



УДК 547.993.04

ПОЛУЧЕНИЕ ФОТОАКТИВИРУЕМОГО АНАЛОГА АПАМИНА
И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
С МЕМБРАНАМИ ГЛАДКОЙ МЫШЦЫ

Ковалевская Г. И., Мирошников А. И., Овчинников Ю. А.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шеллыкина Академии наук СССР, Москва

Владимирова И. А., Шуба М. Ф.

Институт физиологии им. А. А. Богомольца Академии наук УССР, Киев

Получено фотоактивируемое производное нейротоксина апамина, которое обладает биологической активностью, сравнимой с активностью природного соединения, и способно при активации УФ-светом высокоспецифично и необратимо связываться с рецептором на мембране гладкомышечной клетки.

В исследовании процессов генерации и распространения нервного возбуждения на молекулярном уровне целесообразно использование различных нейротоксинов животного и растительного происхождения для идентификации и локализации биологической мишени. Так, при изучении потенциалзависимых Na^+ -каналов нервной мембраны применяют тетродотоксин, вератридин, батрахотоксин, токсины скорпиона и морской анемоны [1–3]. Недавно было показано, что нейротоксин из яда пчелы, апамин, эффективно и обратимо блокирует неадриэнергическое торможение и гиперполяризующее действие АТФ на мышечных клетках желудочно-кишечного тракта [4, 5]. Было высказано предположение, что это действие основано на блокировании Ca^{2+} -индуцируемой калиевой проводимости мембраны [6, 7].

В ходе работ по изучению механизма действия апамина мы синтезировали его фотоактивируемое производное, поскольку использование фотореактивных меток часто оказывается эффективным при изучении связывания физиологически активных лигандов с их специфическими рецепторами клеток-мишеней [8–12]. Структурно-функциональные исследования апамина показали [13], что специфическая химическая модификация пептида по свободным аминогруппам не снижает его биологической активности; отсюда следовало, что фотоактивируемую группу можно вводить, используя свободную α -аминогруппу N-концевого остатка цистеина или ϵ -аминогруппу единственного в молекуле остатка лизина в 4-м положении полипептидной цепи.

В качестве модифицированного реагента был выбран *n*-азидобензальдегид, успешно применявшийся ранее для получения фотоактивируемых биологических лигандов [14]. При взаимодействии реагента с пептидом образуется основание Шиффа, которое легко восстанавливается боргидридом натрия до алкиламина с сохранением исходного положительного заряда на молекуле пептида. Используя в качестве восстанавливающего агента боргидрид натрия, одновременно с введением фотоактивируемой азидной группы можно включить в молекулу радиоактивную метку, позволяющую идентифицировать мишень действия апамина.

Характерно, что при pH 9–10 и 0°С реакция восстановительного алкилирования с участием *n*-азидобензальдегида проходила у нас преимущественно по α -аминогруппе N-концевого аминокислотного остатка. Незначительные количества побочных продуктов реакции удалось отделить с помощью хроматографии на биорексе-70 с использованием линейного градиента аммоний-ацетатного буфера (рис. 1). Высокая специфичность реакции восстановительного алкилирования обусловлена низким значением рК α -аминогруппы N-концевого остатка цистеина, равным 6,7, по сравнению

