



УДК 547 : 96 : 541.6

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ВАЛИНОМИЦИНА  
И ЭННИАТИНА В КАК КОМПЛЕКСОНЫ И ИОНОФОРЫ

*Сумская Л. В., Чехляева Н. М., Барсуков Л. И.,  
Терехов О. П., Дежин В. В., Шкроб А. М.,  
Иванов В. Т., Овчинников Ю. А.*

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

Изучена способность аналогов валиномицина (Vm) и энниатина В (En), содержащих в боковой цепи аминную или карбоксильную группу, образовывать комплексы с ионами натрия и калия в растворах и транспортировать ионы калия в искусственных мембранных системах. Все исследованные соединения индуцируют калиевую проницаемость лецитиновых липосом и независимо от ионного состояния функциональных групп связывают ионы металлов в растворах.

Показано, что в двухфазных системах функциональные производные валиномицина обладают уникальной способностью изменять заряд калиевых комплексов в зависимости от pH среды. Vm(Lys) при pH 5 образует комплекс с зарядом +2, а Vm(Glu) при pH 9 — незаряженный комплекс, имитирующий по своим свойствам ионофоры нигерициновой группы.

В опытах на поверхности раздела вода — воздух и на бислойных липидных мембранах Vm(Lys) ведет себя подобно валиномицину. Использование дипольных модификаторов позволило установить, что в кислых средах ионы калия могут переноситься через мембраны двухзарядными комплексными катионами.

В предыдущем сообщении [1] описан синтез серии аналогов ионофорных антибиотиков валиномицина (Vm) \* (I) и энниатина В (En) (VII), содержащих в своих боковых цепях способные к ионизации аминные (соединения (II), (VIII) и (XII)) или карбоксильные (соединения (V), (X) и (XIV)) функциональные группы. Идея получения такого рода производных заключается в том, что присутствие электрического заряда в боковой цепи должно повлиять на способность депсипептидов связывать ионы металлов в растворах и транспортировать их через мембранные системы по градиенту электрического потенциала или концентрации иона. В настоящей работе исследованы металлсвязывающие свойства перечисленных аналогов, а также их поведение в мембранных системах; в результате установлено, что валиномициновые производные Vm(Lys) (II) и Vm(Glu) (V) действительно являются ионофорами нового типа, обладающими рядом свойств, отсутствующих у природных антибиотиков. Попутно изучались конформационные состояния соединений (II), (V), (VIII), (X), (XII) и (XIV) в различных средах, а также свойства комплексов соединений (IX), (XI), (XIII) и (XV), промежуточных продуктов синтеза соединений (VIII), (X),

\* Кроме стандартных сокращений, рекомендуемых Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC — IUB, в работе приняты следующие сокращения: Vm — валиномицин, En — энниатин В, NuIv, Lac — соответственно  $\alpha$ -оксизовалериановая и молочная кислоты, PhI — фталоил-, VzINO<sub>2</sub> — *n*-нитробензил-.

цикло[-(D-Val-L-Lac-L-Val-D-HyIv) <sub>3</sub> ]-цикло(-A-) <sub>3</sub>	Vm	(I)
Валиномицин		
цикло(D-Val-L-Lac-L-Lys-D-HyIv-A <sub>2</sub> -)	Vm(Lys)	(II)
цикло[-D-Val-L-Lac-L-Lys(Pht)-D-HyIv-A <sub>2</sub> -]	Vm(LysPht)	(III)
цикло[-D-Val-L-Lac-L-Lys(Z)-D-HyIv-A <sub>2</sub> -]	Vm(LysZ)	(IV)
цикло(-D-Val-L-Lac-L-Glu-D-HyIv-A <sub>2</sub> -)	Vm(Glu)	(V)
цикло[-D-Val-L-Lac-L-Glu(BzINO <sub>2</sub> )-D-HyIv-A <sub>2</sub> -]	Vm(GluBzINO <sub>2</sub> )	(VI)
цикло[-(L-MeVal-D-HyIv) <sub>3</sub> ]-цикло(-B-) <sub>3</sub>	En	(VII)
Энниатин В		
цикло(-L-MeLys-D-HyIv-B <sub>2</sub> -)	En(MeLys)	(VIII)
цикло[-L-MeLys(Pht)-D-HyIv-B <sub>2</sub> -]	En(MeLysPht)	(IX)
цикло(-L-MeGlu-D-HyIv-B <sub>2</sub> -)	En(MeGlu)	(X)
цикло[-L-MeGlu(BzINO <sub>2</sub> )-D-HyIv-B <sub>2</sub> -]	En(MeGluBzINO <sub>2</sub> )	(XI)
цикло(-L-Lys-D-HyIv-B <sub>2</sub> -)	En(Lys)	(XII)
цикло[-L-Lys(Pht)-D-HyIv-B <sub>2</sub> -]	En(LysPht)	(XIII)
цикло(-L-Glu-D-HyIv-B <sub>2</sub> -)	En(Glu)	(XIV)
цикло[-L-Glu(BzINO <sub>2</sub> )-D-HyIv-B <sub>2</sub> -]	En(GluBzINO <sub>2</sub> )	(XV)

