



УДК 577.112.6:577.352.465

ВЛИЯНИЕ α -КОНОТОКСИНА МП И ЕГО *N*-КОНЦЕВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ НА Ca^{2+} - И Na^{+} -СИГНАЛЫ, ИНДУЦИРОВАННЫЕ НИКОТИНОМ В КЛЕТКАХ НЕЙРОБЛАСТОМЫ SH-SY5Y

© 2012 г. А. М. Сурин*, ***, Е. В. Крюкова*, А. С. Струков*, М. Н. Жмак*, Р. Талка***, Р. Туоминен***, О. Салминен***, Л. С. Хируг***, И. Е. Кашеверов*, В. И. Цетлин*

* Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков

М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

** НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН, Москва

*** Университет Хельсинки, FIS00014 Хельсинки, Финляндия

Поступила в редакцию 01.07.2011 г. Принята к печати 29.08.2011 г.

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAChR) участвуют в регуляции внутриклеточных Ca^{2+} -зависимых процессов в клетках как в норме, так и при патологических состояниях. α -Конотоксины из яда морских моллюсков *Conus* служат ценным инструментом в исследовании фармакологических свойств и функциональной роли nAChR. В работе синтезированы аналоги α -конотоксина МП, меченные по *N*-концевому остатку глицина реагентом Болтон-Хантера (ВН-МП) или флуоресцеинизотиоцианатом (FITC-МП). С помощью флуоресцентно-микроскопических измерений клеток нейробластомы SH-SY5Y, нагруженных Ca^{2+} -индикатором Fura-2 либо одновременно Ca^{2+} - и Na^{+} -индикаторами Fluo-4 и SBFI, было проверено влияние модификации МП на его способность блокировать Ca^{2+} - и Na^{+} -сигналы, индуцированные никотином. Измерения на клетках SH-SY5Y показали, что при добавлении и последующем отмывании никотина, кинетика увеличения и восстановления концентрации свободного Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) отличается от кинетики изменений свободного Na^{+} ($[\text{Na}^{+}]_i$), что свидетельствует о различии механизмов регуляции Ca^{2+} - и Na^{+} -гомеостаза. МП концентрационно-зависимым образом подавлял рост $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и $[\text{Na}^{+}]_i$, индуцированный никотином. Дополнительный остаток тирозин в аналоге МП, удлиненном на эту аминокислоту в *N*-концевой части, и, особенно, более объемистая метка в FITC-МП привели к значительному понижению ингибирующего действия МП. Производное ВН-МП по ингибирующему эффекту мало отличалось от исходного α -конотоксина. МП и его йодированные производные, по-видимому, перспективны для использования в радиолигандном анализе.

Ключевые слова: конотоксины, никотиновые ацетилхолиновые рецепторы, внутриклеточный Ca^{2+} , внутриклеточный Na^{+} , нейробластома SH-SY5Y.

ВВЕДЕНИЕ

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAChR) относят к надсемейству Cys-петельных лигандуправляемых ионных каналов [1]. Различные подтипы nAChR выполняют в организме разнообразие функций – от участия в сокращении мышц до модулирования работы нейронов. nAChR подразделяют на две основные группы: мышечного и нейронального типа [2]. Последние вовлечены в процессы мышления, участвуя в обучении и формировании памяти, а нарушение функционирования нейрональных nAChR является причиной различных нейродегенеративных

и психических заболеваний или сопровождается их течением [3, 4].

Являясь мишенью для никотина, в центральной нервной системе nAChR участвуют в возникновении никотиновой зависимости. Имеются данные, подтверждающие увеличение их количества как в мозге животных с экспериментальной никотиновой зависимостью, так и у курильщиков [5–7]. Кроме того, в последнее время обсуждается роль определенных подтипов нейрональных nAChR в нейропатическом болевом синдроме [8, 9]. В связи с этим чрезвычайно актуальной задачей является надежная идентификация в норме и при патологиях отдельных подтипов nAChR как возможных индикаторов и/или мишеней мышечных, нейродегенеративных и психических заболеваний, а также ноцицепции разной природы. На роль подобных соединений могут претендовать высокоэффективные холинергические ли-

Сокращения: nAChR – никотиновые ацетилхолиновые рецепторы; EDT – этандитиол; Nic – никотин; Mec – мекамиламин; МП – α -конотоксин МП.

Автор для связи: тел.: 8 (499) 134-14-45; эл. почта: surin_am@yahoo.com.

ганды, проявляющие избирательное сродство к определенному подтипу nAChR, среди которых одними из наиболее перспективных представляются α -конотоксины.

Преимущество α -конотоксинов как инструмента для характеристики nAChR состоит в чрезвычайном природном разнообразии этих небольших токсических пептидов из яда морских моллюсков *Conus*, простоте их химического синтеза и достаточно высокой исходной селективности к различным подтипам холинорецепторов [10–12]. К настоящему времени на основе природных α -конотоксинов получены сотни их аналогов, в том числе и производных, содержащих различные метки (радиоактивные, флуоресцентные и др.) [13, 14].

Для детекции nAChR (особенно малопредставленных подтипов) наиболее адекватным представляется использование радиоактивных соединений с высокой удельной радиоактивностью, меченных изотопом йод-125. Количество радиоактивно-меченных α -конотоксинов, описанных до настоящего времени в литературе, невелико. Это несколько пептидов, действующих на nAChR мышечного типа [15–18], производное α -конотоксина AgIV – высокоэффективный радиолиганд для гомомерного $\alpha 7$ -nAChR [19] и наиболее часто используемый радиоактивный аналог α -конотоксина MII из яда *Conus magus*, сродство которого к $\alpha 6/\alpha 3\beta 2(\beta 3)$ -подтипам нейрональных nAChR проявляется в наномолярном диапазоне концентраций MII [20–23]. Этот токсин медленнее, чем другие α -конотоксины, вымывается из комплексов с рецептором в электрофизиологических экспериментах [22] и поэтому представляется наиболее перспективным для детектирования природных рецепторов на срезах тканей. Радиоактивно меченное производное аналога α -конотоксина MII, содержащего на *N*-конце дополнительный остаток тирозина (Y^0 -MII), применялся для количественной детекции $\alpha 6$ -субъединицы в препаратах мозга мышей [25–27]. В литературе также есть сведения о синтезе ряда флуоресцентных производных α -конотоксина MII с различными метками [28], однако отсутствуют данные применения таких производных на природных объектах.

