



УДК 541.124:546.11.2

ИССЛЕДОВАНИЕ ТВЕРДОФАЗНОГО КАТАЛИТИЧЕСКОГО ИЗОТОПНОГО ОБМЕНА ВОДОРОДА В α -КОНОТОКСИНЕ G1 ПОД ДЕЙСТВИЕМ СПИЛЛОВЕР-ТРИТИЯ

© 2000 г. Ю. А. Золотарев[#], Э. В. Бочаров*, А. К. Дадаян, И. Е. Кашеверов*, М. Н. Жмак*, И. В. Масленников*, Ю. А. Борисов**, А. С. Арсеньев*, Н. Ф. Мясоедов, В. И. Цетлин*

Институт молекулярной генетики РАН, 123182, Москва, пл. Акад. Курчатова, 2;

*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН;

**Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН

Поступила в редакцию 28.01.2000 г. Принята к печати 15.03.2000 г.

В результате реакции высокотемпературного твердофазного каталитического изотопного обмена водорода (ВТКИО) получен меченный тритием α -конотоксин G1 с молярной радиоактивностью 35 Ки/ммоль и полным сохранением биологической активности, проанализированной по связыванию с никотиновым ацетилхолиновым рецептором. С помощью спектроскопии ^3H -ЯМР установлено распределение трития в молекуле и показано, что включение происходит во все остатки, за исключением фрагмента Asn4-Pro5-Ala6. На основании данных о сравнительной реакционной способности C–H-связей, *ab initio*-квантово-химических расчетов реакции обмена водорода, а также сведений о пространственной структуре α -конотоксина G1 в растворе и кристалле показано, что увеличение реакционной способности атомов H вызвано их взаимодействием с электронодонорными атомами O и N пептида в переходном состоянии реакции ВТКИО. Уменьшение же скорости реакции обмена может быть обусловлено как малой пространственной доступностью C–H-связей, так и ограниченной подвижностью фрагмента пептидной цепи, которому они принадлежат.

Ключевые слова: конотоксины, связывание с рецепторами; изотопный обмен водорода, спилловер-водород; квантово-химический расчет; ЯМР тритиевый.

ВВЕДЕНИЕ

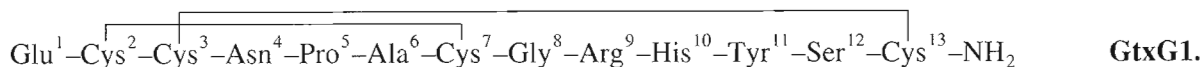
Успех в исследовании процессов, происходящих в живой клетке, во многом определяется наличием соответствующих меченых препаратов. Особый интерес для исследования взаимодействия с клеточными рецепторами представляют меченные тритием соединения. Аминокислоты и пептиды, меченные тритием, получают, в основном, каталитическим гидрогенолизом газообразным тритием в растворе ненасыщенных или галогенсодержащих соединений-предшественников [1, 2]. В случае пептидов этим методом можно получить главным образом препараты, содержащие метку в тирозиновых остатках, осуществляя дегалогенирование соответствующих диодитирозиновых производных. Другие известные методы каталитического гидрогенолиза в растворе не позволяют достичь

высокой молярной радиоактивности меченных тритием аминокислот и пептидов.

В отсутствие растворителя, на нанесенных на носитель катализаторах платиновой группы, таких, например, как палладий на сульфате бария, палладий на окиси алюминия, водородные атомы, связанные с поверхностными атомами металла, могут мигрировать на носитель. Этот эффект был назван спилловером водорода [3]. В предложенной нами реакции высокотемпературного твердофазного каталитического изотопного обмена (ВТКИО) [4] интенсивный изотопный обмен между атомами водорода твердого органического соединения и спилловер-тритием происходит в системе, образованной высокодисперсным металлом платиновой группы, твердым органическим веществом и неорганическим носителем. Эта реакция происходит с сохранением конфигурации асимметрических углеродных атомов и позволяет получать высокомеченные тритием пептиды и белки [5, 6]. Экспериментально было показано, что в основе реакции ВТКИО лежит явление спилловера водорода [7]. В данном сообщении исследуется реакция ВТКИО водорода в α -конотоксине G1 (CtxG1) под действием спилловер-трития.