(XII) и (XIV), отличающихся от них присутствием защищенных функциональных групп в боковых цепях.

Производные энниатина В (VIII) — (XV) легко образуют кристаллические комплексы с ионами калия, отличающиеся от свободных депсипептидов более высокими температурами плавления и более низкой растворимостью; последнее свойство было использовано для их очистки [1]. Как в случае энниатина В [2], кристаллические комплексы соединений (VIII) — (XV) обнаруживают незначительное смещение полос валентных колебаний амидных и сложноэфирных C=O-групп по сравнению со свободными депсипептидами, а также высокочастотное смещение колебаний группы C—O (табл. 1). Защищенные производные Vm(LysPht), Vm(LysZ), Vm(GluBzINO<sub>2</sub>), En(MeLysPht), En(MeGluBzINO<sub>2</sub>), En(LysPht) и En(GluBzINO<sub>2</sub>) исследовались в этаноле кондуктометрическим методом [3]; все они образуют достаточно устойчивые калиевые комплексы и незначительно отличаются от природных ионофоров по K/Na-избирательности комплексообразования (табл. 2).

Металлсвязывающие свойства Vm(Lys), Vm(Glu), En(MeLys)·En(MeGlu), En(Lys), En(Glu) исследовались как при нейтральном, так и при заряженном состоянии боковых функциональных групп. С этой целью к ра-

Т а б л и ц а 1

Характеристичные ИК-частоты (см<sup>-1</sup>) свободных циклодепсипептидов и их K<sup>+</sup>-комплексов

Соединение	Свободные циклодепсипептиды			K <sup>+</sup> -комплексы		
	C=O	амид I	C—O	C=O	амид I	C—O
(VII) En	1744	1670	1188	1726	1661	1205
(VIII) En(MeLys)	1745	1670	1190	1726	1665	1210
(IX) En(MeLysPht)	1740	1665	1190	1720	1660	1210
(X) En(MeGlu)	1740	1665	1190	1735	1660	1210
(XI) En(MeGluBzINO <sub>2</sub> )	1740	1670	1192	1735	1660	1210
(XII) En(Lys)	1740	1660	1190	1735	1660, 1691	1210
(XIII) En(LysPht)	1745	1665	1190	1740	1660, 1690	1210
(XIV) En(Glu)	1740	1660	1190	1735	1665, 1692	1210
(XV) En(GluBzINO <sub>2</sub> )	1740	1665	1190	1735	1660, 1687	1208

Константы устойчивости ( $M^{-1}$ )  $Na^{+}$ - и  $K^{+}$ -комплексов циклодепептидов по данным кондуктометрии в спирте

Соединение	$Na^{+}$	$K^{+}$	Соединение	$Na^{+}$	$K^{+}$
(I) Vm	$<10$	$2,0 \cdot 10^6$	(IX) En(MeLysPht)	800	2700
(III) Vm(LysPht)	$<10$	$2,0 \cdot 10^5$	(XI) En(MeGluBzlNO <sub>2</sub> )	100	2700
(IV) Vm(LysZ)	$<10$	$1,1 \cdot 10^5$	(XIII) En(LysPht)	150	1000
(VI) Vm(GluBzlNO <sub>2</sub> )	$<10$	$3,0 \cdot 10^5$	(XV) En(GluBzlNO <sub>2</sub> )	100	1000
(VII) En	1300	3700			