К настоящему времени (в том числе и с использованием радиоактивно-меченного α -конотоксина MII) показано, что $\alpha 6$ -субъединица nAChR представлена в центральной нервной системе в основном в стриатуме, где участвует в контроле выброса дофамина [29]. Кроме того, есть данные, что содержание этой субъединицы понижается в мозге пациентов и экспериментальных животных с болезнью Паркинсона, свидетельствуя о вовлечении $\alpha 6$ -субъединицы в патогенез болезни [30, 31].

Рецепторы, содержащие структурно близкие к $\alpha 6$ -субъединице нейрональные $\alpha 3$ -субъединицы, экспрессированы в вегетативных ганглиях [24]. Нокаутные по данной субъединице мыши погибают в первую неделю после рождения от множественных нарушений работы внутренних органов [24]. Функциональная важность $\alpha 3$ - и $\alpha 6$ -субъединиц nAChR диктует необходимость создания более широкого набора их лигандов (в том числе флуоресцентных и радиоактивных) для надежной детекции nAChR, включающих эти субъединицы. С этой целью нами были синтезированы и охарактеризованы в тестах *in vitro* два новых аналога α -конотоксина MII, различающиеся модификациями по *N*-концевому остатку глицина флуоресцеинизотиоцианатом (FITC-MII) и реагентом Болтон-Хантера (BH-MII) с целью получения на основе последнего нового радиолиганда. Для контроля мы использовали Y^0 -MII.

В качестве модельной системы для оценки активности полученных производных α -конотоксина MII, в настоящей работе была использована клеточная линия нейробластомы человека SH-SY5Y, которая экспрессирует $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 2$ и $\beta 4$ -субъединицы и широко применяется для изучения фармакологических свойств nAChR нейронального типа *in vitro* [32, 33].

Известно, что nAChR, экспрессируемые нервными клетками, регулируют многие внутриклеточные процессы посредством Ca^{2+} -зависимых механизмов [34, 35]. Ранее было показано, что в клетках SH-SY5Y nAChR разных подтипов поразному сопряжены с источниками мобилизации Ca^{2+} в цитозоль [35, 36]. Поэтому оценку биологической активности синтезированных аналогов α -конотоксина MII мы проводили по их способности подавлять индуцированный никотином вход ионов натрия и кальция в клетки нейробластомы SH-SY5Y.

Цель данного исследования – изучение влияния модификаций α -конотоксина MII на его физиологическую активность для последующего выбора наиболее оптимального варианта радиолигандного анализа nAChR и исследований *in vitro* и *in vivo*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Добавление к культуре клеток SH-SY5Y никотина (Nic, 30 мкМ) вызывало, в среднем, почти двукратный подъем концентрации свободного внутриклеточного кальция ($[Ca^{2+}]_i$) (рис. 1). Снижение $[Ca^{2+}]_i$ наступало, несмотря на продолжающееся присутствие Nic в растворе. Такой характер изменений $[Ca^{2+}]_i$ может быть вызван десенситизацией самих nAChR [37] и инактивацией потенциалчувствительных Ca-каналов, открывшихся в результате деполяризации плазматической мем-

