

## ПУРИНЕРГІЧНІ МЕМБРАННІ РЕЦЕПТОРИ ЯК МІШЕНІ ДІЇ ПУРОТОКСИНУ-1 – КОМПОНЕНТА ОТРУТИ ПАВУКІВ РОДУ *GEOLYCOSA*

Надійшла 05.11.10

Досліджено впливи пуротоксину-1 (ПТ1) – компонента отрути павуків *Geolycosa* – на ряд потенціал- та лігандкерованих іонних каналів, наявних у плазматичній мембрані сенсорних клітин дорсальнокорінцевих гангліїв (ДКГ) щурів. ПТ1 у концентрації 100 нМ не впливав ніяким чином на іонні струми через потенціалкеровані натрієві, калієві чи кальцієві канали в мембранах ізольованих сенсорних нейронів. Цей агент також виявився неактивним щодо капсаїцинових рецептор-каналних комплексів (TRPV1). Результати тестування дії ПТ1 на пуринергічні рецептор-каналні комплекси P2X3, P2X2 та P2X2/3 показали, що даний агент є високоселективним блокатором виключно рецепторів типу P2X3. Виявлена нами селективність ПТ1 свідчить про його унікальність та відкриває нові можливі аспекти досліджень структурно-функціональних особливостей рецептор-каналних комплексів P2X3 як пуринергічної периферичної ланки системи ноцицепції.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** отрута павуків, дисульфідвмісні нейротоксини, пуротоксин (ПТ1), сенсорні нейрони, пуринергічні рецептори, пуринорецептори P2X3.

### ВСТУП

Павуки (*Aranei*) складають досить відому групу членистоногих, які мають отруйні залози. Отрута павуків є складною за композицією та містить в собі компоненти різноманітної природи, насамперед пептидної. У деяких (порівняно небагатьох) видів павуків отрута може бути небезпечною для великих тварин та людини.

У складі отрути більшості досліджених на сьогодні павуків кількісно переважають дисульфідвмісні нейротоксичні пептиди. Для просторової конформації молекул цих сполук є характерним так званий цистеїновий мотив, що базується на формуванні “цистинових вузлів” [1, 2]. Подібна структура включає в себе кільце, утворене двома дисульфідними зв'язками, та петлеподібні бокові сегменти, з'єднані третім дисульфідним зв'язком. Такий комплекс інваріантно пов'язаний з бета-складчастою структурою, яка є досить ефективним “стабілізатором” загальної структури молекули або її компартмента [3].

У складі отрути конкретного виду павука можуть бути наявними кілька сотень видів споріднених молекул зі схожою просторовою структурою. Специфічність дії кожного окремого компонента визначається унікальною комбінацією варіабельних амінокислотних залишків, що розташовані у так званих ділянках петель між дисульфідними містками. Існування молекул з різною специфічністю, як правило, забезпечує широкий спектр токсичної дії отрути павуків [4].

Зараз розпочато інтенсивне вивчення складу та біологічних ефектів отрути павуків родини *Lycosidae* (павуки-вовки), до якого належать добре відомі тарантули. Зокрема, започатковано дослідження отрути представників роду *Geolycosa* – досить крупних павуків, котрі зустрічаються в степових і напівпустельних областях Євразії. Нещодавно в отруті павуків зазначеного роду було ідентифіковано черговий компонент з наявністю структури типу “цистиновий вузол”. Даний компонент отримав назву пуротоксин-1 (ПТ1) [5]. За своєю первинною структурою це є пептид, що складається з 35 амінокислотних залишків. Вісім з них є цистеїнами, що формують чотири дисульфідних зв'язки. Було показано, що ПТ1 істотно впливає на іонні струми в первинних сенсорних нейронах

<sup>1</sup> Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ (Україна).

<sup>2</sup> Інститут біоорганічної хімії ім. акад. М. М. Шемякіна та Ю. В. Овчиннікова РАН, Москва (РФ).

Ел. пошта: bo@biph.kiev.ua (Г. А. Савченко).