Сокращения: СВ – спилловер-водород; ВТКИО – высокотемпературный твердофазный каталитический изотопный обмен; CtxG1 – α -конотоксин G1; [^3H]CtxG1 – [^3H]-меченый CtxG1; [^{125}I]CtxG1 – ^{125}I -меченый CtxG1; AChR – ацетилхолиновый рецептор.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 196-02-13; факс: +7(095) 196-02-21; e-mail: zolya@img.ras.ru).



Выбор этого пептида обусловлен тем, что α -конотоксины – эффективные блокаторы никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (AChR) [8] и их радиоактивно меченные производные необходимы для исследования этих рецепторов. С другой стороны, для CtxG1 известны пространственные структуры высокого разрешения в растворе и кристалле [9, 10], что позволяет изучать механизм реакции ВТКИО в полипептидах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исходя из синтетического CtxG1, твердофазным каталитическим изотопным обменом с газообразным тритием при 140°C был получен [^3H]- α -конотоксин G1 ([^3H]CtxG1). Для [^3H]CtxG1 из данных ^1H -ЯМР (спектр не приводится) определена степень замещения на тритий водорода при C2 в остатке His10, составляющая 57%. Как следует из данных по распределению изотопной метки в [^3H]CtxG1, полученных с помощью ^3H -ЯМР (таблица, рис. 1), в этом положении находится 47% всего трития, включенного в молекулу пептида. Из величины средней степени замещения водорода на тритий при C2 и доли трития, находящегося в этом положении, рассчитана молярная радиоактивность [^3H]CtxG1, составляющая 35.5 Ки/ммоль. Молярная радиоактивность [^3H]CtxG1, определенная из сопоставления данных ВЭЖХ и жидкостного скинтилляционного счета, составляла 35 Ки/ммоль, что хорошо соответствует результатам, полученным с помощью ЯМР.

Химические сдвиги сигналов в ^3H -ЯМР-спектре меченого тритием CtxG1 (см. рис. 1), их относительная интегральная интенсивность и отнесение

δ , м. д.	Доля тритиевой метки, %*	Отнесение сигнала
2.18	3.33	$\text{C}^\gamma\text{H}_2$ Glu1
4.60	6.80	C^αH Cys2
4.65	8.93	C^αH Cys3
4.48	7.80	C^αH Cys7
3.78, 4.03	2.61	C^αH Gly8
1.25	1.64	$\text{C}^\gamma\text{H}_2$ Arg9
7.70	46.57	$\text{C}2\text{H}$ His10
4.73	3.99	C^αH His10
6.77	1.36	$\text{C}3\text{H}, \text{C}5\text{H}$ Tyr11
2.88	2.72	C^βH_2 Tyr11
4.34	3.55	C^αH Ser12
4.63	8.92	C^αH Cys13

* Рассчитано по относительной интегральной интенсивности соответствующих сигналов.

Достигнутые уровни включения трития вполне достаточны для использования полученного препарата в исследовании биологической мишени G1 – никотиновых AChR мышечного типа. Меченный тритием препарат сохранил биологическую активность, что подтверждается данными по его связыванию с рецептором. На рис. 2а, 2б представлены кривые специфического связывания [^3H]CtxG1 и [^{125}I]- α -конотоксина G1 ([^{125}I]CtxG1, [11]) с мембранными препаратами AChR из электрического органа ската *Torpedo californica*. Меченые препараты имеют сходный характер взаимодействия с рецептором и близкие величины K_d , составляющие около 66 нМ для [^3H]CtxG1 и 59 нМ для [^{125}I]CtxG1. Замещение водорода в биологически активном соединении на тритий предпочтительнее введения иода, так как при этом практически не изменяются его физико-химические свойства.

Известно, что твердофазный изотопный обмен со спилловер-водородом (СВ) во всех свободных аминокислотах происходит с соизмеримой скоростью [12]. При твердофазном изотопном обмене в β -глюкозидазе – белке с молекулярной массой 86 кДа, включение трития во все типы аминокислотных остатков происходит также с соизмеримой скоростью [5]. Поэтому мы могли ожидать, что произойдет включение трития во все остатки G1. Однако, как видно из таблицы, замещение водорода на тритий произошло в 10 из 13 а. о. этого пептида, т.е. изотопный обмен не наблюдался в остатках Asn4-Pro5-Ala6. Пониженная реакционная способность этих остатков, вероятно, связана с особенностями пространственной структуры CtxG1. Характер распределения изотопной метки в пептидной цепи, по-видимому, определяется реакционной способностью С–Н-связей аминокислотных остатков и доступностью этих связей для СВ. В частности, можно ожидать, что тритий не будет включаться в остатки, недоступные для СВ.