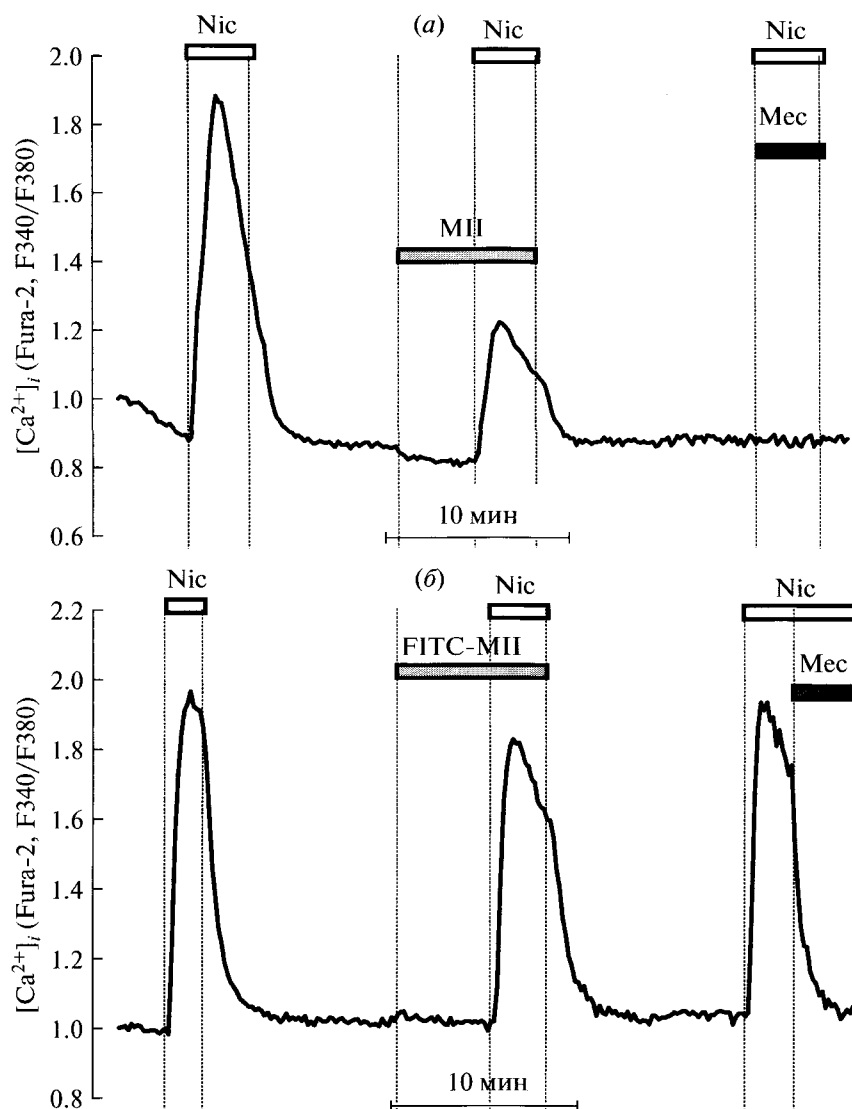


Рис. 1. Изменения внутриклеточной концентрации свободного Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$), вызванные никотином (Nic, 30 мкМ) в культуре клеток SH-SY5Y, и модуляция кальциевых ответов этих клеток α -конотоксином МП (1 мкМ), его флуоресцентно-меченным производным FITC-МП (1 мкМ) и неселективным антагонистом никотиновых ацетилхолиновых рецепторов мекамиламином (Мес, 10 мкМ). Длительность действия указанных агентов представлена горизонтальными полосками. На графиках *a* и *б* показаны сигналы, усредненные для 48 и 15 клеток соответственно. Изменения $[Ca^{2+}]_i$ представлены как отношение сигналов флуоресцентного Ca^{2+} -индикатора Fura-2, полученных при возбуждении при 340 и 380 нм (F340/F380).

браны [38]. Определенный вклад может также вносить активация систем вывода избытка Ca^{2+} из цитозоля кальциевыми насосами плазматической мембраны, эндоплазматического ретикулума [39] и, возможно, захватом Ca^{2+} митохондриями [38].

Отмывка Nic восстановила $[Ca^{2+}]_i$ до базального уровня (рис. 1). Добавление МП (1 мкМ) не повлияло на базальную $[Ca^{2+}]_i$, но понизило на 58% среднюю амплитуду последующего Ca^{2+} -ответа на Nic (рис. 1а). Это снижение Ca^{2+} -ответа на Nic произошло во всех клетках, отреагировавших на первую добавку Nic, причем снижение индивиду-

альных ответов клеток варьировалось от 1.5- до 4.5-кратного. То, что МП снизил амплитуду Ca^{2+} -ответа на Nic, хотя и в разной степени, но во всех без исключения клетках, причем ни в одной не вызвал полной блокады Ca^{2+} -сигнала, может быть объяснено экспрессией на поверхности клеток пAChR нескольких подтипов, обладающих разной способностью к связыванию с МП. Неселективный ингибитор пAChR мекамиламин (Мес, 14 мкМ), в отличие от МП, который применили в относительно низкой концентрации (1 мкМ, см., однако ниже, рис. 3), полностью подавлял рост $[Ca^{2+}]_i$, индуцированный Nic (рис. 1а),

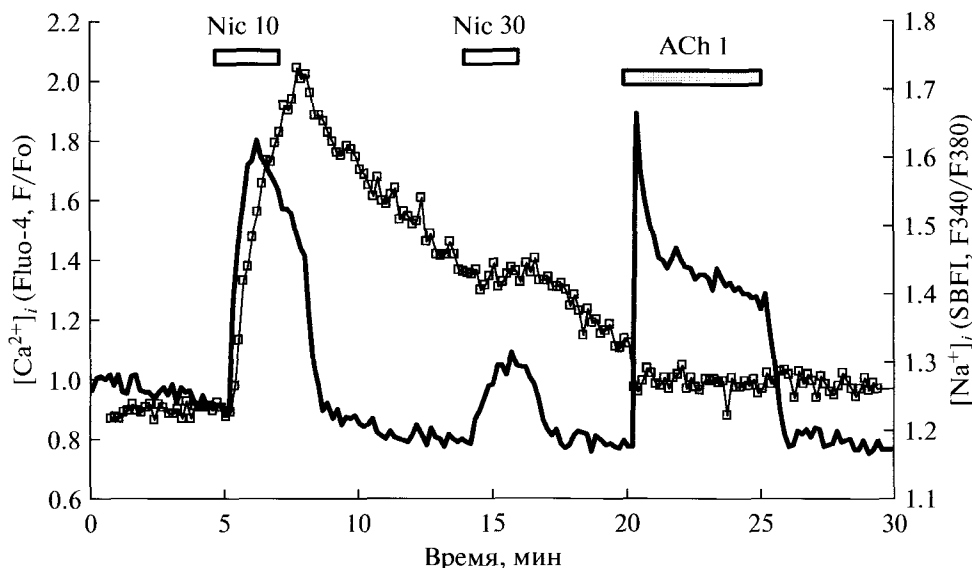


Рис. 2. Изменения внутриклеточной концентрации кальция Ca^{2+} и натрия Na^+ , индуцированные никотином (Nic, 10 и 30 мкМ) и ацетилхолином (ACh, 1 мкМ) в культуре клеток нейробластомы человека SH-SY5Y. Изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и $[\text{Na}^+]_i$ измерены с помощью индикаторов Fluo-4 и SBFI, соответственно, и представлены в виде отношения текущего значения интенсивности флуоресценции к исходному в начале эксперимента (Fluo-4, F/F_0) или в виде отношения сигнала при длинах волн возбуждения 340 и 380 нм (SBFI, F_{340}/F_{380}). Длина горизонтальной полосы соответствует длительности действия агонистов.

даже без предварительной инкубации с клетками SH-SY5Y.

Стоит отметить, что около 20% клеток не увеличивали $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в ответ на Nic, что говорит о значительных вариациях количества nAChRs, экспрессированных на отдельных клетках SH-SY5Y. Поэтому не удивительно, что α -конотоксин MII, который является более селективным лигандом, чем Nic, не полностью ингибировал никотининдуцированный вход Ca^{2+} в клетки. Совмещение амплитуд Ca^{2+} -ответов клеток, вызванных добавлением только Nic или Nic в присутствии MII, показало, что α -конотоксин не влияет на кинетику роста $[\text{Ca}^{2+}]_i$, но немного замедляет восстановление $[\text{Ca}^{2+}]_i$ после удаления никотина (не показано).

