



УДК 577.175.829'17

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЦИКЛИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ ВЕЩЕСТВА P С МЕМБРАНАМИ МОЗГА КРЫСЫ

*Лазакевич Е. М., Мутуле И. Э.\*, Уткин Ю. Н.,  
Цетлин В. И.*

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

*\*Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига*

Исследовано ингибирование связывания радиоактивного производного вещества P с мембранами мозга крысы его циклическими аналогами. Для наиболее активного циклоаполога определена константа ингибирования, равная 3 мкМ.

Из всех обнаруженных к настоящему времени в центральной нервной системе пептидов ундекапептид Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> — вещество P (SP) является одним из наиболее вероятных кандидатов на роль пептидного нейротрансмиттера [1]. Для него обнаружено наличие специфического связывания с различными препаратами мозга млекопитающих [2—4]. Кроме того, показано, что это соединение взаимодействует с модельными фосфолипидными мембранами [5]. По данным КД [6], SP в присутствии фосфолипидных мицелл приобретает упорядоченную структуру предположительно  $\alpha$ -спирального типа. Аналогичные изменения в спектрах КД SP вызывает замена воды на метанол [7]. Изучение SP методом ЯМР [7] в воде не обнаружило формирования упорядоченной структуры, в то же время в метаноле происходит образование  $\alpha$ -спирали в области Pro-Gln-Gln-Phe-Phe (4—8-й остатки). При этом наблюдается взаимодействие C-концевого карбоксида с амидами обоих остатков глутамина, а N-концевой фрагмент (аминокислотные остатки 1—3) сохраняет подвижность. Можно предположить, что некая упорядоченная конформация SP, возможно подобная обнаруженной методом ЯМР, реализуется на мембране и является существенной для узнавания специфического рецепторного участка.

Ингибирование связывания <sup>125</sup>I-BHSP (1 нМ) с мембранами мозга циклическими аналогами вещества P

Номер соединения	Аналог SP	Концентрация пептида в пробе, мкМ	Ингибирование связывания <sup>125</sup> I-SP, %
1	H-Lys-Gln <sub>2</sub> -Phe <sub>2</sub> -Gly-Leu-Met—  —————	15	0
2	H-Glu-Phe <sub>2</sub> -Gly-Leu-Met—  —NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH—	15	13
3	H-Glu-Phe <sub>2</sub> -Gly-Leu-Met—  —NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> NH—	15	20
4	H-Glu-Phe <sub>2</sub> -Gly-Leu-Met—  —NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> NH—	10	5
5	H-Glu-Phe <sub>2</sub> -Gly-Leu-Met—  —NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NH—	11.5	10
	SP	15	96

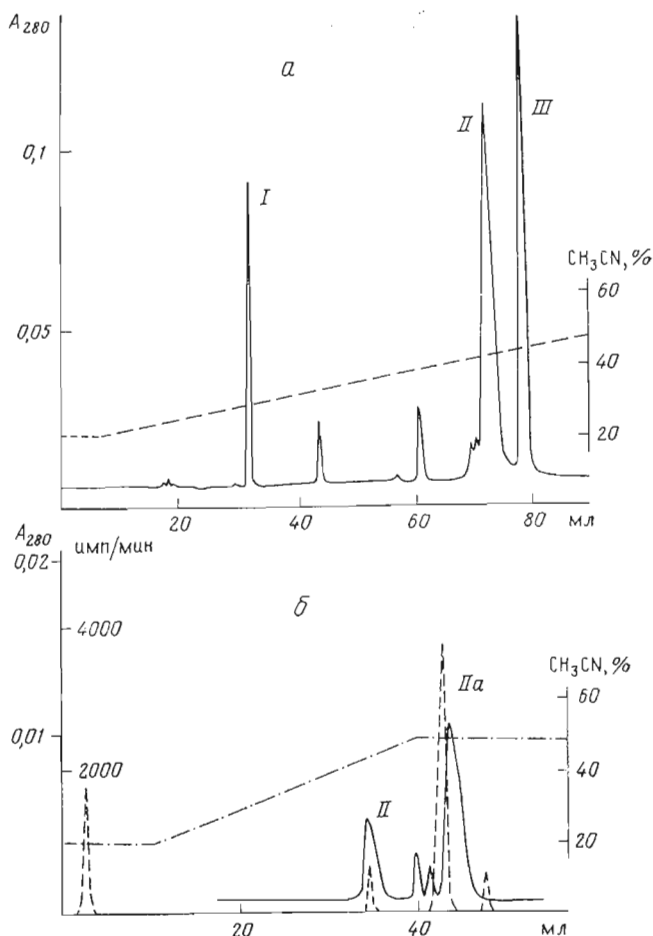
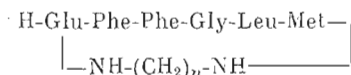