(нейронах дорсальнокорінцевих гангліїв – ДКГ), опосередковані активацією пуринергічних рецепторів типу P2X3. Виявилось, що для ПТ1 характерна дуже висока афінність до цих рецепторів ( $EK_{50} = 12$  нМ). У той же час дані щодо специфічності дії даного токсину, як і інших компонентів отрут павуків, досі залишаються дуже обмеженими.

У нашій роботі ми вивчали селективність дії ПТ1 на ліганд- та потенціалкеровані іонні канали в мембрані сенсорних нейронів (клітин ДКГ) шурів.

## МЕТОДИКА

Експерименти проводилися на культивованих нейронах ДКГ восьмиденних шурів лінії Вістар.

*Культивування нейронів ДКГ.* Ганглії видаляли після декапітації тварини та інкубували їх протягом 30–50 хв при температурі 32 °С у зовнішньоклітинному розчині такого складу (у мілімолях на 1 л): NaCl – 137, KCl – 2.7,  $Na_2HPO_4$  – 10,  $KH_2PO_4$  – 2; рН розчину доводили до 7.4 за допомогою NaOH. До розчину додавали 0.3 % трипсину та 0.1 % колагенази. Протягом усієї процедури розчин, в якому перебували клітини, постійно насичувався газовою сумішшю 95 %  $O_2$  та 5 %  $CO_2$ ; рН підтримували на рівні 7.35–7.4. Після ферментативної обробки ДКГ переносили в середовище для культивування, що складалось із 90 % рідкого середовища DMEM та 10 % інактивованої ембріональної сироватки теляти. До отриманого розчину додавали L-глутамін та гентаміцин у концентраціях 2 мМ та 20 мкг/мл відповідно. Суспензію нейронів отримували за допомогою багаторазового пропускання тканини ферментативно оброблених гангліїв через скляні піпетки, діаметр отвору яких поступово зменшувався. Зразки суспензії перенесли на покривні скельця в чашки Петрі. Краплину суспензії нейронів у чашці Петрі залишали в цілковитому спокої на 5 хв, аби клітини могли прикріпитися до поверхні скельця. Після цього в чашки Петрі вносили 2–3 мл середовища для культивування та вміщували дані чашки в інкубатор з атмосферою, збагаченою  $CO_2$ . Нейрони перебували в інкубаторі від однієї до двох діб при температурі 37 °С. Протягом усього часу культивування в інкубаторі розчин, в якому знаходилися нейрони, насичувався газовою сумішшю (95 %  $O_2$  + 5 %  $CO_2$ ), що забезпечувало підтримання рН на рівні 7.35–7.4.

*Електрофізіологічні дослідження.* Вимірювання іонних струмів проводилося за методом фіксації

потенціалу в режимі відведення від цілої клітини (whole-cell patch-clamp) [6]. Струми, опосередковані активацією рецепторів P2X, викликали прикладанням 10 мкМ аденозинтрифосфату (АТФ) або 100 мкМ  $\alpha, \beta$ -метиленаденозинтрифосфату ( $\alpha, \beta$ -меАТФ) [7], а струми, опосередковані активацією ванілоїдних рецепторів TRPV1, – прикладаннями 500 нМ капсаїцину. Хемоактивовані струми реєстрували в умовах підтримуваного потенціалу –60 мВ. Скляні мікропіпетки заповнювали розчином, що вміщував (у мілімолях на 1 л): KCl – 130, HEPES – 10, BAPTA – 20, АТФ – 4; рН цього розчину доводили до 7.2 за допомогою KOH. Опір таких мікропіпеток становив 2–3 МОм. У разі дослідження ефектів активації натрієвих та калієвих каналів підтримуваний потенціал на мембрані змінювали від –60 до +20 мВ, що забезпечувало отримання даних іонних струмів з амплітудою, близькою до максимальної. Для отримання потенціалзалежних кальцієвих струмів через потенціалкеровані канали використовували наступний протокол. Спочатку мембрану клітини гіперполяризували до –90 мВ на 10 мс; потім підтримуваний потенціал на 20 мс повертали до значення –60 мВ і далі зміщували його до 0 мВ на 50 мс. У таких умовах спостерігалися кальцієві струми з амплітудою, близькою до максимальної. Скляні мікропіпетки в разі відведення кальцієвих струмів заповнювали розчином наступного складу (у мілімолях на 1 л): CsCl – 110,  $MgCl_2$  – 3, етиленгліколететраоцтова кислота (EGTA) – 5, HEPES – 40; рН розчину доводили до 7.2 за допомогою CsOH.