Добавление Mec во время продолжающегося действия никотина (рис. 1б) привело к резкому падению $[\text{Ca}^{2+}]_i$ до базального уровня. Таким образом, подъем $[\text{Ca}^{2+}]_i$ вызван активацией именно nAChR и поэтому может быть заблокирован добавлением ингибитора после того, как канал открылся. Флуоресцентно-меченное производное FITC-MII (1 мкМ), как и исходный MII, не влияло на базальный уровень $[\text{Ca}^{2+}]_i$, но, в отличие от немодифицированного α -конотоксина, заметно слабее блокировало Ca^{2+} -ответ клеток на Nic (рис. 1б).

Мы проверили, может ли увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ вызываться, по крайней мере отчасти, входом Na^+ по nAChR, приводящим к деполяризации

плазматической мембраны, и, соответственно, к открыванию потенциалчувствительных Ca^{2+} -каналов. Для этого SH-SY5Y-клетки были нагружены одновременно флуоресцентными индикаторами на ионы Ca^{2+} и Na^+ (Fluo-4 и SBFI, соответственно). На рис. 2 показаны изменения сигналов указанных индикаторов при аппликации последовательно двух добавок никотина (10 и 30 мкМ) и ацетилхолина (1 мкМ). Видно, что первая добавка никотина вызвала быстрое увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$, которое сменилось падением, несмотря на продолжающееся действие агониста. Сигнал Ca^{2+} -индикатора Fluo-4 (отношение F/F_0) быстро вырос до величины 1.8, а затем в течение последующих 2 мин действия никотина снизился до 1.4. Отмывание никотина резко (примерно в 4 раза, судя по увеличению наклона кривой) ускорило возврат $[\text{Ca}^{2+}]_i$ к величине, наблюдавшейся до его воздействия ($F/F_0 = 1$). Подобный ход графика во время действия никотина может быть обусловлен десенситизацией как самих nAChR, так и инактивацией потенциалчувствительных Ca-каналов.

Ранее было показано, что в клетках SH-SY5Y почти 80% увеличения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в ответ на никотин обусловлено входом по потенциалчувствительным Ca-каналам [40]. Выполненные в данной работе измерения сигналов индивидуальных клеток в основном подтвердили это наблюдение, однако показали, что блокада потенциалчувствительных кальциевых каналов кадмием не снижает Ca^{2+} -

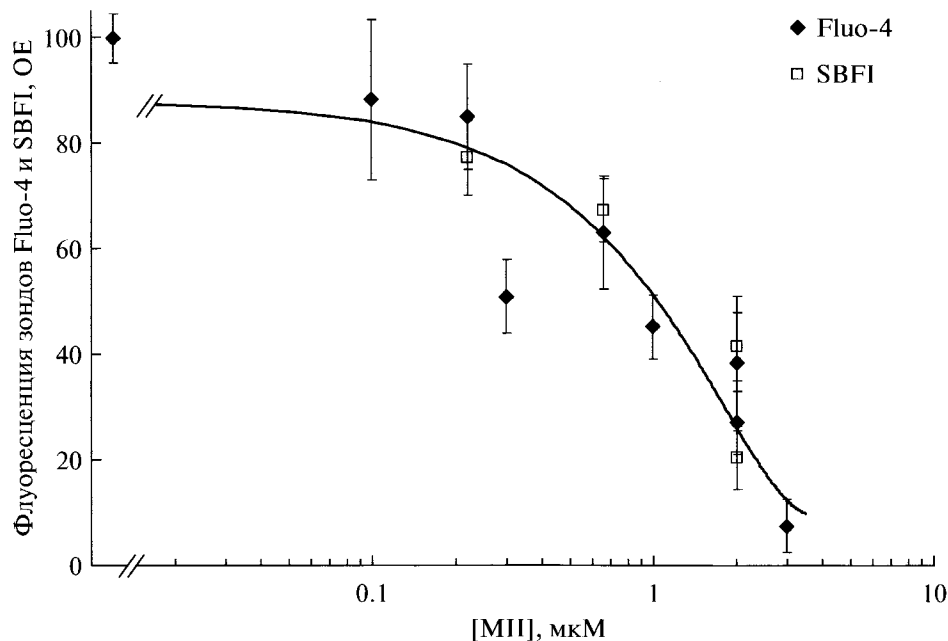


Рис. 3. Блокада α -конотоксином MII изменений $[Ca^{2+}]_i$ (индикатор Fluo-4) и $[Na^+]_i$ (индикатор SBFI) вызванных никотином (10 мкМ) в клетках SH-SY5Y. Регистрацию проводили, как указано в подписи рис. 2. Каждая точка получена усреднением сигналов 10–20 клеток, измеренных в 2–3 экспериментах, показана величина стандартного отклонения.

сигнал в примерно 5% нейронов (данные не показаны), то есть в части клеток вход Ca^{2+} происходит преимущественно по nAChR. Это свидетельствует о том, что каждая SH-SY5Y клетка экспрессирует разные количества не только nAChR, но и потенциалчувствительных Ca-каналов.

Характер изменений концентрации внутриклеточного натрия Na^+ и Ca^{2+} , индуцированных никотином, существенно различался (рис. 2). Значение $[Na^+]_i$ увеличивалось до тех пор, пока присутствовал никотин и медленно падало после отмывания агониста. Эти данные указывают на то, что $[Ca^{2+}]_i$ увеличивается в результате поступления Ca^{2+} преимущественно по потенциалчувствительным каналам, инактивация которых наступает прежде, чем прекращается поступление ионов Na^+ по nAChR. Частично увеличение $[Na^+]_i$ может быть вызвано поступлением Na^+ по потенциалчувствительным натриевым каналам, существование которых в клетках SH-SY5Y показано ранее [41, 42]. Сопоставление изменений $[Ca^{2+}]_i$ и $[Na^+]_i$ (рис. 2) позволяет предположить, что амплитуда Ca^{2+} -сигнала, индуцированного никотином, определяется не только количеством активных nAChR на поверхности клеток, но и количеством потенциалчувствительных каналов, экспрессируемых каждой клеткой.