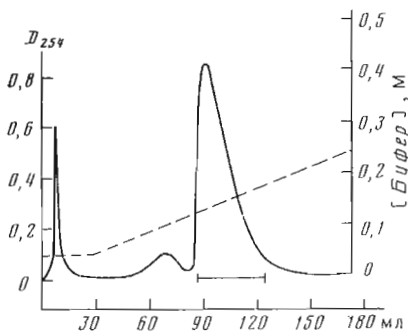


Рис. 1

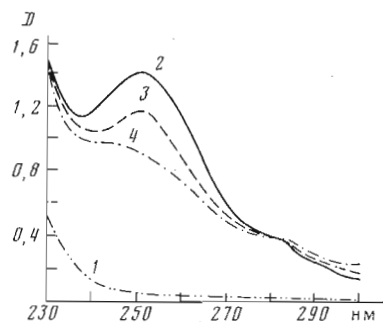


Рис. 2

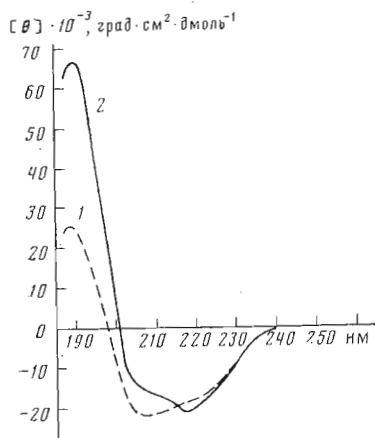


Рис. 3

Рис. 1. Хроматография модифицированного апамина (~4 мкмоль) на бюрексе-70 (1×5 см) в градиенте аммоний-ацетатного буфера (рН 7,35), 0,04–0,5 М (по 160 мл). Отмечена выделяемая фракция

Рис. 2. Спектр поглощения нативного апамина (1), его фотоактивируемого производного без облучения (2) и через 5 (3) и 10 мин (4) облучения в воде при концентрации 0,1 мМ ($\lambda_{обл} \geq 310$ нм)

Рис. 3. Спектры КД природного апамина (1, М 2036) и его фотоактивируемого производного (2, М 2167) в воде

с значением 10,8 для ϵ -аминогруппы остатка лизина в 4-м положении полипептидной цепи [15]. По данным аминокислотного анализа, остаток лизина в модифицированном апаmine остается неизменным. Поскольку в молекуле апамина нет остатков ароматических аминокислот (за исключением гистидина), то за введением фотоактивируемой группы легко следить спектрофотометрически. На рис. 2 представлены данные фотоллиза полученного фотоактивируемого производного апамина УФ-светом при длине волны выше 310 нм. Спектр КД полученного производного апамина сохраняет положение экстремумов, характерных для природного апамина (рис. 3). Изменение интенсивностей эффектов Коттона следует отнести к вкладу фотоактивируемой метки, содержащей ароматический хромофор.

Биологическая активность фоточувствительного производного апамина была проверена на мышечных полосках слепой кишки морской свинки по методике, изложенной ранее [4]. Данные, полученные в темноте, показали, что фотоактивируемый аналог апамина в концентрации $2 \cdot 10^{-7}$ М вызывает угнетение тормозящих синаптических потенциалов (ТСП) (рис. 4б), т. е. полностью сохраняет свойства природного нейротоксина [4, 5]. Как и при действии апамина, гладкомышечные клетки в ответ на интрамуральное раздражение вместо тормозящих синаптических потенциалов генерируют возбуждающие синаптические потенциалы (рис. 4в). При удалении апамина или его фотоактивированного аналога амплитуда тормозящих синаптических потенциалов составляет 80–85% от исходной. Вторичное добавление нейротоксина ($2 \cdot 10^{-7}$ М) к исследуемому препарату приводит к уменьшению тормозящих синаптических потенциалов, однако и в этом случае при отмывании нейротоксина нормальным раствором Кребса амплитуда тормозящих синаптических потенциалов восстанавливается. Аналогичные результаты получены и при дальнейшем добавлении апамина или его аналога к исследуемому препарату (рис. 4г).