Таблица 3

Константы устойчивости ( $M^{-1}$ )  $Na^{+}$ - и  $K^{+}$ -комплексов циклодепептидов в 80%-ном (соединения (II) и (V)) и 96%-ном (соединения (VIII), (X), (XII) и (XIV)) водном этаноле \*

Соединения	$Na^{+}$		$K^{+}$	
	1,2 экв. HCl	1,2 экв. Et <sub>3</sub> N	1,2 экв. HCl	1,2 экв. Et <sub>3</sub> N
(II) Vm(Lys)	$<10$	$<10$	1900	3600
(V) Vm(Glu)	$<10$	$<10$	3300	4300
(VIII) En(MeLys)	50	50	60	110
(X) En(MeGlu)	370	360	300	3400
(XII) En(Lys)	150	150	80	450
(XIV) En(Glu)	270	600	130	1290

\* Константа устойчивости  $K^{+}$ -комплекса Vm в 80%-ном водном этаноле  $2 \cdot 10^6 M^{-1}$  [3, 4]; константы устойчивости комплексов энниатина В в 96%-ном водном этаноле с  $Na^{+} - 340 M^{-1}$  и с  $K^{+} - 2100 M^{-1}$  [2].

створу добавлялось 1,2 эквивалента хлористого водорода или триэтиламина. Кондуктометрические измерения в таких условиях были затруднены, поэтому ход титрования циклодепептида солью контролировался измерениями кругового дихроизма (КД) [2, 4]. Энниатиновые аналоги En(MeLys), En(MeGlu), En(Lys) и En(Glu) исследовались в 96%-ном водном этаноле. В случае валиномициновых аналогов Vm(Lys) и Vm(Glu) оптимальные для расчета значения констант устойчивости калиевых комплексов ( $10^{-3} - 10^{-4} M^{-1}$ ) получались в 80%-ном водном этаноле. Для иллюстрации наблюдаемых спектральных изменений на рис. 1 и 2 показан ход титрования Vm(Glu), En(MeGlu) соответственно хлоридом калия и перхлоратом натрия. При титровании энниатиновых аналогов хлористым калием из-за недостаточной растворимости соли полного комплексобразования, как правило, достичь не удавалось. Учитывая близость кривых КД  $K^{+}$ - и  $Na^{+}$ -комплексов депептидов энниатинового ряда [2], необходимые для расчета констант устойчивости значения  $\Delta\epsilon$   $K^{+}$ -комплексов En(MeLys), En(MeGlu), En(Lys) и En(Glu) принимали такими же, как у соответствующих  $Na^{+}$ -комплексов. Из полученных данных (табл. 3) видно, что большинство энниатиновых аналогов, как с электрически нейтральными, так и с заряженными боковыми цепями, образуют комплексы с ионами калия, в целом несильно уступающие по устойчивости комплексам энниатина В. Производные же валиномицина имеют тот же порядок устойчивости  $K^{+}$ -комплексов, что и природный антибиотик. В отличие от энниатиновых аналогов производные валиномицина не обнаруживают признаков взаимодействия с  $Na^{+}$ . Обращает на себя внимание, что калиевые комплексы

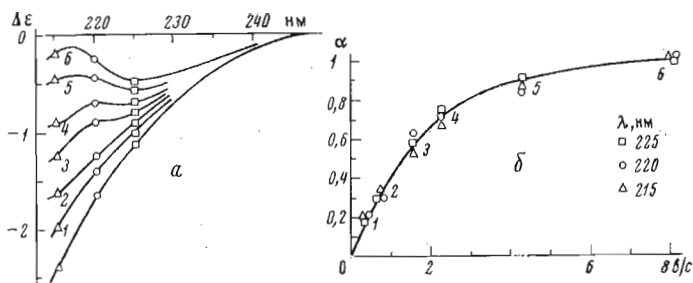


Рис. 1. Титрование Vm (Glu) (начальная концентрация  $5,75 \cdot 10^{-4}$  М) хлористым калием в 80%-ном водном этаноле, содержащем 1,2 экв. HCl: а — кривые КД; б — зависимость степени комплексообразования  $\alpha$  ( $\alpha = \Delta \epsilon / \Delta \epsilon_{\text{макс}}$ ) от отношения концентраций соли и депсипептида в растворе ( $b_0/c_0$ ). Кривые КД 1, 2, 3 и т. д. получены при последовательном добавлении  $0,7 \cdot 10^{-2}$  М раствора соли