Повторная добавка никотина даже более высокой концентрации (30 мкМ на рис. 2) вызвала меньший подъем $[Ca^{2+}]_i$, если не успевало про-

изойти восстановление базального уровня $[Na^+]_i$. Добавка ацетилхолина в относительно низкой концентрации (1 мкМ) вызвала скачок $[Ca^{2+}]_i$, с последующим снижением до стабильного промежуточного уровня. При этом увеличения $[Na^+]_i$ не отмечалось. Подобные изменения величины $[Ca^{2+}]_i$ при отсутствии роста $[Na^+]_i$ характерны для клеток, в которых активированы метаболитные рецепторы [43]. Действительно, линия SH-SY5Y содержит метаболитные мускариновые рецепторы типа M3, сопряженные с активацией фосфолипазы C и последующей мобилизацией Ca^{2+} в цитозоль [44].

Известно, что α -конотоксин MII обладает сродством в наномолярном диапазоне концентраций к nAChR, образованным субъединицами $\alpha 6\beta 2(\beta 3)$ и $\alpha 3\beta 2(\beta 3)$ нейрональных никотиновых рецепторов [12]. Сведения об аффинности получены преимущественно из экспериментов по связыванию радиоактивно-меченных токсинов с мембранными препаратами отделов мозга и на основании электрофизиологических измерений [25, 26, 35, 45]. Поскольку на клетках нейробластомы SH-SY5Y обнаружены $\alpha 3$ - и $\beta 2$ -субъединицы nAChR [32], мы проверили концентрационную зависимость влияния α -конотоксина MII на изменения $[Ca^{2+}]_i$ и натрия $[Na^+]_i$, индуцированных никотином.

Из данных, представленных на рис. 3, видно, что в области низких концентраций (менее 0.2 мкМ) токсин незначительно снижает величину как

Ca^{2+} -, так и Na^+ -сигналов, индуцированных никотином (10 мкМ). По-видимому, в тех культурах линии SH-SY5Y, которые были использованы для измерений, доля рецепторов, состоящих из $\alpha 3\beta 2$ -субъединиц была низкой, поэтому их ингибирование слабо повлияло на увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и $[\text{Na}^+]_i$. Увеличение концентрации МП до 2–3 мкМ приводило к значительной или почти полной блокаде Ca^{2+} - и Na^+ -сигналов, вызванных никотином. Вероятно, при столь высоких концентрациях конотоксин ингибировал и те nAChR, которые имели низкую по отношению к нему аффинность.

Известно, что модификации конотоксина МП по *N*-концевому аминокислотному остатку приводят к значительным изменениям его аффинности. Так, замена остатка глицина на аланин в 4.5 раза увеличивала значение IC_{50} [22], а присоединение к концевой аминокислотной группе флуоресцентных меток, с массой, составляющей 10–15% от массы самого токсина, увеличивала IC_{50} в 40–60 раз [28]. Нами были синтезированы аналоги α -конотоксина МП, меченные по *N*-концевому остатку глицина флуоресцеинизотиоцианатом (FITC-МП) и реагентом Болтон-Хантера (МП-ВН). Кроме того, был синтезирован и испытан описанный ранее аналог токсина, удлиненный с *N*-конца на остаток тирозина (Y^0 -МП) [25–27]. На рис. 4 представлены результаты блокады этими производными индуцированных никотином Ca^{2+} -ответов SH-SY5Y-клеток.

Ингибирующий эффект производного, модифицированного реагентом Болтон-Хантера, практически не отличался от действия природного токсина – увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ подавлялось на 50%. В то же время, тирозиновый аналог Y^0 -МП, применяющийся при синтезе йодированных производных и используемый в радиолигандном анализе, оказался менее активным. Флуоресцентное производное FITC-МП, сохраняло некоторую активность, но эта более объемистая группа на *N*-конце, еще сильнее влияла на ингибирующий эффект и снижала прирост $[\text{Ca}^{2+}]_i$ лишь на 10% (рис. 4).

Таким образом, нами впервые выполнены одновременные измерения изменений $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и $[\text{Na}^+]_i$, индуцированных никотином в клетках нейробластомы человека SH-SY5Y, и исследовано ингибирующее влияние α -конотоксина МП и его производных, модифицированных по *N*-концевому остатку, на вход Ca^{2+} и Na^+ в эти клетки. Показано, что транзитный характер изменений $[\text{Ca}^{2+}]_i$ во время действия никотина обусловлен, в значительной степени, инактивацией потенциалчувствительных Ca^{2+} -каналов, открывание которых вызвано входом Na^+ по nAChR-каналам. Обнаружено, что модификация *N*-концевой аминокислоты снижает ингибирующий эффект токсина

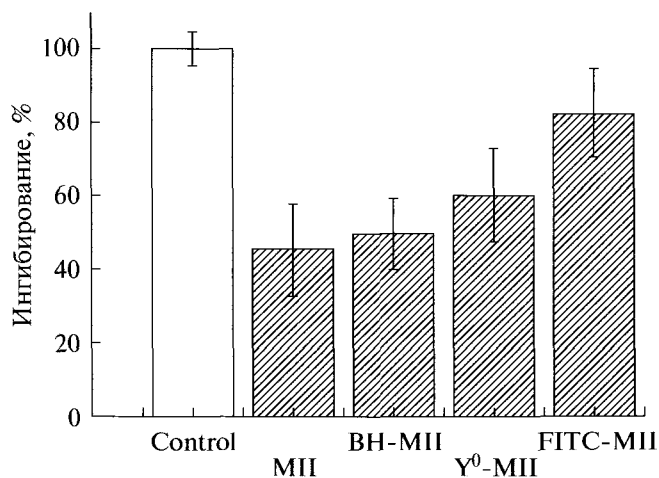


Рис. 4. Ингибирование увеличения внутриклеточного уровня кальция ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), индуцированного никотином в клетках SH-SY5Y, α -конотоксином МП и его производными – Y^0 -МП, ВН-МП или FITC-МП. Концентрация конотоксина и его производных 1 мкМ, концентрация никотина 10 мкМ. Приведены средние значения сигналов 20–24 клеток, измеренных в 2–3 экспериментах, показана величина стандартного отклонения.