Рис. 1. Разделение продуктов модификации SP N-оксисукцинимидным эфиром 3-(4-гидроксифенил)пропионовой кислоты (а) и продуктов нодиревания фракции II (б) на Ultrasphere ODS в градиенте ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте. Скорость элюции 3 (а) и 1 мл/мин (б). б — объем фракции 460 мкл, штриховой линией обозначена радиоактивность аликвот объемом по 10 мкл

Фиксация такой «биологически активной» конформации биорегулятора за счет образования цикла может привести к созданию веществ, имеющих ряд интересных свойств. Так, циклические аналоги SP могут оказаться более устойчивыми к действию протеолитических ферментов. Кроме того, они могут обладать селективной или «сверхвысокой» активностью.

Для проверки этой гипотезы нами исследована способность различных циклических аналогов SP ингибировать связывание  $^{125}\text{I}$ -меченого производного SP с мембранами мозга крысы. Выбор структуры аналогов (таблица) обосновывался данными КД [6], ЯМР [7] и полуэмпирического расчета третичной структуры [8]. Кроме того, по-видимому, в соединениях типа



где  $n = 3-10, 12$

ограничение подвижности функционально важного участка SP-фрагмента 6—11 [9, 10] за счет циклизации сопровождается минимальным изменением его конформации [11].

В качестве радиоактивного лиганда использовали  $^{125}\text{I}$ -производное SP, синтез которого проводили в две стадии. На первой стадии в результате реакции SP с N-оксисукцинимидным эфиром 3-(4-гидроксифенил)пропионовой кислоты и разделения продуктов методом ВЭЖХ (рис. 1а) по-

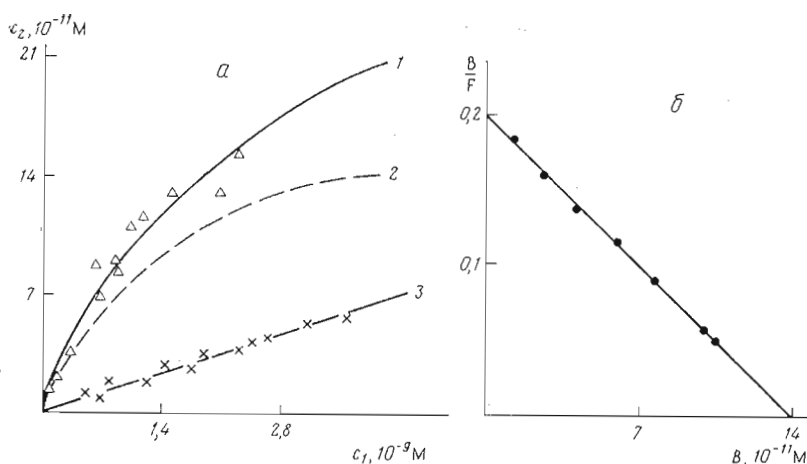


Рис. 2. Связывание  $^{125}\text{I}$ -SP с мембранами мозга крысы (а) и анализ связывания по Скэтчарду (б). 1 — общее, 2 — специфическое, 3 — неспецифическое связывание.  $c_1$  — концентрация добавленного  $^{125}\text{I}$ -SP,  $c_2$  — концентрация связанного  $^{125}\text{I}$ -SP, B и F — концентрации связанного и свободного лиганда соответственно

