1 : 1 β 1 : 1 δ : 1 ϵ) и 1 мкг ДНК кальциевого сенсора Case12 (Евроген, Россия). Для достижения оптимального уровня экспрессии nHR на поверхности клеток эксперименты по кальциевому имиджингу проводили через 72 ч после трансфекции.

Детекция изменений внутриклеточной концентрации кальция под воздействием ядов *G. saxatilis* и *M. colubrinus*. Для определения внутриклеточного содержания ионов кальция использовали генетически кодируемый сенсор Case12 (Евроген, Россия). Детекцию изменения внутриклеточного содержания кальция проводили при 516 нм.

Изображения регистрировали с помощью кварцевого объектива Planc N (20 $\times$ /0.40) CCD-камерой Olympus XM-10 (Hamamtsu, Япония). Сбор и хранение изображений в режиме реального времени осуществляли с помощью программы Cell-A (Olympus, Япония), последующую обработку — с использованием программ ImageJ, OriginPro 7.5, Microsoft Office Excel. Изменения интенсивности флуоресценции клеток фиксировали видеокамерой XM10 (Olympus, Япония) при выдержке

500 мс. Объем камеры с клетками составлял ~300 мкл, что обеспечивало полную замену раствора в камере не более чем за 15 с.

К клеткам добавляли раствор 40 мкМ ацетилхолина в 1 мл наружного раствора (140 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 2 мМ CaCl₂, 2 мМ MgCl₂, 10 мМ HEPES, 10 мМ глюкоза, pH 7.4), с последующей трехкратной отмывкой тем же раствором. После чего 5 мин инкубировали клетки с ядами и снова добавляли 40 мкМ ацетилхолин. Результаты фиксировали для каждой отдельной клетки.

Изменения ответа для каждой отдельной клетки рассчитывали по формуле:

$$100 - (A_o/A_k \times 100),$$

где A_o — амплитуда ответа клетки на ацетилхолин после 5-минутной инкубации с ядом, A_k — амплитуда ответа клетки на ацетилхолин в предварительном эксперименте.

Результаты представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка. По полученным индивидуальным значениям изменения ответа рассчитывали среднее изменение в процентах.

Конкурентный радиолигандный анализ. Для экспериментов по конкурентному связыванию суспензию мембран электрического органа *T. californica* (в конечной концентрации 1.2 нМ α -бунгаротоксин-связывающих участков) или клеток GH4C1 (0.4 нМ α -бунгаротоксин-связывающих участков) в 20 мМ Tris-HCl-буфере, pH 8.0, содержащем бычий сывороточный альбумин в концентрации 1 мг/мл, инкубировали 90 мин с различными концентрациями пептида. Затем добавляли радиоактивный [¹²⁵I]-меченый α -Bgt (500 Ки/ммоль) до получения конечной концентрации 0.2–0.4 нМ и инкубировали еще 5 мин. Определение неспецифического связывания, фильтрацию образцов и подсчет связавшейся радиоактивности проводили, как описано ранее [23].

Электрофизиологические измерения. Электрофизиологические измерения на ооцитах *Xenopus* проводили, как описано ранее [23]. Ооциты предварительно инкубировали с различными концентрациями маколуксина в течение 5 мин перед его совместным нанесением с ацетилхолином. Чтобы проверить обратимость ингибирования nHR маколуксином, рецептор инкубировали с маколуксином в течение 5 мин. Затем ооциты промывали буфером и через 5 мин измеряли ток, вызванный 30 мкМ ацетилхолином.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный анализ способности ядов нескольких видов змей семейств Viperidae и Lamprophiidae ингибировать nHR впервые показал, что яд заднебороздчатой кошачьеглазой змеи

M. colubrinus семейства Lamprophiidae обладает такой способностью. С использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии из яда *M. colubrinus* выделен пептид маколуksин, ингибирующий нХР мышечного типа, и определена его аминокислотная последовательность. Поиск гомологичных аминокислотных последовательностей в базах данных известных белков показал, что последовательность маколуksина имеет высокую степень сходства (идентичность 91%) с участком последовательности металлопротеиназ ядов змей. Этот фрагмент металлопротеиназ имеет α -спиральную структуру и расположен на поверхности белковой глобулы. Маколуksин был получен в препаративных количествах методом твердофазного пептидного синтеза. Исследование его биологической активности показало, что он конкурирует с α -Bgt за связывание с нХР *Torpedo*, при этом величина IC₅₀ составляла 47 мкМ. Пептид маколуksин в концентрации до 50 мкМ не конкурировал с α -Bgt за связывание с α 7 нХР. При концентрации в диапазоне сотен микромолей маколуksин ингибировал токи, вызываемые ацетилхолином в нХР мышечного типа. Эффект ингибирования был легко обратим при отмывке в течение 5 мин.