В свободном пролине твердофазный изотопный обмен происходит преимущественно (~80%) при C^δ -атоме [12]. В CtxG1 $\text{C}^\delta\text{H}_2$ -атомы Pro5 экранированы (растворителю доступно около 50% площади ван-дер-ваальсовой поверхности этих атомов). По-видимому, это объясняет отсутствие трития в данном остатке. Низкая реакционная способность наблюдается и в случае Asn4, что также объясняется низкой экспонированностью C^αH - и C^βH -протонов этого остатка (доступность соответственно ~50 и ~10%).

При ВТКИО свободного аланина наибольшей реакционной способностью обладают Н-атомы метильной группы (доля атомов трития составля-

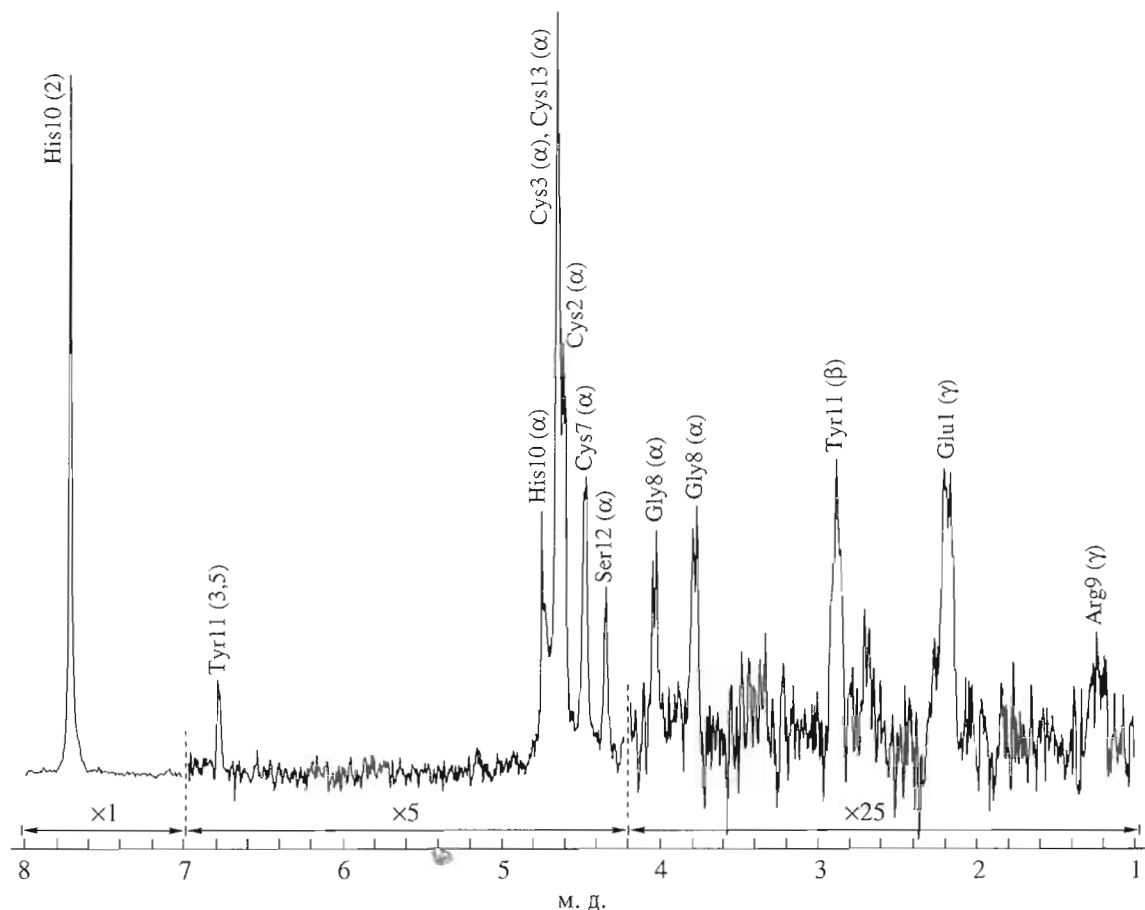


Рис. 1. Участки ^3H -ЯМР-спектра (640 МГц) меченого тритием CtxG1 (D_2O , pH 7.5, 30°C). Интенсивность сигналов на участках 7.0–4.2 и 4.2–1.0 м. д. увеличена в 5 и 25 раз соответственно. Показано отнесение сигналов (см. также таблицу).

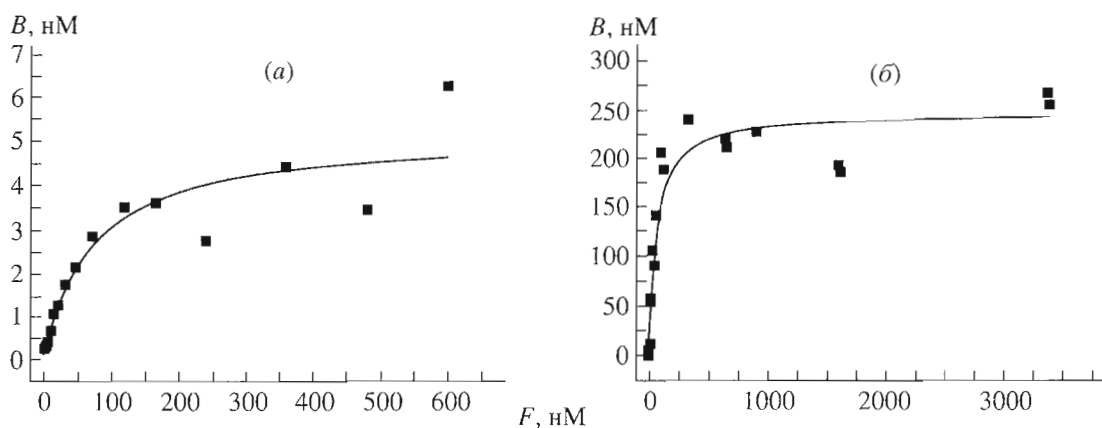


Рис. 2. Концентрационная зависимость специфического связывания на обогащенных AChR мембранных препаратах электрического органа *Torpedo californica* [^3H]CtxG1 (а) и [^{125}I]CtxG1 (б). F и B – концентрация свободного и специфически связанного лиганда.

ет 96%) [12]. Согласно данным ^1H -ЯМР в растворе [9] и рентгеноструктурного анализа [10], метильная группа остатка Ala6 полностью доступна, но включение трития в эту группу тем не менее не происходит (см. таблицу). Это означает, что до-

ступность той или иной группировки пептида является необходимым, но не достаточным условием для протекания реакции ВТКИО.

Для выяснения причины пониженной реакционной способности метильной группировки Ala6

методом Хартри–Фока [13] проведено *ab initio*-квантово-химическое моделирование реакции изотопного обмена. Согласно данным ^1H -ЯМР, участок Asn4-Cys7 в отличие от остальной части молекулы CtxG1 имеет жесткую конформацию [9]. Это позволило зафиксировать геометрию тяжелых атомов основной цепи модельного фрагмента $\text{CH}_3\text{-C(O)-NH-C}^\alpha\text{H(CH}_3\text{)-C(O)-NH}_2$ в соответствии с конформацией участка Pro5-Ala6-Cys7 CtxG1, описанной в работе [9]. При расчете геометрических параметров переходного состояния модельного фрагмента геометрия остальной части реакционного комплекса была полностью оптимизирована.