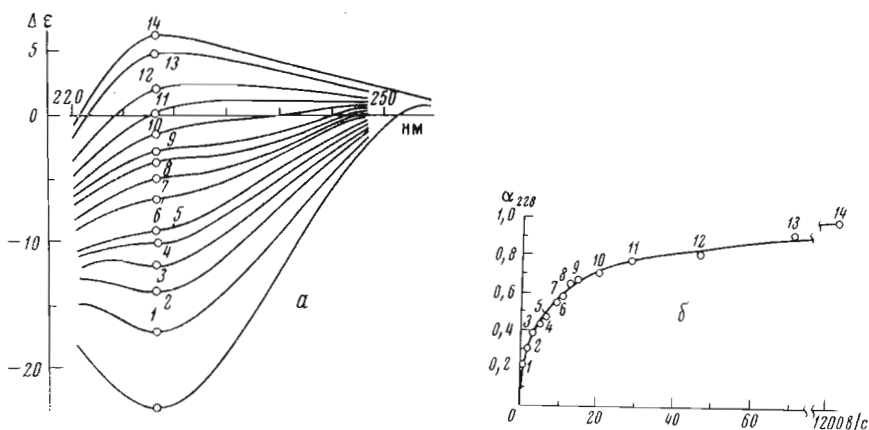


Рис. 2. Титрование En (MeLys) (начальная концентрация  $3,26 \cdot 10^{-4}$  М) перхлоратом натрия в 96%-ном водном этаноле, содержащем 1,2 экв. триэтиламина: а — кривые КД; б — зависимость  $\alpha$  от  $b_0/c_0$ . Кривые КД 1, 2, 3 и т. д. получены при последовательном добавлении 0,01 М раствора соли

заряженной формы энниатиновых производных En(MeGlu) и En(Glu) заметно устойчивее аналогичных комплексов с неионизованной карбоксильной группой. Вероятнее всего, комплексы в этих случаях дополнительно стабилизируются электростатическим взаимодействием связанного катио-

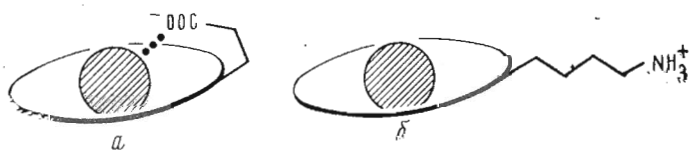


Рис. 3. Схематическое изображение комплексов функциональных производных энниатина В: а — глутаминовых аналогов (X) и (XIV); б — лизиновых аналогов (VIII) и (XI)

на с карбоксилат-анионом (рис. 3, а). Этот результат подтверждает сделанный ранее вывод о неполном экранировании связанного иона в энниатиновых комплексах от взаимодействия с анионами или растворителем [5]. В En(MeLys) и En(Lys), по-видимому, протонированная аминогруппа удалена от катиона так, что ее присутствие слабо влияет на устойчивость ком-