Таким образом, нами впервые в яде заднебрюшной змеи идентифицирован и охарактеризован пептид, ингибирующий нХР мышечного типа. Наши данные свидетельствуют о том, что белки яда могут выступать в качестве предшественников пептидных токсинов, обладающих иным видом биологической активности.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность д.х.н. С.А. Козлову (ИБХ РАН) за определение аминокислотной последовательности маколуksина методом автоматической деградации по Эдману и к.б.н. Д.С. Лебедеву за проведение электрофизиологических экспериментов.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00769).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры со змеями одобрены Комиссией по содержанию и использованию лабораторных животных ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН (протокол-заявка № 324/2021 от 23 июня 2021 г.).

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Madagascarophis colubrinus* (Schlegel, 1837) // The Reptile Database, 2022. https://reptile-database.reptarium.cz/species?genus=Madagascarophis&species=colubrinus&search_param=%28%28genus%3D%27madagascarophis%27%29%29
2. Domergue C.A. // Bull. Mus. Natn. Hist. Nat., Paris. 1987. V. 9. P. 455–489.
3. Domergue C.A. // Bull. Acad. Malgache. 1962. V. 40. P. 97–98.
4. Dashevsky D., Debono J., Rokyta D., Nouwens A., Josh P., Fry B.G. // J. Mol. Evol. 2018. V. 86. P. 531–545. <https://doi.org/10.1007/s00239-018-9864-6>
5. Heyborne W.H., Mackessy S.P. // Biochimie. 2013. V. 95. P. 1923–1932. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.06.025>
6. Calvete J.J., Bonilla F., Granados-Martínez S., Sanz L., Lomonte B., Sasa M. // J. Proteomics. 2020. V. 225. P. 103882. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103882>
7. Xie B., Dashevsky D., Rokyta D., Ghezellou P., Fathinia B., Shi Q., Richardson M.K., Fry B.G. // BMC Biol. 2022. V. 20. P. 4. <https://doi.org/10.1186/s12915-021-01208-9>
8. Koua D., Ebou A., Habbouche Z., Ballouard J.M., Caron S., Bonnet X., Dutertre S. // Toxicon X. 2022. V. 15. P. 100130. <https://doi.org/10.1016/j.toxcx.2022.100130>
9. Vulfius C.A., Kasheverov I.E., Starkov V.G., Osipov A.V., Andreeva T.V., Filkin S.Y., Gorbacheva E.V., Astashev M.E., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. // PLoS One. 2014. V. 9. P. e115428. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115428>
10. Vulfius C.A., Kasheverov I.E., Kryukova E.V., Spirova E.N., Shelukhina I.V., Starkov V.G., Andreeva T.V., Faure G., Zouridakis M., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. // PLoS One. 2017. V. 12. P. e0186206. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186206>
11. Utkin Y.N., Weise C., Kasheverov I.E., Andreeva T.V., Kryukova E.V., Zhmak M.N., Starkov V.G., Hoang N.A., Bertrand D., Ramerstorfer J., Sieghart W., Thompson A.J., Lummis S.C., Tsetlin V.I. // J. Biol. Chem. 2012. V. 287. P. 27079–27086. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.363051>
12. Vulfius C.A., Spirova E.N., Serebryakova M.V., Shelukhina I.V., Kudryavtsev D.S., Kryukova E.V., Starkov V.G., Kopylova N.V., Zhmak M.N., Ivanov I.A., Kudryashova K.S., Andreeva T.V., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. // Toxicon. 2016. V. 121. P. 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.08.020>
13. Kryukova E.V., Vulfius C.A., Ziganshin R.H., Andreeva T.V., Starkov V.G., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. // J. Venom Res. 2020. V. 10. P. 23–29.