У перебігу дослідження всіх каналів, окрім кальцієвих, використовували зовнішньоклітинний розчин наступного складу (у мілімолях на 1 л): NaCl – 130, KCl – 5,  $MgCl_2$  – 2,  $CaCl_2$  – 2, HEPES – 10; рН розчину доводили до 7.2 за допомогою KOH. У випадку ж вивчення кальцієвих каналів використовували зовнішньоклітинний розчин наступного складу (у мілімолях на 1 л): холіну хлорид – 140,  $CaCl_2$  – 2,  $MgCl_2$  – 2, CsCl – 3, HEPES – 5; рН розчину доводили до 7.35–7.40 за допомогою CsOH [8].

Експерименти проводили в умовах кімнатної температури (20–24 °С). Усі хімічні реактиви, що використовували під час експериментів, були вироблені компанією “Sigma” (США).

ПТ1 був люб’язно наданий для наших досліджень співробітниками лабораторії Московського Інституту біоорганічної хімії ім. акад. М. М. Шемякіна та Ю. А. Овчиннікова РАН (РФ).

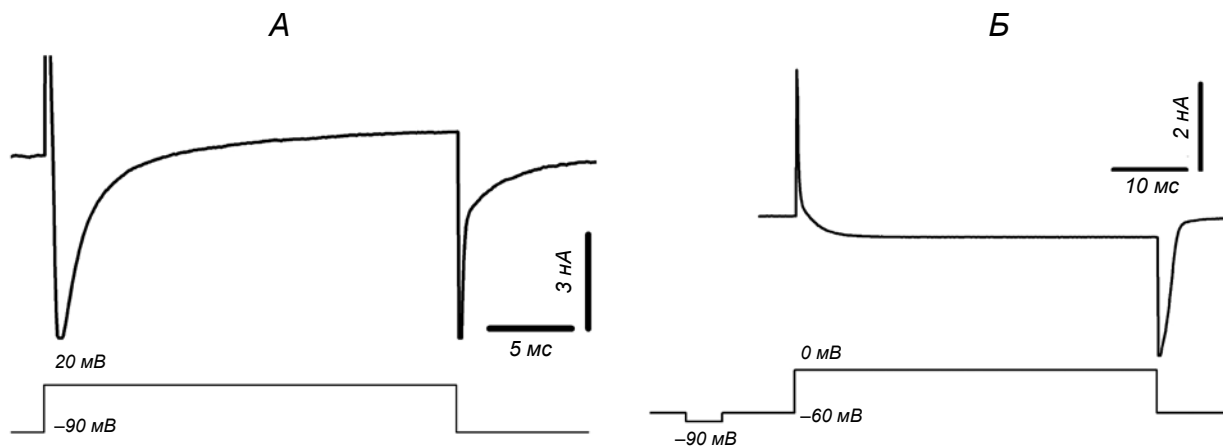


Рис. 1. Потенціалкервані іонні струми в сенсорних нейронах щурів.

А – приклад отримання натрієвих, Б – кальцієвих струмів. Внизу – протоколи прикладання тест-потенціалів.