Рассчитанная энергия активации ($E_{\text{акт}}$) для реакции обмена водорода при C^β -атоме в остатке Ala составила 33.7 ккал/моль. Для сравнения, расчетная $E_{\text{акт}}$ изотопного обмена в свободном аланине составляет 16.6 и 27.2 ккал/моль для C^βH_3 и C^αH , соответственно. Пониженная $E_{\text{акт}}$ для обмена C^βH в свободном аланине связана с участием в переходном состоянии карбонильного кислорода; при этом расстояние между карбонильным атомом O и обменивающимися атомами H^β составляет всего 2.16 Å [14]. Такая стабилизация переходного состояния на электронодонорных атомах O и N не реализуется для C^αH свободного аланина. В случае CtxG1 высокая энергия активации обмена водорода в метильной группировке Ala6 связана с тем, что жесткая конформация этого участка пептида не позволяет реализовать взаимодействие карбонильного атома O с H^β в переходном состоянии (расстояние между O и H^β составляет 3.9 Å). Таким образом, на примере CtxG1 нами впервые показано, что ограниченная подвижность фрагментов пептида может приводить к существенному понижению скорости изотопного обмена.

При ВТКИО CtxG1 наиболее реакционноспособным оказывается имидазольное кольцо His10 (таблица). Подобное явление ранее наблюдалось в реакции ВТКИО свободного гистидина и его трипептидов [5, 12]. Однако, если в гистидине и его трипептидах реакционная способность водородных атомов при C2 и C4 в имидазольном кольце близка, то в CtxG1 изотопный обмен происходит исключительно при C2. По-видимому, причиной высокой реакционной способности C2H His10 является участие неких электронодонорных атомов в стабилизации переходного состояния, образующегося при твердофазной реакции изотопного обмена. Анализ пространственной структуры CtxG1 [9, 10] показывает, что для имидазольного кольца His10 такой электронодонорной группировкой может быть только гуанидиновая группа остатка Arg9.

Для проверки корректности этого предположения проведен квантово-химический расчет переходного состояния при обмене водорода во фрагменте молекулы CtxG1, включающем Arg9 и His10. Для этого расчета геометрические параметры тяжелых атомов были взяты фиксированными из рентгеноструктурных данных [10]. Расстояние между обменивающимся атомом H при C2 и атомом N гуанидиновой группировки Arg9 в переходном комплексе составляет 2.68 Å, а энергия активации этой реакции, согласно расчету, очень низка – 7 ккал/моль. Т.е. пространственная сближенность имидазольного кольца остатка His10 и гуанидиновой группы Arg9 является причиной того, что около половины всего трития включается при C2 имидазольного кольца His10.

Результаты, полученные в настоящей работе, показывают, что участие электронодонорных атомов O и N в стабилизации переходного состояния – необходимое условие для протекания реакции ВТКИО в полипептидах. При этом электронодонорные атомы могут принадлежать как остатку, в котором происходит обмен, так и другим пространственно близким аминокислотным остаткам.

Таким образом, в отличие от изотопного обмена в свободных аминокислотах, в реакции ВТКИО в полипептидах важную роль играет пространственная доступность обмениваемых протонов для взаимодействия с кислотными центрами, образованными СВ, и конформационная гибкость пептидного фрагмента, позволяющая образовывать переходные состояния с участием электронодонорных атомов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

α -Конотоксин G1, полученный с использованием Fmoc-схемы синтеза как описано в работе [11], идентичен продукту, использовавшемуся для установления пространственной структуры в растворе [9]. Иодирование с целью получения [^{125}I]CtxG1 было проведено по известной методике [11].

Твердофазный изотопный обмен CtxG1 с тритием. В водном растворе смешивали 100 мг окиси алюминия (Serva) с 4.0 мг CtxG1. Воду удаляли упариванием при 20°C. Окись алюминия с нанесенным пептидом смешивали с 10 мг катализатора (5% Rh/Al₂O₃, Fluka). В ампулу объемом 10 мл помещали полученную твердую смесь. Ампулу вакуумировали, заполняли газообразным тритием до давления 250 мм рт. ст. и проводили реакцию при 140°C в течение 20 мин. Ампулу охлаждали, вакуумировали, продували водородом. Пептид десорбировали 20% водным этанолом. Для удаления лабильного трития пептид еще дважды растворяли в 20% водном этаноле и упаривали до-

суха. Очистку [^3H]CtxG1 проводили на колонке Кромасил C18 10 × 250 мм. Включение трития в пептид рассчитывали с использованием жидкостного сцинтилляционного счета. После очистки получено 8 мКи [^3H]CtxG1 с молярной радиоактивностью 35 Ки/ммоль.

