



УДК 547.993.02 : 595.443.8-114.5.088

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА  
АРГИОПИНА — БЛОКАТОРА ИОННЫХ КАНАЛОВ  
ИЗ ЯДА ПАУКА *ARGIOPE LOBATA*

Гришин Е. В., Волкова Т. М., Арсеньев А. С.,  
Решетова О. С., Оноприенко В. В., Магазаник Л. Г.\*,  
Антонов С. М.\*, Федорова И. М.\*

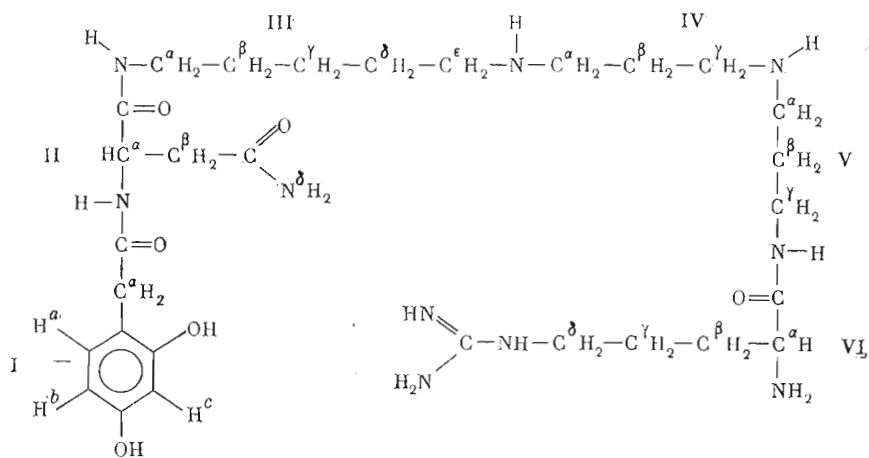
Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР,  
Москва;

\* Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова  
Академии наук СССР, Ленинград

В яде некоторых видов пауков обнаружены компоненты, обладающие весьма специфичным действием на глутаматные рецепторы центральной нервной системы млекопитающих и нервно-мышечной передачи членистоногих [1—3]. Предполагается, что подобные компоненты яда имеют сравнительно небольшую молекулярную массу и блокируют ионные каналы, активируемые глутаматом [4, 5]. Детальное изучение биологического эффекта этих соединений в значительной мере затруднено из-за отсутствия данных о структуре и методе их выделения. Настоящая работа посвящена выделению, определению строения и выяснению механизма действия компонента яда паука *Argiophe lobata*, влияющего на функционирование глутаматных рецепторов.

В результате ряда аналитических экспериментов был разработан следующий метод выделения блокатора глутаматных каналов из яда *A. lobata*. Первоначально раствор цельного яда в воде (0,3 мг/мл) подвергался осаждению этанолом при 60% концентрации спирта. После отделения осадка центрифугированием (10 мин, 5000 об/мин) супернатант концентрировали упариванием на ротаторном испарителе и разделяли с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой на колонке (22,7 × 250 мм) Zorbax C<sub>8</sub> в 0,1% трифторуксусной кислоте в градиенте концентрации ацетонитрила (0—15%) в течение 75 мин при скорости элюции 10 мл/мин. В результате при 5,5% ацетонитрила с выходом ~1% от веса исходного яда был выделен в индивидуальном виде блокатор глутаматных каналов, названный аргиопином.

Биологическую активность цельного яда, хроматографических фракций и выделенного аргиопина исследовали в опытах на глутаматергических синапсах личинки мясной мухи [6]. Цельный яд ( $5 \cdot 10^{-6}$  г/мл) подавлял как секрецию глутамата нервным окончанием, так и амплитуду ответов на кванты глутамата. Спад постсинаптических токов становился двухэкспоненциальным, что свидетельствует о способности яда блокировать ионные каналы, активируемые глутаматом. Аналогичным эффектом на глутаматные каналы обладал индивидуальный аргиопин ( $3 \cdot 10^{-7}$  М). Константа скорости ассоциации молекулы аргиопина с открытым глутаматным каналом равна  $(1,0 \pm 0,2) \cdot 10^8 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ , а константа скорости обратной реакции —  $56 \pm 12 \text{ с}^{-1}$ . Среднее значение константы диссоциации в этих опытах было  $(6,7 \pm 1,5) \cdot 10^{-7} \text{ М}$  (5 опытов). Блокирование открытых глутаматных каналов подтверждается спектральным анализом флуктуаций проводимости, вызванных глутаматом. Постсинаптический блокирующий эффект аргиопина, а также цельного яда был обратимым и устранялся при отмывании препаратов. Качественно подобные эффекты обнаружены при действии аргиопина на холинергическую постсинаптическую мембрану мышцы лягушки. Однако константа диссоциации аргиопина при взаимодей-



Структура аргинина из яда паука *Argiope lobata*

ствии с открытым каналом, активируемым ацетилхолином, была в 36 раз выше —  $(2,4 \pm 0,3) \cdot 10^{-5}$  М (5 опытов).