и это снижение тем больше, чем больше размер присоединенной группы. В то же время, аналог α -конотоксина МП, меченный по *N*-концевому остатку реагентом Болтон-Хантера, более активен, чем широко применяемый тирозиновый аналог и, вероятно, более перспективен для синтеза радиоактивно-меченных производных и последующего радиолигандного анализа.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты: ацетоксиметилловые эфиры индикаторов ионов Ca^{2+} и Na^+ , (Fura-2/AM, Fluo-4/AM, и SBFI/AM), а также неионный детергент Pluronic F127 приобретены у фирмы Invitrogen (США). Rink-полимер фирмы Buchem (ФРГ).

Приготовление клеточных культур. Клетки нейробластомы человека линии SH-SY5Y получали, как описано ранее [46]. Культуры выращивали в пластиковых флаконах в среде DMEM : : Ham's F12 (1 : 1) (Invitrogen, USA), содержащей 1% аминокислот, глутамин (2 мМ), пенициллин (50 ед/мл) и стрептомицин (50 мкг/мл). В среду добавляли фетальную сыворотку теленка (15%, Invitrogen, USA). Для флуоресцентномикроскопических измерений клетки пересевали в пластиковые 35 мм чашки (MatTek, USA), в дне которых имелось отверстие с приклеенным к нему пористым стеклом. Перед посадкой клеток на стекло наносили поли-D-лизин (10 мкг/мл, молекулярная масса 70–110 кДа, Sigma-Aldrich,

США). Культуры использовали через 24–72 часа по достижении 30–70% конфлюэнтности.

α -Конотоксин МП был синтезирован твердофазным методом на *n*-алкоксибензильном полимере с использованием Fmoc-схемы защиты аминокислот [47]. Для обессоливания пептидов применяли хроматографию на Сефадексе G-15 (Pharmacia, Швеция). Дальнейшую очистку пептида проводили с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке Reprosil-Pur в градиенте ацетонитрила в 0.1% TFA (от 10 до 40% за 30 мин) при расходе элюента 3 мл/мин; поглощение регистрировали при длине волны 226 нм. Аналитическую ВЭЖХ выполняли в условиях, аналогичных выбранным для препаративной хроматографии при скорости потока 1 мл/мин. Масс-спектрометрию осуществляли методом MALDI на приборе VISION 2000 (Bioanalysis, Великобритания).

Синтез производных α -конотоксина МП

1) Флуоресцентное производное FITC-МП. α -Конотоксин МП (1.16 мг) растворяли в 0.5 мл 200 мМ фосфатного буфера (рН 10.5) и добавляли 1.98 мг флуоресцеинизотиоцианата в 0.5 мл диметилсульфоксида. Модификацию осуществляли в течение 2 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь подвергали геле-фильтрации на колонке (10 × 950 мм) с Сефадексом G-10 в 1 М уксусной кислоте. Пептидную фракцию лиофилизовали и разделяли обращенно-фазовой высокоэффективной хроматографией (ОФ-ВЭЖХ) на колонке C-18 Vydac Protein-Peptide в градиенте концентрации ацетонитрила в 0.1% TFA. Чистоту производных подтверждали аналитической ОФ-ВЭЖХ в тех же условиях. Структуру полученных образцов оценивали методом MALDI на приборе VISION 2000 (Bioanalysis, Великобритания).

2) ВН-МП синтезировали по модифицированному методу [48]. К раствору 1.7 мг конотоксина МП в 500 мкл 0.05 М натрий-боратного буфера (рН 8.5) добавляли 1 мг *N*-оксисукцинимидного эфира 3-(4-гидроксифенил)пропионовой кислоты. После перемешивания в течение 18 ч при комнатной температуре разделяли производные с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке C-18 Vydac Protein-Peptide (Grace, США) в градиенте концентрации ацетонитрила в 0.1% TFA. Структуру полученных образцов оценивали методом MALDI.

3) Y⁰-МП синтезировали в ручном варианте твердофазного синтеза пептидов, по стандартной Fmoc/Bu^t-методике, на Rink-полимере [49]. В качестве конденсирующего реагента применяли смесь DIC/NOBt. На каждом этапе конденсацию проводили в присутствии 5-кратного избытка защищенной аминокислоты в течение 2 ч. Остатки цистеина-1 и -3 защищали Bu^t-группами, а 2- и

4-кислотолабильными Tgt-группами. Отщепляли смесью TFA–EDT–анизол–вода, 93 : 3 : 3 : 3 в течение 1.5 ч. В предварительно очищенном линейном пептиде первая дисульфидная связь была образована по стандартной методике (окисление кислородом воздуха, 10 мМ Трис-HCl, 0.2 мМ EDTA, рН 7.5), при этом выход составил 40% и наблюдалось образование большого количества осадка, состоящего из продуктов олигомеризации исходного пептида. В результате реакции замыкания второй дисульфидной связи при помощи дифенилсульфоксида в присутствии метилтрихлорсилана выход пептида Y⁰-МП составил 26%. Общий выход целевого пептида в расчете на линейный продукт, составил 10%. Молекулярная масса полученного пептида подтверждалась результатами масс-спектрометрии.

Измерение изменений концентрации внутриклеточного Ca²⁺ и Na⁺. Оптическая часть измерительной системы включала инвертированный микроскоп Olympus IX-71, блок освещения с ксеноновой лампой, мощностью 175 Вт, 8-позиционным фильтровым колесом и световодом. Эмиссионный светофильтр встроен в единый блок с дихроичным зеркалом. Изображения регистрировали с помощью кварцевого объектива (20×/NA 0.75) CCD-камерой Orca (Hamamatsu, Япония). Смену светофильтров, сбор, хранение и обработку изображений в режиме реального времени осуществляли с помощью программы Cell-R (Olympus, США). Изображения получали каждые 10 с.