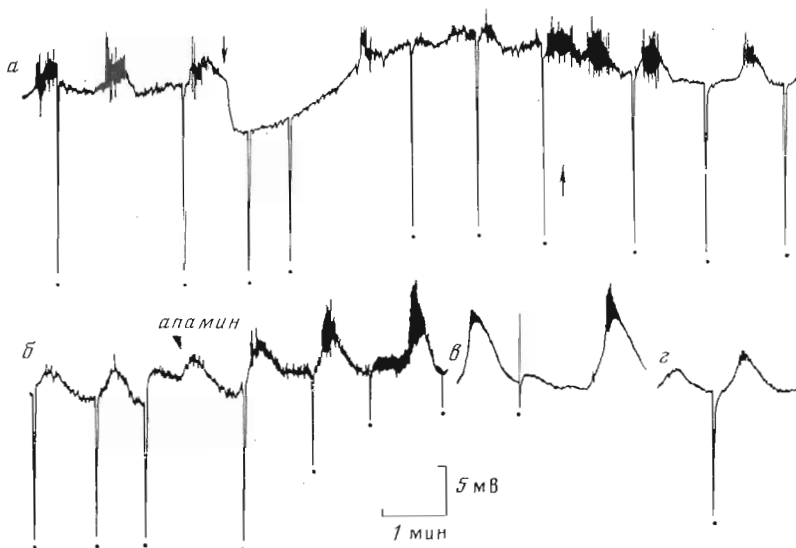


Рис. 4. Действие УФ-облучения (а) и фотоаффинного апамина (б, в) на тормозящие синаптические потенциалы (ТСП) гладкомышечных клеток атропинизированной (10^{-6} М) мышечной полоски слепой кишки. Точками обозначены одиночные интрамуральные раздражения мышечной полоски. а — начальная гиперполяризация и последующая деполяризация, возникающая в гладкомышечных клетках под воздействием УФ-облучения (первая экспозиция). ↓ — начало и ↑ — конец УФ-облучения (≥ 310 нм); б — угнетение ТСП под влиянием фотоаффинного аналога апамина в первые минуты; в — возбуждающие синаптические потенциалы (ВСП) на 10-й мин действия фотоаффинного аналога апамина; г — восстановление ТСП этой же мышечной полоски после отмывания раствором Кребса в течение 1 ч (после трехкратной аппликации апамином по 10 мин с интервалом в 30 мин)

Поскольку ранее было показано [16], что УФ-облучение мембран гладкомышечных клеток вызывает их гиперполяризацию, мы изучили этот эффект на исследуемом препарате. Действительно, облучение препарата УФ-светом (длина волны ≥ 310 нм) в течение 5 мин вызывает в исследуемых клетках гиперполяризацию, на фоне которой тормозящие синаптические потенциалы уменьшаются. При достижении максимальной величины (рис. 4а) гиперполяризация уменьшается, несмотря на продолжающееся облучение, и затем переходит в небольшую деполяризацию, на фоне которой амплитуда тормозящих синаптических потенциалов незначительно уменьшается. Прекращение УФ-облучения приводит к реполяризации мембран (рис. 4а). Отсюда следует, что УФ-облучение не влияет существенно на функциональное состояние исследуемых мембран, а данные, полученные Бёрнстоком и сотр. [16], можно объяснить коротким временем УФ-облучения (15–30 с) и наличием нитрит-ионов в используемых перфузируемых растворах.

При действии в темноте фотоактивируемого аналога апамина на нервно-мышечный препарат обнаружено, что в ответ на интрамуральное раздражение гладкомышечные клетки генерируют возбуждающие синаптические потенциалы (рис. 5а). УФ-облучение вызывает гиперполяризацию мембраны, прекращение спонтанной активности и увеличение амплитуды возбуждающих синаптических потенциалов. При дальнейшем облучении гиперполяризация уменьшается и переходит в деполяризацию. После прекращения облучения наблюдается реполяризация. После удаления фотоактивируемого аналога апамина амплитуда тормозящих синаптических потенциалов восстанавливается только на 50%, что свидетельствует о необратимом связывании аналога апамина с мембраной клетки. Повторная обработка нервно-мышечного препарата фотоактивируемым аналогом апамина с последующим УФ-облучением привела к полному угнетению тормозящих синаптических потенциалов. При этом в ответ на интрамуральное раздражение мышечные клетки генерировали возбуждающие синап-