Очевидно, выделенный аргинин обладает преимущественно блокирующим действием на ионные каналы, активируемые глутаматом, что и придает содержащему его яду *A. lobata* избирательную способность подавлять нервно-мышечную передачу у насекомых.

Строение молекулы аргинина было установлено на основании результатов  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопии, масс-спектроскопии, элементного и аминокислотного анализов. Спектры ЯМР получены на спектрометре WM 500 (Bruker). Спиновые системы протонов, связанных спин-спиновыми взаимодействиями, идентифицировались в двумерном фазоизбирательном спектре  $^1\text{H}$ -ЯМР-корреляционной спектроскопии с двухквантовым фильтром [7]. Масс-спектры были получены методом экстракции ионов при атмосферном давлении (ЭРИАД) или методом электронного удара [8].

Структура аргинина представлена на рисунке. Нетрудно видеть, что в состав его молекулы входят шесть различных фрагментов. По результатам аминокислотного анализа, ЯМР- и масс-спектроскопии в аргинине были идентифицированы остатки аспарагина и аргинина в эквимольном соотношении (фрагменты II и VI, рисунок). При этом спектры  $^1\text{H}$ -ЯМР позволили сделать вывод об amidировании  $\beta$ -карбоксильной группы, а также об участии  $\alpha$ -амино- и  $\alpha$ -карбоксильных групп аспарагина в пептидных связях (таблица). С другой стороны, по данным  $^1\text{H}$ -ЯМР и N-концевого аминокислотного анализа, в остатке аргинина  $\alpha$ -аминогруппа свободна.

Аргинин имеет выраженный максимум поглощения при 279 нм ( $\epsilon$  2827). В ароматической области спектра  $^{13}\text{C}$ -ЯМР наблюдаются сигналы шести углеродных атомов, а в спектре  $^1\text{H}$ -ЯМР присутствуют сигналы трех аро-

Химические сдвиги ( $\delta$ , м. д.) протонов аргинина в воде при pH 3,0 и 32° С

Фрагмент	NH	C $^{\alpha}$ H	C $^{\beta}$ H	Другие протоны
I		3,58; 3,50		H $^a$ 7,10; H $^b$ 6,47; H $^c$ 6,47
II	8,24	4,60	2,79; 2,73	N $^{\delta}$ H $_2$ 7,54; 6,87
III	7,77	3,27; 3,14	1,48; 1,48	C $^{\gamma}$ H $_2$ 1,23; 1,23 C $^{\delta}$ H $_2$ 1,60; 1,60 C $^{\epsilon}$ H $_2$ 2,93; 2,93
IV		3,14; 3,14	2,09; 2,09	C $^{\gamma}$ H $_2$ 3,08; 3,08 NH $_2^+$ 8,5; 8,2
V	8,57	3,40; 3,30	1,94; 1,94	C $^{\gamma}$ H $_2$ 3,10; 3,10
VI		3,99	1,92; 1,92	C $^{\gamma}$ H $_2$ 1,65; 1,65 C $^{\delta}$ H $_2$ 3,23; 3,23 N $^{\epsilon}$ H 7,21 C(NH $_2$ ) $_2^+$ 6,7

матических протонов, из которых  $H^z$  находится в *орто*-положении, а  $H^c$  — в *мета*-положении по отношению к  $H^b$  ( $J_{H^aH^b} = 8,8$ ,  $J_{H^aH^c} \approx 0$ ,  $J_{H^bH^c} = 2,6$  Гц; рисунок, фрагмент I). Между протоном  $H^a$  и двумя протонами  $CH_2$ -группы этого фрагмента наблюдается ядерный эффект Оверхаузера и, следовательно,  $CH_2$ -группа находится в *орто*-положении по отношению к  $H^a$ . В масс-спектрах нативного и метилированного диазометаном аргиопина в условиях электронного удара фрагмент I идентифицирован как амид ароматического дифенола (для нативного аргиопина наблюдается метастабильный переход  $167 \rightarrow 150$ ), что хорошо согласуется с рН-зависимостью химических сдвигов сигналов протонов ароматического кольца при титровании двух ионогенных групп с  $pK \sim 9,3$  и  $\sim 11,2$  и доказывает наличие в этом фрагменте двух гидроксильных групп. Остаток аспарагина образует амидную связь с карбоксильной группой фрагмента I, что подтверждается наличием ядерного эффекта Оверхаузера между протоном NH основной цепи аспарагина и  $CH_2$ -группой фрагмента I.