14. Dutertre S., Nicke A., Tsetlin V.I. // *Neuropharmacology*. 2017. V. 127. P. 196–223.
https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.06.011
15. Kudryavtsev D.S., Shelukhina I.V., Son L.V., Ojomoko L.O., Kryukova E.V., Lyukmanova E.N., Zhmak M.N., Dolgikh D.A., Ivanov I.A., Kasheverov I.E., Starkov V.G., Ramerstorfer J., Sieghart W., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. // *J. Biol. Chem.* 2015. V. 290. P. 22747–22758.
https://doi.org/10.1074/jbc.M115.648824
16. Shelukhina I., Spirova E., Kudryavtsev D., Ojomoko L., Werner M., Methfessel C., Hollmann M., Tsetlin V. // *PLoS One*. 2017. V. 12. P. e0181936.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181936
17. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. P. 3389–3402.
https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389
18. Guan H.H., Goh K.S., Davamani F., Wu P.L., Huang Y.W., Jeyakanthan J., Wu W.G., Chen C.J. // *J. Struct. Biol.* 2010. V. 169. P. 294–303.
https://doi.org/10.1016/j.jsb.2009.11.009
19. Brust A., Sunagar K., Undheim E.A., Vetter I., Yang D.C., Casewell N.R., Jackson T.N., Koludarov I., Alewood P.F., Hodgson W.C., Lewis R.J., King G.F., Antunes A., Hendrikx I., Fry B.G. // *Mol. Cell. Proteomics*. 2013. V. 12. P. 651–663.
https://doi.org/10.1074/mcp.M112.023135
20. Nicolau C.A., Carvalho P.C., Junqueira-de-Azevedo I.L., Teixeira-Ferreira A., Junqueira M., Perales J., Neves-Ferreira A.G., Valente R.H. // *J. Proteomics*. 2017. V. 151. P. 214–231.
https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.06.029
21. Jin A.H., Cristofori-Armstrong B., Rash L.D., Román-González S.A., Espinosa R.A., Lewis R.J., Alewood P.F., Vetter I. // *Biochem. Pharmacol.* 2019. V. 164. P. 342–348.
https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.04.025
22. Shelukhina I.V., Zhmak M.N., Lobanov A.V., Ivanov I.A., Garifulina A.I., Kravchenko I.N., Rasskazova E.A., Salnova M.A., Tukhovskaya E.A., Rykov V.A., Slashcheva G.A., Egorova N.S., Muzyka I.S., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. // *Toxins (Basel)*. 2018. V. 10. P. 34.
https://doi.org/10.3390/toxins10010034
23. Lebedev D.S., Kryukova E.V., Ivanov I.A., Egorova N.S., Timofeev N.D., Spirova E.N., Tufanova E.Y., Siniavin A.E., Kudryavtsev D.S., Kasheverov I.E., Zouridakis M., Katsarava R., Zavrashvili N., Iagorshvili I., Tzartos S.J., Tsetlin V.I. // *Mol. Pharmacol.* 2019. V. 96. P. 664–673.
https://doi.org/10.1124/mol.119.117713

A New Peptide from the Venom of the Madagascar Cat-Eyed Snake *Madagascarophis colubrinus* Blocks Nicotinic Acetylcholine Receptor

E. V. Kryukova*, D. A. Ivanov**, N. V. Kopylova*, V. G. Starkov*, T. V. Andreeva*, I. A. Ivanov*,
V. I. Tsetlin*, and Yu. N. Utkin*,#

#Phone: +7 (495) 336-65-22; e-mail: utkin@ibch.ru; yutkin@yandex.ru

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

**FKOO “Labcorp”, ul. Trubnaya 12, Moscow, 107045 Russia

In screening the venoms of various snake species, we found that the venom of the Madagascar cat-eyed snake *Madagascarophis colubrinus* competes with α -bungarotoxin for binding to the nicotinic acetylcholine receptor from *Torpedo californica*. Using liquid chromatography, a peptide, called macoluxin and inhibiting the binding of the toxin to the receptor, was isolated from the venom. The amino acid sequence of this 23-amino acid peptide was determined by automatic Edman degradation. Comparison with amino acid sequences of known proteins showed that the macoluxin sequence is homologous to the α -helical region of the sequence of snake venom metalloproteinases. The peptide was synthesized by solid-phase peptide synthesis, and the study of its biological activity showed that it inhibits the binding of α -bungarotoxin to the *Torpedo* receptor with an IC_{50} of 47 μ M. Macoluxin also reversibly inhibited acetylcholine-induced currents in the muscle-type nicotinic acetylcholine receptor. This is the first data on the presence in the venom of rear fanged snakes of a peptide that can inhibit the nicotinic acetylcholine receptor.

Keywords: Madagascar cat-eyed snake, venom, nicotinic acetylcholine receptor, peptide, inhibitor, macoluxin