Непрерывную перфузию растворов осуществляли с помощью 2-канального перистальтического насоса со скоростью 0.7 или 1.9 мл/мин. Объем камеры с клетками составлял 0.13–0.15 мл, что обеспечивало полную замену раствора в камере не дольше, чем за 15 с. Клетки SH-SY5Y использовали в первые три дня после посадки, при конфлюэнтности культуры 30–70%. Если клетки использовали на второй или третий день после посадки, то исходную плотность посадки уменьшали в 2–4 раза. Для измерения изменений концентрации внутриклеточного кальция [Ca²⁺]_i использовали флуоресцентные индикаторы Fura-2 или Fluo-4, а для измерений концентрации внутриклеточного натрия [Na⁺]_i флуоресцентный индикатор SBFI. Загрузку клеток осуществляли мембранопроницаемыми ацетоксиметильными формами индикаторов, Fura-2/AM (4 мкМ), Fluo-4/AM (0.5–1 мкМ) и SBFI/AM (6–10 мкМ), в присутствии 0.02% неионного детергента Pluronic F127, при комнатной температуре, в течение 45–50 мин. При загрузке клеток индикаторами и последующих измерениях [Ca²⁺]_i, использовали солевой буфер Тирод (Tyrode's salt solution, TSS) следующего состава: 137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 1.8 мМ CaCl₂, 1.0 мМ MgCl₂, 0.2 мМ NaHCO₃, 5.5 мМ D-глюкоза, рН 7.4 (все соли и глюкоза

фирмы Sigma-Aldrich, США). Флуоресценцию Fura-2 и SBFI возбуждали поочередно светом 340 ± 10 и 380 ± 10 нм. Регистрацию сигнала Fura-2 и SBFI проводили с применением дихроичного зеркала 420 нм и эмиссионных светофильтров соответственно 525 ± 25 и 460 ± 20 нм. Для возбуждения флуоресценции Fluo-4 и флуоресцентно-меченого производного конотоксина (FITC-МП) использовали светофильтр возбуждения 500 ± 10 нм; регистрацию излучения осуществляли с использованием дихроичного зеркала 510 и эмиссионного светофильтра 525 ± 25 нм.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке грантами РФФИ № 07-04-91001-АФ_а и 09-04-01476.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tsetlin V., Kuzmin D., Kasheverov I. // J. Neurochem. 2011. V. 116. P. 734–741.
2. Lindstrom J. // Ann. N. Y. Acad. Sci. 2003. V. 993. P. 41–52.
3. Gotti, Clementi F. // Prog. Neurobiol. 2004. V. 74. P. 363–396.
4. Hogg R.C., Raggenbass M., Bertrand D. // Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 2003. V. 147. P. 1–46.
5. Marks M., McClure-Begley T., Whiteaker P., Salminen O., Brown R. et al. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2011. V. 337. P. 187–200.
6. Breese C.R., Marks M.J., Logel J., Adams C.E., Sullivan B., Collins A.C., Leonard S. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1997. V. 282. P. 7–13.
7. Staley J.K., Krishnan-Sarin S., Cosgrove K.P., Krantzler E., Frohlich E., Perry E., Dubin J.A., Estok K., Brenner E., Baldwin R.M., Tamagnan G.D., Seibyl J.P., Jatlow P., Picciotto M.R., London E.D., O'Malley S., van Dyck C.H. // J. Neurosci. 2006. V. 26. P. 8707–8714.
8. McIntosh J.M., Absalom N., Chebib M., Elgoyhen A.B., Vincler M. // Biochem. Pharmacol. 2009. V. 78. P. 693–702.
9. Callaghan B., Adams D.J. // Channels (Austin). 2010. V. 4. P. 51–54.
10. Terlau H., Olivera B.M. // Physiol. Rev. 2004. V. 84. P. 41–68.
11. Janes R.W. // Curr. Opin. Pharmacol. 2005. V. 5. P. 280–292.
12. Кашеверов И.Е., Цетлин В.И. // Успехи биол. химии. 2009. Т. 49. С. 275–318.
13. Azam L., McIntosh J.M. // Acta Pharmacol. Sin. 2009. V. 30. P. 771–783.
14. Kasheverov I.E., Utkin Y.N., Tsetlin V.I. // Curr. Pharm. Des. 2009. V. 15. P. 2430–2452.
15. Myers R.A., Zafaralla G.C., Gray W.R., Abbott J., Cruz L.J., Olivera B.M. // Biochemistry. 1991. V. 30. P. 9370–9377.
16. Kasheverov I., Rozhkova A., Zhmak M., Utkin Y., Ivanov V., Tsetlin V.I. // Eur. J. Biochem. 2001. V. 268. P. 3664–3673.
17. Luo S., McIntosh J.M. // Biochemistry. 2004. V. 43. P. 6656–6662.
18. Kasheverov I.E., Zhmak M.N., Vulfius C.A., Gorbacheva E.V. // FEBS J. 2006. V. 273. P. 4470–4481.
19. Whiteaker P., Marks M.J., Christensen S., Dowell C., Collins A.C., McIntosh J.M. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2008. V. 325. P. 910–919.
20. Cartier G.E., Yoshikami D., Gray W.R., Luo S., Olivera B.M., McIntosh J.M. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 7522–7528.
21. Harvey S.C., McIntosh J.M., Cartier G.E., Maddox F.N., Luetje C.W. // Mol. Pharmacol. 1997. V. 51. P. 336–342.
22. McIntosh J.M., Azam L., Staheli S., Dowell C., Lindstrom J.M., Kuryatov A., Garrett J.E., Marks M.J., Whiteaker P. // Mol. Pharmacol. 2004. V. 65. P. 944–952.
23. Everhart D., Cartier E., Malhotra A., Gomes A.V., McIntosh J.M., Luetje C.W. // Biochemistry. 2004. V. 43. P. 2732–2737.
24. Xu W., Gelber S., Orr-Urtreger A., Armstrong D., Lewis R.A., Ou C.-N. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 5746–5751.
25. Salminen O., Whiteaker P., Grady S.R., Collins A.C., McIntosh J.M., Marks M.J. // Neuropharmacology. 2005. V. 48. P. 696–705.
26. Whiteaker P., McIntosh J.M., Luo S., Collins A.C., Marks M.J. // Mol. Pharmacol. 2000. V. 57. P. 913–925.
27. Parker S.L., Fu Y., McAllen K., Luo J., McIntosh J.M., Lindstrom J.M., Sharp B.M. // Mol. Pharmacol. 2004. V. 65. P. 611–622.
28. Vishwanath V.A., McIntosh J.M. // Bioconjug. Chem. 2006. V. 17. P. 1612–1617.
29. Quik M., McIntosh J.M. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2006. V. 316. P. 481–489.
30. Bordia T., Grady S.R., McIntosh J.M., Quik M. // Mol. Pharmacol. 2007. V. 72. P. 52–61.
31. Quik M., Bordia T., Forno L., McIntosh J.M. // J. Neurochem. 2004. V. 88. P. 668–679.
32. Peng X., Gerzanich V., Anand R., Wang F., Lindstrom J. // Mol. Pharmacol. 1997. V. 51. P. 776–784.
33. Salminen O., Drapeau J.A., McIntosh J.M., Collins A.C., Marks M.J., Grady S.R. // Mol. Pharmacol. 2007. V. 71. P. 1563–1571.
34. McGehee D.S., Role L.W. // Annu. Rev. Physiol. 1995. V. 57. P. 521–546.
35. Fucile S. // Cell Calcium. 2004. V. 35. P. 1–8.
36. Bertrand D., Galzi J.L., Devillers-Thiery A., Bertrand S., Changeux J.P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 6971–6975.
37. Quick M.W., Lester R.A. // J. Neurobiol. 2002. V. 53. P. 457–478. Review.
38. Dajas-Bailador F.A., Mogg A.J., Wonnacott S. // J. Neurochem. 2002. V. 81. P. 606–614.
39. Zhang S., Hedskog L., Petersen C.A., Winblad B., Ankarcrone M. // J. Alzheimers. 2010. Dis. V. 21. P. 389–402.
40. Brown N.A., Kemp J.A., Seabrook G.R. // Br. J. Pharmacol. 1994. V. 113. P. 600–606.