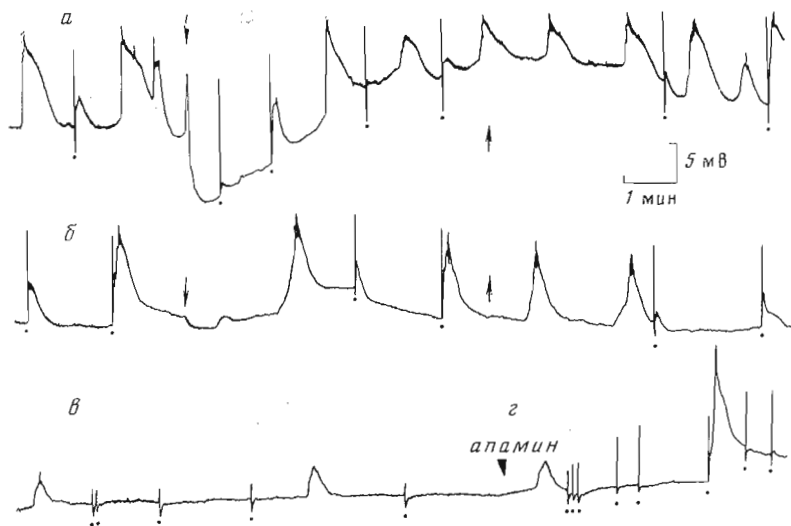


Рис. 5. Совместное действие фотоактивируемого аналога апамина и УФ-облучения на синаптические потенциалы гладкомышечных клеток слепой кишки: *а* — ВСП, возникающие в ответ на интрамуральное раздражение в мышечной полоске при действии аналога апамина (5 мин аппликации), и гиперполяризация мышечных клеток, вызванная последующим УФ-облучением, *б* — УФ-облучение на 5-й мин повторного действия фотоаффинного аналога апамина, *в* — отсутствие восстановления ТСП гладкомышечных клеток после третьего совместного действия фоточувствительного апамина и УФ-облучения и последующего часового отмывания раствором Кребса, *г* — увеличением ВСП при добавлении нативного апамина

тические потенциалы, но их амплитуда уменьшалась почти в 2 раза. Это уменьшение нельзя объяснить ухудшением функционального состояния препарата, поскольку добавление нативного апамина вызывало увеличение амплитуды возбуждающих синаптических потенциалов (рис. 5в, г). Последующая обработка гладкомышечных клеток фотоактивируемым аналогом апамина с УФ-облучением не приводит к заметным изменениям потенциала покоя и возбуждающих синаптических потенциалов.

Таким образом, под влиянием УФ-облучения происходит ковалентное (необратимое) связывание фотоактивированного аналога апамина с комплексом хеморецептор — канал мембраны гладкомышечных клеток. В то же время эти данные являются доказательством того, что УФ-облучение оказывает влияние на постсинаптическую мембрану, а не стимулирует освобождение нейротрансмиттера из «пуринергических» терминалей. Если бы наблюдаемая гиперполяризация мембран гладкомышечных клеток, возникающая под действием УФ-облучения, вызывалась «пуринергическим» нейромедиатором, то на фоне апамина следовало бы ожидать деполяризацию или по крайней мере отсутствие гиперполяризации. Полученные данные согласуются с результатами Бёрстона и сотр. [16], свидетельствующими о постсинаптическом действии УФ-облучения.

Таким образом, полученное фотоактивируемое производное апамина обладает биологической активностью, сравнимой с активностью природной молекулы, и способно при активации УФ-облучением высокоспецифично и необратимо связываться с рецептором на мембране гладкомышечной клетки. Другими словами, оно может быть использовано для препаративного выделения рецепторов комплекса, что является предметом наших дальнейших исследований.

Экспериментальная часть

Апамин из яда пчелы выделяли по ранее описанной методике [13]. Аминокислотный состав гидролизата апамина и его производного (6 н. HCl, 24 ч, 110°С) определяли на анализаторе D-500 (Durrum, США). Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре «Gilford» (Франция). Для фотолиза использовали люминесцентный осветитель

ОИ-18А (ЛОМО) с ртутной кварцевой лампой ДРК-120 и фильтром БС-5, пропускающим свет с длиной волны более 310 нм.

n-Азидобензальдегид синтезировали по методу [17]. Полученное соединение очищали хроматографией на силикагеле «Woelm» (ФРГ) в бензоле (выход 91%), его индивидуальность контролировали ТСХ на пластинках «Silufol» (ЧССР) в системе бензол — этанол (10 : 1); *R_f* 0,55.

Все опыты по получению *n*-азидобензальдегида, фотоаффинного производного апамина, а также предварительные электрофизиологические исследования проводили в темноте.

Фотоактивируемое производное апамина. Апамин (8 мг, 4 мкмоль) растворяли в 1,6 мл 0,2 М натрий-боратного буфера (рН 10) и добавляли 78 мкмоль *n*-азидобензальдегида в 200 мкл этанола. После перемешивания при 0°С (30 мин) к раствору добавляли 0,25 ммоль NaBH₄ и через 2 ч 30% уксусную кислоту до рН 5,0. Далее обессоливанием на колонке (1×40 см) с сефадексом G-25 в 0,05 М аммоний-ацетатном буфере (рН 7,0) выделили продукт реакции, который после лиофилизации хроматографировали на бюрексе-70 (см. рис. 1). Получено 2 мг фотоактивированного производного апамина.