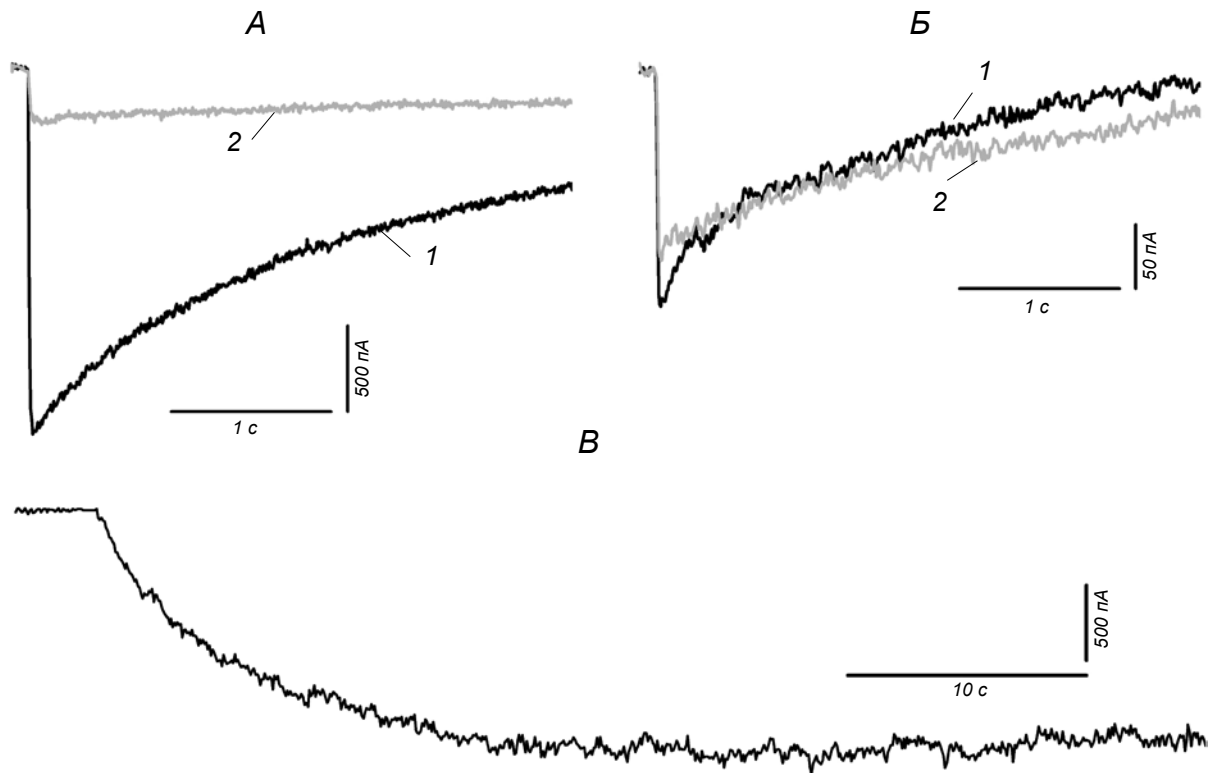
## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Прикладання ПТ1 у концентрації 100 нМ, що є насичуючою стосовно дії на рецептори P2X3 [5], не впливало ніяким чином ані на натрієвий, ані на калієвий компонент потенціалкерваного струму через мембрану нейронів ДКГ ( $n = 7$ ) (рис. 1, А). Відсутність ефекту спостерігалася в усьому діапазоні тестованих потенціалів – від  $-100$  до  $+20$  мВ. Тому в подальших експериментах окреме виділення натрієвого чи калієвого компонента трансмембранних струмів не було необхідним. Так само не спостерігалася жодного ефекту аплікації ПТ1 у концентрації 100 нМ щодо кальцієвих потенціалкерваних струмів ( $n = 9$ ; Б) у всьому діапазоні тестованих потенціалів.

При введенні в позаклітинний розчин капсаїцину в концентрації 500 нМ у досліджених нейронах ДКГ спостерігалися кальцієві струми, що характеризувалися повільною кінетикою. Ані амплітуда, ані кінетика таких струмів (рис. 2, В) не змінювались у разі додавання в позаклітинний розчин 100 нМ ПТ1. Отже, ПТ1 не впливає на хемокеровані кальцієві струми, індуковані активацією ванілоїдних рецепторів TRPV1.