лучены два производных (фракции II и III), содержащих гидроксифенилпропионильные группы. Производное (II) имеет свободную N-концевую  $\alpha$ -амилогруппу по данным N-концевого анализа и, следовательно, содержит гидроксифенилпропионильную группу на остатке Lys. Производное (III) не имеет свободных аминогрупп и является, таким образом, диметиленным аналогом SP. Производное (II) иодировали хлораминным методом с использованием  $\text{Na}^{125}\text{I}$ , восстанавливали  $\beta$ -меркаптоэтанолом [12] и продукты разделяли методом ВЭЖХ (рис. 1б). Для идентификации продуктов аналогичную реакцию проводили с нерадиоактивным  $\text{NaI}$ . По данным УФ-спектроскопии, фракция IIa (рис. 1б) представляет собой моноиодпроизводное гидроксифенилпропионил-SP. Как видно из рис. 1, пик основной радиоактивности по месту выхода практически совпадает с моноиодпроизводным и, следовательно, является [ $^{125}\text{I}$ ]-иодгидроксифенилпропионилпроизводным SP ( $^{125}\text{I}$ -SP). Такой вариант синтеза позволил получить гомогенный продукт, обладающий высокой удельной активностью ( $> 1000$  Ки/ммоль).

Анализ связывания  $^{125}\text{I}$ -SP с мембранами мозга крысы (рис. 2) выявил наличие специфического насыщаемого связывания, характеризуемого  $K_d$  0,7 нМ максимальным числом участков связывания 60 фмоль/мг белка. Полученные результаты хорошо согласуются с имеющимися в литературе данными [2].

Для определения активности циклических аналогов связывание  $^{125}\text{I}$ -SP с мембранами проводили в присутствии большого избытка исследуемого аналога (10 мкМ). Одно из соединений (1) оказалось неактивным, а у четырех аналогов (3—5) наблюдалось слабое ингибирование связывания  $^{125}\text{I}$ -SP (таблица). Для наиболее активного из них (3) построена кривая вытеснения (рис. 3).  $\text{IC}_{50}^*$  для этого аналога составляет 3 мкМ, что примерно на четыре порядка выше  $\text{IC}_{50}$  для SP. Близкие нашим величины  $\text{IC}_{50}$  были получены при исследовании укороченных циклических аналогов SP, содержащих дисульфидную связь между введенными в молекулу остатками Cys<sup>5</sup> и Cys<sup>11</sup> или Cys<sup>6</sup> и Cys<sup>11</sup> [13]. Таким образом, химическая природа связи, замыкающей цикл, не существенна для активности циклического аналога. Одним из объяснений низкой активности укороченных циклических аналогов при взаимодействии с мембранами мозга может быть отсутствие N-концевого фрагмента молекулы. Это предположение подтверждается низкой активностью линейных укороченных аналогов SP при ингибировании ими связывания SP с мембранами мозга [14]. Интересно

\*  $\text{IC}_{50}$  — концентрации 50% ингибирования.

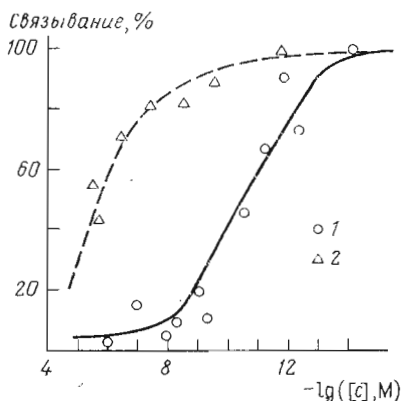


Рис. 3. Ингибирование связывания  $^{125}\text{I}$ -SP с мембранами мозга крысы веществом P (1) и циклическим аналогом 3 (2). По оси ординат дан процент связанного  $^{125}\text{I}$ -SP,  $c$  — концентрация пептидов

также отметить, что в центральной нервной системе обнаружено существование нескольких типов рецепторов тахикининов [14, 15], средство SP<sup>1</sup> к которым различается на несколько порядков. Возможно, образование цикла стабилизирует конформацию вещества P, имеющую высокое сродство к такому типу рецепторов, с которым оно взаимодействует с низкой эффективностью. Ответ на этот вопрос могло бы дать исследование ингибирования связывания других тахикининов циклоаналогами SP.