41. Toselli M., Tosetti P., Taglietti V. // J. Neurophysiol. 1996. V. 76. P. 3920–3927.
42. Dajas-Bailador F., Wonnacott S. // Trends Pharmacol. Sci. 2004. V. 25. P. 317–324.
43. Verkhatsky A. // Physiol. Rev. 2005. V. 85. P. 201–279.
44. Lambert D.G., Nahorski S.R. // J. Physiol. Paris. 1992. V. 86. P. 77–82.
45. Nai Q., McIntosh J.M., Margiotta J.F. // Mol. Pharmacol. 2003. V. 63. P. 311–324.
46. Pakkanen J.S., Nousiainen H., Yli-Kauhaluoma J., Kylänlahti I., Möykkönen T., Korpi E.R., Peng J.H., Lukas R.J., Ahtee L., Tuominen R.K. // J. Neurochem. 2005. V. 94. P. 1329–1341.
47. Гершкович А.А., Кибирев В.К. // Химический синтез пептидов / Наукова думка. 1992.
48. Лазакевич Е.М., Мутуле И.Е., Уткин Ю.Н., Цетлин В.И. // Биоорганич. химия. 1988. Т. 14. С. 313–317.
49. Жмак М.Н., Кашеверов И.Е., Уткин Ю.Н., Цетлин В.И., Вольпина О.М., Иванов В.Т. // Биоорганич. химия. 2001. Т. 27. С. 83–88 (Russ. J. Bioorganic Chemistry. 2001. V. 27. P. 67–71).

Effect of α -Conotoxin MII and Its *N*-Terminal Derivatives on Ca^{2+} and Na^{+} Signals Induced by Nicotine in Neuroblastoma Cell Line SH-SY5Y

A. M. Surin^{*,***}, E. V. Kryukova^{*}, A. S. Strukov^{*}, M. N. Zhmack^{*}, R. Talka^{***},
R. Tuominen^{***}, O. Salminen^{***}, L. Khiroug^{***}, I. E. Kasheverov^{*}, and V. I. Tsetlin^{*}

[#]Phone: 8 (499) 134-14-45; e-mail: surin_am@yahoo.com

^{*}Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Moscow, Miklukho-Maklaya str., 16/10, 117997 Russia

^{**}Institute of general pathology and pathophysiology, RAMS, Moscow, Russia

^{***}University of Helsinki, Helsinki, FIS00014 Finland

Nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) are implicated in the regulation of intracellular Ca^{2+} -dependent processes in cells both in normal and pathological states. α -Conotoxins isolated from *Conus* snails venom are a valuable tool for the study of pharmacological properties and functional role of nAChRs. In the present study the α -conotoxin MII analogue with the additional tyrosine attached to the *N* terminus (Y^0 -MII) was prepared. Also we synthesized analogs with the *N*-terminal glycine residue labeled with the Bolton-Hunter reagent (BH-MII) or fluorescein isothiocyanate (FITC-MII). Fluorescence microscopy studies of the neuroblastoma SH-SY5Y cells loaded with Ca^{2+} indicator Fura-2 or with Ca^{2+} and Na^{+} indicators Fluo-4 and SBFI were performed to examine effect of MII modification on its ability to inhibit nicotine-induced increases in intracellular free Ca^{2+} and Na^{+} concentrations ($[\text{Ca}^{2+}]_i$ and $[\text{Na}^{+}]_i$ respectively). Monitoring of individual cell $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and $[\text{Na}^{+}]_i$ signals revealed different kinetics of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and $[\text{Na}^{+}]_i$ rise and decay in responses to brief nicotine (Nic) applications (10–30 μM , 3–5 min), which indicates to different mechanisms of Ca^{2+} and Na^{+} homeostasis control in SH-SY5Y cells. MII inhibited in concentration-dependent manner the both $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and $[\text{Na}^{+}]_i$ increase induced by Nic. Additional tyrosine in the Y^0 -MII or, especially, more sizeable label in FITC-MII significantly reduced the inhibitory effect of MII. Whereas the efficiency of the Ca^{2+} response inhibition by BH-MII was found to be close to the efficiency of its inhibition by natural α -conotoxin MII, radioiodinated derivatives BH-MII can be used in radioligand assay.

Keywords: conotoxins, nicotinic acetylcholine receptors, intracellular Ca^{2+} , intracellular Na^{+} , neuroblastoma SH-SY5Y.