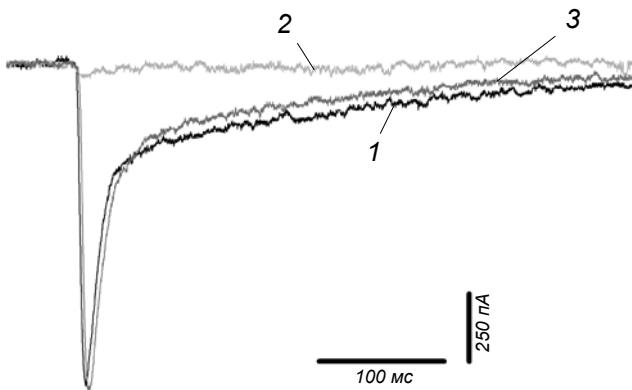
Відомо, що в плазматичних мембранах нейронів ДКГ експресуються АТФ-чутливі рецептор-канальні комплекси трьох типів: гомотримери P2X3 і P2X2, а також гетеротример P2X2/3. Струми, опосередковані роботою цих рецептор-канальних комплексів, істотно розрізняються за своєю кінетикою, а самі рецептори відрізняються один від од-

ного за чутливістю до агоністів. Відомо, що чутливість рецептор-канальних комплексів P2X2/3 до АТФ та  $\alpha, \beta$ -меАТФ знаходиться в межах одного й того ж самого порядку (мікромолі на 1 л), а чутливість рецептор-канальних комплексів P2X2 до цих двох агоністів розрізняється майже на порядок [9]. Рецептор-канальні комплекси P2X2 активуються під дією  $\alpha, \beta$ -меАТФ лише в тому разі, якщо концентрація вказаного агента в позаклітинному розчині перевищує 100 мкМ. Базуючись на такій різній чутливості згаданих рецепторів до агоністів, ми змогли фармакологічно розділити струми, опосередковані роботою рецептор-канальних комплексів P2X2 та P2X2/3. Іонні струми в даних експериментах ми викликали послідовними прикладаннями обох вказаних агоністів в однаковій концентрації (100 мкМ). При цьому спостерігались ефекти двох типів. В одних випадках ( $n = 5$ ) струм, який виникав у відповідь на прикладання АТФ, був значно більшим, ніж струм, викликаний прикладанням  $\alpha, \beta$ -меАТФ. Подібна особливість вказувала на те, що більший вклад в амплітуду індукованого струму вносив компонент, опосередкований рецептор-канальним комплексом P2X2 (рис. 2, А). В інших же випадках відповіді на прикладання 100 мкМ як АТФ, так і  $\alpha, \beta$ -меАТФ були приблизно однаковими. Дана обставина свідчила про те, що більший внесок в амплітуду таких струмів вносив компонент, опосередкований рецептор-канальним комплексом P2X2/3 ( $n = 7$ ; Б). Додавання до позаклітинного розчину ПТ1 у концентрації 100 нМ в обох згаданих випадках не призводило до жодних



**Р и с. 2.** Лігандкервані іонні струми в сенсорних нейронах шурів.

*A* – струм, опосередкований роботою переважно рецептор-каналних комплексів P2X2, *Б* – переважно рецептор-каналних комплексів P2X2/3. *1* – струм, викликаний прикладанням 100 мкМ АТФ, *2* – прикладанням 100 мкМ  $\alpha, \beta$ -метиленаденозинтрифосфату. *В* – струм, опосередкований роботою рецептор-каналних комплексів TRPV1 при введенні в позаклітинний розчин 500 нМ капсаїцину.



**Р и с. 3.** Дія пуротоксину-1 (ПТ1) на струми, опосередковані роботою рецептор-каналних комплексів P2X3.

*1* – активація рецептор-каналних комплексів P2X3 під дією 100 мкМ АТФ; *2* – повне пригнічення виниклого струму при дії ПТ1 при насичуючій концентрації 100 нМ; *3* – після відмивання.