### Экспериментальная часть

В работе использованы следующие реактивы: SP (Serva, ФРГ), Trizma Base, бацитрацин, лейпептин, бычий сывороточный альбумин (БСА) и дезоксихолат натрия (Sigma, США) полиэтиленглимин и EDTA (Fluka, Швейцария), фенолметилсульфонилфторид (PMSF) (Calbiochem, США),  $\text{Na}^{125}\text{I}$  («Изотоп», СССР). Циклические аналоги SP были синтезированы по известной методике [11].

**Синтез  $^{125}\text{I}$ -SP.** К раствору 2 мг (1,5 мкмоль) SP в 500 мкл 0,05 М натрий-боратного буфера (pH 8,5) добавляли 0,4 мг (1,5 мкмоль) N-оксисукцинимидного эфира 3-(4-гидроксифенил)пропионовой кислоты. После перемешивания в течение 18 ч добавляли 160 мкл уксусной кислоты для растворения образовавшегося осадка и производные разделяли на колонке (10 × 250 мм) Ultrasphere ODS в градиенте ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте (рис. 1а). Получали 0,8 мг (0,6 мкмоль, 40%) производного (II). Для синтеза радиоактивного аналога к раствору 22,5 мкг (17 нмоль) полученного производного (II) в 25 мкл 0,1% трифторуксусной кислоты добавляли 20 мкл 0,5 М натрий-фосфатного буфера (pH 7,0), 5 мкл (20 МБк)  $\text{Na}^{125}\text{I}$  и раствор 25 мкг (89 нмоль) хлорамина T в 12,5 мкл 0,1 М натрий-фосфатного буфера (pH 7,0). Через 2 мин добавляли раствор 25 мкг (113 нмоль) метабисульфита калия в 12,5 мкл 0,1 М натрий-фосфатного буфера (pH 7,5), 5 мкл 33% уксусной кислоты и 25 мкл меркаптоэтанола. После инкубации в течение 1,5 ч при 80° С меченое производное выделяли хроматографией на Ultrasphere ODS (4,6 × 200 мм) в градиенте ацетонитрила (рис. 1б).

**Выделение мембран из мозга крыс.** Мембраны из мозга крыс выделяли по методике [16] с некоторыми модификациями, которые касались в основном условий гомогенизации и лизиса. Мозг 6—10 крыс гомогенизировали в Potter S (В. Braun, ФРГ; 3 раза по 5 качаний при 750 об/мин) при 4° С с 10 объемами 1 мМ натрий-фосфатного буфера (pH 7,5), содержащего 0,32 М сахарозу, 0,1 мМ EDTA и 0,1 мМ PMSF. Гомогенат центрифугировали 10 мин при 1000 g, осадок суспендировали в 10-кратном объеме буфера и повторно центрифугировали в тех же условиях. Супернатанты объединяли и центрифугировали 40 мин при 17 000 g. Осадок суспендировали в 4-кратном (по отношению к объему мембран) объеме 5 мМ трис-HCl-буфера (pH 8,0) и образовавшуюся суспензию перемешивали 1,5 ч при 0° С. Затем доводили концентрацию сахарозы в суспензии до 34% и центрифугировали в ступенчатом градиенте сахарозы (34; 28,5; 10%) 90 мин при 80 000g (ротор SW 27; Beckman, США). Мембраны на границе 28,5 — 34% сахарозы собирали, разбавляли 3-кратным объемом 5 мМ трис-HCl-буфера (pH 8,0) и центрифугировали 40 мин при 40 000g. Осадок суспендировали в 5 мМ трис-HCl-буфере (pH 8,0), замораживали и хранили при -70° С.

Содержание белка в мембранах определяли по модифицированной методике Лоури [17].