Электрофизиологические исследования проводили на изолированных атропинизированных мышечных полосках слепой кишки морской свинки. Интрамуральное раздражение нервных образований, находящихся в толще мышечной полоски, проводили электрическими стимулами длительностью 0,2—0,5 мс. Синаптические потенциалы отводили с помощью метода сахарозного мостика. В опытах использовали концентрацию апамина и фотоактивируемого производного апамина $2 \cdot 10^{-7}$ М в растворе Кребса [4].

Действие фотоактивируемого аналога апамина на синаптические потенциалы гладкомышечных клеток слепой кишки изучали по следующей схеме: связывание аналога апамина с препаратом мышцы продолжалось 10 мин, УФ-облучение — 5 мин, отмывание препарата от пептида — 30 мин.

Спектры КД получены на дихрографе-3 (Jobin-Ivon, Франция) при толщине слоя 0,01 см и концентрации пептида $2,5 \cdot 10^{-8}$ М.

Авторы благодарят мл. научн. сотр. Е. А. Мещерякову за съемку кривых КД.

ЛИТЕРАТУРА

1. Catterall W. A. Ann. Rev. Pharmacol., 1980, v. 20, № 1, p. 15—43.
2. Vincent J. P., Balerna M., Berhanin J., Fosset M., Lazdunski M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, № 3, p. 1646—1650.
3. Romey G., Abita J. P., Schweitz H., Wunderer G., Lazdunski M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1976, v. 73, № 11, p. 4055—4059.
4. Владимирова И. А., Шуба М. Ф. Нейрофизиология, 1978, т. 10, № 3, с. 295—299.
5. Байдан Л. В., Владимирова И. А., Мирошников А. И., Таран Г. А. Докл. АН СССР, 1978, т. 241, № 5, с. 1224—1227.
6. Banks B. E. C., Brown C., Burgess G. M., Burnstock G., Claret M., Cocks T. M., Jenkinson D. H. Nature, 1979, v. 282, № 5737, p. 415—417.
7. Burgess G. M., Claret M., Jenkinson D. H. J. Physiol., 1981, v. 317, p. 67—90.
8. Tae H. Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 559, № 1, p. 39—69.
9. Stengelin S., Rathmayer W., Wunderer G., Beres L., Hucho F. Anal. Biochem., 1981, v. 113, № 2, p. 277—285.
10. Гришин Е. В., Солдатов Н. М., Овчинников Ю. А. Биоорг. химия, 1980, т. 6, № 5, с. 724—730.
11. Balerna M., Lombet A., Chicheportiche R., Romey G., Lazdunski M. Biochim. et biophys. acta, 1981, v. 644, № 2, p. 219—225.
12. Bayley H., Knowles J. R. In: Methods in Enzymol./Eds Jakoby W. B., Wilchek M. N. Y.: Acad. Press Inc., 1977, v. 46, p. 69—114.
13. Мирошников А. И., Елякова Е. Г., Куделин А. Б., Сенявина Л. Б. Биоорг. химия, 1978, т. 4, № 8, с. 1022—1028.
14. Girshovich A. S., Kurtshkhaliya T. V. FEBS Lett., 1978, v. 92, № 2, p. 203—206.
15. Оханов В. В., Афанасьев В. А., Гуревич А. З., Елякова Е. Г., Мирошников А. И., Быстров В. Ф., Овчинников Ю. А. Биоорг. химия, 1980, т. 6, № 6, с. 840—864.
16. Burnstock G., Wong H. Br. J. Pharmacol., 1978, v. 62, № 2, p. 293—302.
17. Bridges A. J., Knowles J. R. Biochem. J., 1974, v. 143, № 3, p. 663—668.

Поступила в редакцию
23.III.1982

PREPARATION OF A PHOTOACTIVABLE APAMIN DERIVATIVE AND STUDIES ON
ITS INTERACTION WITH SMOOTH MUSCLE MEMBRANES]

KOVALEVSKAYA G. I., MIROSHNIKOV A. I., OVCHINNIKOV Yu. A.,
VLADIMIROVA I. A., SHUBA M. F.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow; A. A. Bogomolets Institute of Physiology, Academy
of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev*

Apamin, a bee venom neurotoxin, was modified with photosensitive reagent *p*-azidobenzaldehyde. The site of modification was identified as the N-terminal amino group. This photoactivable derivative proved to be highly biologically active. After ultraviolet irradiation, it was irreversibly and specifically bound to smooth muscle membranes.