змін в амплітуді чи кінетиці іонних струмів.

Відомо, що швидка кінетика P2X3-опосередкованих струмів значно відрізняється за часовими параметрами від повільної кінетики P2X2/3- та P2X2-опосередкованих струмів. Так, P2X3-опосередковані струми десенситизуються протягом 300–700 мс, у той час як у випадку P2X2/3- та P2X2-опосередкованих струмів цей процес триває більше 1 с. В умовах дії 100 нМ ПТ1 на струми, опосередковані роботою рецептор-каналних комплексів P2X3, спостерігалось прогнозоване цілковите пригнічення таких струмів (повне їх блокування), тобто вказана концентрація (100 нМ) є насичуючою (рис. 3). Отже, з протестованих нами потенціал- та лігандкерваних іонних каналів, експресованих у мембранах нейронів ДКГ шурів, жодні, окрім P2X3, не були чутливими до дії ПТ1 у концентрації 100 нМ. Це свідчить про виключно високу селективність дії ПТ1, ефективного тільки щодо пуринорецепторів підтипу P2X3.

Відомо, що рецептор-канальні комплекси P2X<sub>3</sub>, як і TRPV1, залучені в процеси передачі больових сигналів від периферичних до центральних відділів нервової системи. Селективність ПТ1 щодо лише одного з цих підтипів рецептор-канальних комплексів робить даний пептид перспективним інструментом для виділення пуринергічної больової ланки у соматосенсорній рецепції, дослідження структурно-функціональних особливостей вказаної ланки та навіть пошуку можливих фармакологічних підходів до впливу на неї.

Дотепер не існувало селективних модуляторів, які б дозволили вибірково впливати на один з підтипів родини пуринорецепторів. Таким чином, ПТ1 претендує на роль першої сполуки, що селективно впливає лише на рецептор-канальний комплекс P2X<sub>3</sub>. Можливо, застосування ПТ1 (або його аналогів) дасть змогу вирішити такі питання, як встановлення місця зв'язування даного рецептора з агоністом, роз'яснення механізмів переходу рецептор-канального комплексу з одного функціонального стану в інший та/або визначення кількості функціональних станів.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. D. J. Craik, N. L. Daly, and C. Waine, "The cystine knot motif in toxins and implications for drug design," *Toxicon*, **39**, 43-60 (2001).
2. R. S. Norton and P. K. Pallaghy, "The cystine knot structure of ion channel toxins and related polypeptides," *Toxicon*, **36**, 1573-1583 (1998).
3. N. W. Isaacs, "Cystine knots," *Current Opin. Struct. Biol.*, **5**, 391-395 (1995).
4. A. A. Vassilevski, S. A. Kozlov, and E. V. Grishin, "Molecular diversity of spider venom," *Biochemistry*, **74**, 1505-1534 (2009).
5. E. V. Grishin, G. A. Savchenko, A. A. Vassilevski, et al., "Novel peptide from spider venom inhibits P2X<sub>3</sub> receptors and inflammatory pain," *Ann. Neurol.*, **67**, 680-683 (2010).
6. O. P. Hamill, A. Marty, E. Neher, et al., "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches," *Pflügers Arch.*, **391**, 85-100 (1981).
7. Y. Pankratov, U. V. Lalo, A. N. Dashkin, et al., "Heterogeneity of the functional expression of P2X<sub>3</sub> and P2X<sub>2/3</sub> receptors in the primary nociceptive neurons of rat," *Neurochem. Res.*, **26**, 993-1000 (2001).
8. R. J. Docherty, J. C. Yeats, and A. S. Piper, "Capsazepine block of voltage-activated calcium channels in adult rat dorsal root ganglion neurones in culture," *Br. J. Pharmacol.*, **121**, 1461-1467 (1997).
9. V. Spelta, L. H. Jiang, A. Surprenant, et al., "Kinetics of antagonist actions at rat P2X<sub>2/3</sub> heteromeric receptors," *Br. J. Pharmacol.*, **135**, 1524-1530 (2002).