**Связывание  $^{125}\text{I}$ -SP с мембранами мозга крыс** проводили в течение 30 мин при 20° С с 200 мкл суспензии мембран (2,5 мг белка/мл) в 0,05 М трис-HCl-буфере (pH 7,5), содержащем 3 мМ  $\text{MnCl}_2$ , 0,5 мМ PMSF, БСА (200 мкг/мл), лейпептин (4 мкг/мл) и бацитрацин (40 мкг/мл) (буфер А). Затем мембраны отделяли на фильтрах G/F (Whatman, Великобритания), предварительно выдержанных в течение 18 ч в 0,25% полиэтиленглимине при 4° С, и промывали осадок 4 раза 3 мл холодного 0,05 М трис-HCl-буфера (pH 7,5), содержащего 3 мМ  $\text{MnCl}_2$ . Для определения неспецифического связывания в инкубационную смесь добавляли SP до концентрации 5 мкМ.

Ингибирование связывания SP циклическими аналогами. Мембраны в буфере А инкубировали с  $^{125}\text{I}$ -SP (1 нМ) в присутствии циклических аналогов в различных концентрациях. После фильтрования и промывок определяли радиоактивность, оставшуюся на фильтре. Каждое измерение проводили дважды.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Pernow B. // Pharmacol. Rev. 1983. V. 35. № 2. P. 85—141.
2. Hanley M. R., Sandberg B. E. B., Lee C. M., Iversen L. L., Brundish D. E., Waide R. // Nature. 1980. V. 286. № 5775. P. 810—812.
3. Quirion R., Dam T. V. // Neuropeptides. 1985. V. 6. № 3. P. 191—204.
4. Payan D. G., McGillis I. P., Organist M. L. // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. № 30. P. 14321—14329.
5. Lembeck F., Saria A., Mayer N. // Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 1979. V. 306. P. 189—194.
6. Wolley G. A., Deber Ch. M. // Peptides 1986/Ed. Theodoropoulos D. Berlin: Walter de Gruyter. In Press.
7. Chassaing G., Convert O., Lavielle S. // Eur. J. Biochem. 1986. V. 154. № 1. P. 77—85.
8. Никифорович Г. В., Балодис Ю. Ю., Чипенс Г. И. // Биооргани. химия. 1981. Т. 7. № 5. С. 645—654.
9. Blumberg S., Teichberg V. J. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1979. V. 90. № 1. P. 347—354.
10. Brown C. L., Hanley M. R. // Brit. J. Pharmacol. 1981. V. 73. № 6. P. 517—523.
11. Мутулис Ф. К., Мутуле И. Э., Мауронс Г. Х., Секацис И. П., Григорьева В. Д., Кукайн Э. М., Голубева В. В., Мышлякова Н. В., Клауша В. Е., Чипенс Г. И. // Биооргани. химия. 1985. Т. 11. № 9. С. 1276—1278.
12. Floor E., Leeman S. E. // Anal. Biochem. 1980. V. 101. № 2. P. 498—503.
13. Darman P. S., Landlis G. S., Smits J. R., Nirning L. D., Gulya K., Yamamura H. J., Burks T. F., Hruby V. J. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1985. V. 127. № 2. P. 656—662.
14. Cascieri M. A., Chicchi G. G., Liang T. // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. № 3. P. 1501—1507.
15. Quirion R. // Trends Neurosci. 1985. V. 8. № 5. P. 183—185.
16. Cascieri M. A., Liang T. // J. Biol. Chem. 1983. V. 258. № 8. P. 5158—5164.
17. Peterson G. L. // Anal. Biochem. 1977. V. 83. № 2. P. 346—356.

Поступила в редакцию  
15.VII.1987

#### INTERACTION OF CYCLIC ANALOGUES OF SUBSTANCE P WITH RAT BRAIN MEMBRANES

LAZAKOVICH E. M., MUTULE I. E.\*, UTKIN Yu. N., TSETLIN V. I.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow; \* Institute of Organic Synthesis, Academy of Sciences of the Latvian SSR, Riga*

Inhibition of binding of a substance P radioactive derivative with rat brain membranes by cyclic analogues of substance P was studied. The most active cyclic analogue had the inhibition constant 3 nM.