Молекулярная масса аргиопина, по данным ЭРИАД, равна 636. С учетом структуры фрагментов I, II и VI, а также по результатам элементного анализа его эмпирическая формула  $C_{29}H_{52}N_{10}O_6$ . Следовательно, три оставшихся фрагмента должны обладать молекулярной массой 214 и иметь формулу  $C_{11}H_{26}N_4$ . В спектре  $^1H$ -ЯМР аргиопина идентифицированы спиновые системы протонов (таблица), доказывающие наличие фрагментов  $NH(CH_2)_5$  (III),  $(CH_2)_3$  (IV) и  $NH(CH_2)_3$  (V), причем сигналы протонов фрагментов III и V свидетельствуют об участии NH-групп в амидных связях. Существование фрагментов I—VI убедительно подтверждается также данными  $^{13}C$ -ЯМР-спектра, в котором наблюдаются сигналы 18 алифатических и 6 ароматических углеродных атомов, а также сигналы углеродов одной гуанидиновой и четырех карбонильных групп. Между протонами NH фрагмента V и протонами ( $C^{\alpha}H$ ,  $C^{\beta}H_2$ ) остатка аргинина наблюдается ядерный эффект Оверхаузера, что доказывает существование между ними пептидной связи. С другой стороны, по данным  $^1H$ -ЯМР, фрагмент III образует пептидную связь с остатком аспарагина. Оставшийся фрагмент IV должен быть соединен с фрагментами III и V посредством двух NH-групп (рисунок). Эти группы при рН 3 протонированы и дают в спектре  $^1H$ -ЯМР два широких сигнала при 8,2 и 8,5 м. д. с интенсивностью  $\sim 2$  протонных единиц каждая, и при их титровании (рН 8—8) наблюдается сдвиг в сторону сильного поля сигналов протонов  $C^{\delta}H_2$  и  $C^{\epsilon}H_2$  фрагмента III,  $C^{\beta}H_2$  и  $C^{\gamma}H_2$  фрагмента V и всех протонов фрагмента IV.

Таким образом, на основании всех вышеперечисленных данных удалось расшифровать химическую структуру блокатора глутаматных каналов, выделенного из яда паука *A. lobata* (рисунок). Интересно, что в состав молекулы аргиопина входят 2,4-диоксифенилуксусная кислота и полиамин, не характерные для известных соединений природного происхождения. С целью изучения связи между структурой и функцией в настоящее время осуществляется химический синтез аргиопина.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Kawai N., Niwa A., Abe T. Brain Res., 1982, v. 247, № 1, p. 169—171.
2. Tashmukhamedov B. A., Usmanov P. B., Kasakov I., Kalikulov D., Yukelson L. Ya., Atakuziev B. U. In: Toxins as tools in neurochemistry. Berlin: Walter de Gruyther, 1983, p. 312—323.
3. Usherwood P. N. R., Duce I. R., Boden P. J. J. physiol. (France), 1984, v. 79, № 4, p. 241—245.
4. Kawai N., Niwa A., Saito M., Pan-Hou H. S., Yoshioka M. J. physiol. (France), 1984, v. 79, № 4, p. 228—331.
5. Bateman A., Boden P., Dell A., Duce I. R., Quicke D. L. J., Usherwood P. N. R. Brain Res., 1985, v. 339, № 2, p. 237—244.
6. Магазаник Л. Г., Антонов С. М., Гмуро В. Е. Биол. мембраны, 1984, т. 1, № 2, с. 130—140.
7. Rance M., Sorensen O. W., Bodenhausen G., Wagner G., Ernst R. R., Wöthrich K. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1983, v. 117, № 2, p. 479—485.
8. Александров М. Л., Галль Л. Н., Краснов М. В., Николаев В. И., Павленко В. А., Шкуров В. А. Докл. АН СССР, 1984, т. 277, № 2, с. 379—383.

Поступило в редакцию  
10.III.1986

STRUCTURE-FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF ARGIOPINE-AN ION  
CHANNEL BLOCKER FROM THE VENOM OF SPIDER *ARGIOPE LOBATA*

GRISHIN E. V., VOLKOVA T. M., ARSENIYEV A. S., RESHETOVA O. S.,  
ONOPRIENKO V. V., MAGAZANIC L. G.\*, ANTONOV S. M.\*, FEDOROVA 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*

Argiopine, a compound capable of blocking the glutamate-activated ion channels in experiments with glutamatergic synapses of blowfly larvae, was isolated from the venom of spider *Argiope lobata*. Argiopine-receptor complex has  $K_D$   $6,7 \cdot 10^{-7}$  M. The venom solution was treated with 60% ethanol, centrifuged and supernatant was subjected to reversed-phase HPLC in the acetonitrile concentration gradient. Argiopine structure was established using  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy, mass spectrometry, elemental and amino acid analyses. Argiopine (molecular mass 636) consists of arginine (free  $\alpha\text{-NH}_2$ ) linked with polyamine  $\text{—NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{NH—}$  through a peptide bond. The polyamine is connected to the  $\alpha$ -carboxyl group of asparagine whose  $\alpha$ -amino group is linked to 2,4-dihydroxyphenylacetic acid.