Анализ равновесного связывания [^3H]CtxG1 и [^{125}I]CtxG1 с мембранными препаратами AChR. Обогащенные AChR мембранные препараты электрического органа *Torpedo californica*, полученные как описано в работе [15], были любезно предоставлены проф. Ф. Хухо (Свободный Университет Берлина). Мембранные препараты AChR (4 или 10 пмоль токсинсвязывающих участков в опытах с [^3H]CtxG1 или [^{125}I]CtxG1, соответственно), суспендированные в 50 мкл 50 мМ Трис-НСI-буфера (рН 7.5), инкубировали 35 ± 5 мин при комнатной температуре с различными количествами (от 0.4 до 150 пмоль) [^3H]CtxG1 или [^{125}I]CtxG1 (в случае с [^3H]CtxG1 буферная смесь содержала также 5% этанола). Неспецифическое связывание определялось преинкубацией мембран в течение 30 мин при комнатной температуре с 50-кратным молярным избытком CtxG1 (по отношению к радиоактивному лиганду). Несвязавшиеся радиоактивные лиганды удаляли быстрой промывкой 5 мМ Трис-НСI-буфером (рН 7.5) на стеклянных фильтрах GF/F (Whatman), предварительно замоченных в 0.25% полиэтиленимине. Анализ кривых связывания проведен с использованием программы Origin 5.0 (MicroCal Software Inc.).

ЯМР-спектроскопия. Распределение трития в CtxG1 определяли с помощью ^3H -ЯМР. 7 мКи [^3H]CtxG1 растворяли в 600 мкл D_2O (100% дейтерия SIL, UK) при рН 7.5. Спектры ^1H - и ^3H -ЯМР снимали при температуре 30°C на спектрометре Varian UNITY-600 (США) с рабочей частотой (МГц) 600 для протонов и 640 для трития. Перед началом импульсной последовательности производилась задержка длительностью 3 с для релаксации ядер к начальному равновесному состоянию. Обработка и анализ спектров проводились интерактивно в программе VNMR фирмы Varian (США). Отнесение сигналов в спектре ^3H -ЯМР [^3H]CtxG1 взято из спектра ^1H -ЯМР, полученного в тех же условиях. Отнесение сигналов в спектре ^1H -ЯМР и расчет пространственной структуры CtxG1 в водном растворе описаны ранее [9].

Методика *ab initio*-расчетов. Для расчета изолированных молекулярных систем, фрагментов потенциальных поверхностей и переходных состояний реакции обмена водорода использовали метод Хартри-Фока [13] в базе 6-31G*. Геометрию рассмотренных систем оптимизировали с помощью аналитических градиентов без учета точечной группы симметрии. Для поиска пере-

ходных состояний применили квазиньютоновский метод синхронного транзита [16]. Расчеты выполнены с использованием программ GAUSSIAN-94 (Gaussian Inc., USA) и GAMESS [17] на суперкомпьютере CRAY J-90 (Беркли, Калифорния, США).

Доступность С-Н-связей CtxG1 для взаимодействия с H_3O^+ -кислотными центрами катализатора оценивалась по доле ван-дер-ваальсовой поверхности соответствующих атомов водорода, доступной молекулам H_2O , определенной с помощью программы MOLMOL [18] для пространственной структуры пептида в кристалле [10] и для набора из 20 структур пептида в водном растворе [9].

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 98-03-32905а, 98-04-48685а). Время на суперкомпьютере CRAY J-90 было предоставлено Тихоокеанской Северо-Западной национальной лабораторией США (контракт DE-AC06-76RLO 1830).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Золотарев Ю.А., Петренко Б.В., Мясоедов Н.Ф., Беспалова Ж.Д., Молокоедов А.С., Ярыгин К.И. // Биоорг. химия. 1982. Т. 8. С. 1615–1619.
2. Darula Z., Peter A., Toth G. // J. Label. Compds. Radiopharm. 1998. V. 29. P. 817–826.
3. Sermon P.A., Bond D.C. // Catalysis Reviews. 1973. V. 8. P. 211–245.
4. Zolotarev Yu.A., Kozic V.S., Dorokhova E.M., Zaitsev D.A., Myasoedov N.F. // J. Radioanal. Nucl. Chem. Art. 1992. V. 162. P. 3–14.
5. Zolotarev Yu.A., Dorokhova E.M., Nezavibatko V.N., Borisov Yu.A., Rosenberg S.G., Myasoedov N.F. // Amino Acids. 1995. V. 8. P. 353–365.
6. Klimova O.A., Zolotarev Yu.A., Chebotarev V.Yu. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993. V. 195. P. 758–761.
7. Zolotarev Yu.A., Borisov Yu.A., Myasoedov N.F. // J. Phys. Chemistry. 1999. V. 103. P. 4861–4864.
8. Hucho F., Tsetlin V.I., Machold J. // Eur. J. Biochem. 1996. V. 239. P. 539–557.
9. Maslennikov I.V., Sobol A.G., Gladky K.V., Lugovskoy A.A., Ostrovsky A.G., Tsetlin V.I., Ivanov V.T., Arseniev A.S. // Eur. J. Biochem. 1998. V. 254. P. 238–247.
10. Guddat L.W., Martin J.A., Shan L., Edmundson A.B., Gray W.R. // Biochemistry. 1996. V. 35. P. 11329–11335.
11. Kasheverov I., Zhmak M., Chivilyov E., Saez-Briones P., Utkin Yu., Hucho F., Tsetlin V. // J. Recept. Signal Transduct. Res. 1999. V. 19. P. 559–571.

12. Золотарев Ю.А., Ласкателев Е.В., Дорохова Е.М., Борисов Ю.А., Мясоедов Н.Ф. // Изв. АН. Сер. хим. 1997. № 8. С. 1611–1617.
13. Roothaan C.C.J. // Rev. Mod. Phys. 1951. V. 23. P. 69–75.
14. Борисов Ю.А., Золотарев Ю.А. // Изв. РАН. Сер. хим. 1999. № 8. С. 1431–1435.
15. Schiebler W., Lauffer L., Hucho F. // FEBS Lett. 1977. V. 81. P. 39–42.
16. Peng C., Schlegel H.B. // Isr. J. Chem. 1993. V. 33. P. 449–453.
17. Dupius M., Spangler D., Wendolowski J.J. // Nat. Resour. Comput. Chem. Software Cat. 1. Prog. QG01 (GAMESS). 1980.
18. Koradi R., Billeter M., Wuthrich K. // J. Mol. Graphics. 1996. V. 14. P. 51–55.

The Solid-state Catalytic Isotope Exchange of Hydrogen in α -Conotoxin G1 by the Tritium Spillover

Yu. A. Zolotarev**, **E. V. Bocharov****, **A. K. Dadayan***, **I. E. Kasheverov****, **M. N. Zhmak****,
I. V. Maslennikov**, **Yu. A. Borisov*****, **A. S. Arseniev****, **N. F. Myasoedov***, and **V. I. Tsetlin****

*Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, pl. Akademika Kurchatova 2, Moscow, 123182 Russia

**Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia

***Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russian Academy of Sciences,
ul. Vavilova 28, GSP-1 Moscow, 117813 Russia

Tritium-labeled α -conotoxin G1 with a molar radioactivity of 35 Ci/mmol and full biological activity (according to the binding to nicotinic acetylcholine receptor) was obtained by the high-temperature solid-state catalytic isotope exchange (HSCIE). The tritium distribution in the molecule of α -conotoxin G1 was revealed by ^3H NMR spectroscopy. Tritium was found in all amino acid residues except for the Asn4-Pro5-Ala6 fragment. The data on the comparative reactivity of C–H bonds, the *ab initio* quantum-chemical calculation of the hydrogen exchange reaction, and the information on the spatial structures of α -conotoxin G1 in solution and in crystal state allowed us to establish that the reactivity of H atoms may be increased by their interaction with the electron donor O and N atoms at the transition state of the HSCIE reaction. A decrease in the rate of the HSCIE reaction could be caused by both a poor spatial accessibility of C–H bonds and a limited mobility of the peptide fragment containing these bonds.

Key words: conotoxins, receptor binding; ^3H NMR; hydrogen isotope exchange, hydrogen spillover; quantum-chemical calculations

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 196-0213; fax: +7 (095) 196-0221;
e-mail: zolya@img.ras.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 8. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.