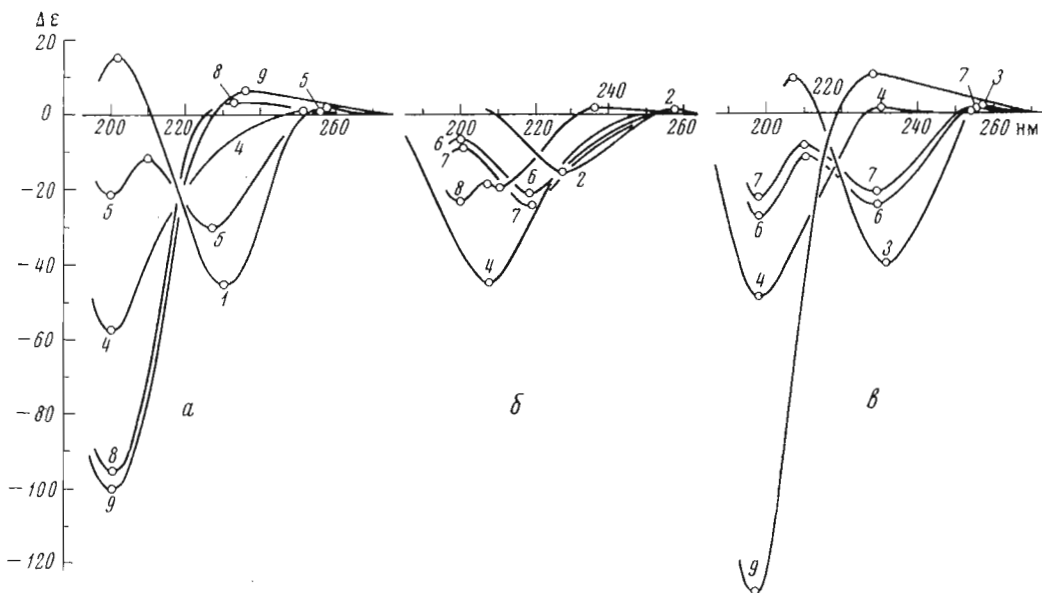


Рис. 4. Кривые КД En (а), En (MeLys) (б) и En (MeGlu) (в) в различных растворителях: гептан (1); диоксан — гептан (1 : 1) (2); диоксан (3); трифторэтанол (4); 96%-ный водный этанол (5); 96%-ный водный этанол + 1,2 экв. HCl (6); 96%-ный водный этанол + 1,2 экв. Et<sub>3</sub>N (7); 1 M NaClO<sub>4</sub> в 96%-ном водном этаноле (8); 1 M NaClO<sub>4</sub> в 96%-ном водном этаноле + 1,2 экв. HCl (9)

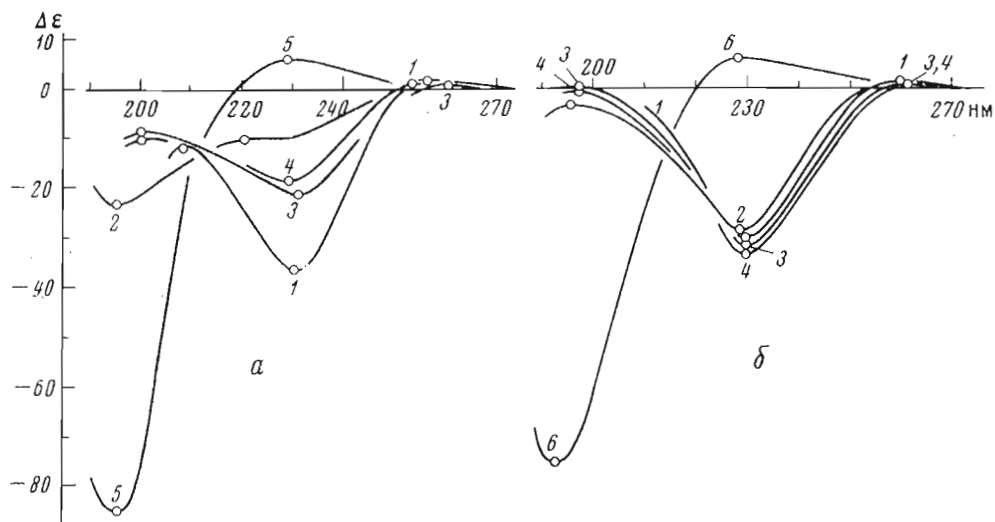


Рис. 5. Кривые КД En(Lys) (а) и En(Glu) (б) в различных растворителях: диоксан (1); трифторэтанол (2); 96%-ный водный этанол + 1,2 экв. HCl (3); 96%-ный водный этанол + 1,2 экв. Et<sub>3</sub>N (4); 1 M NaClO<sub>4</sub> в 96%-ном водном этаноле (5); 1 M NaClO<sub>4</sub> в 96%-ном водном этаноле + 1,2 экв. HCl (6)

плексов (рис. 3, б). У валиномициновых производных ионное состояние боковых цепей почти не влияет на устойчивость K<sup>+</sup>-комплексов, что согласуется с известными данными о более слабом, чем у энниатинов, взаимодействии расположенного в центральной полости катиона с противоионами [2].

Измерение кривых КД энниатиновых производных En(MeLys), En(MeGlu), En(Lys) и En(Glu) в различных растворителях (рис. 4 и 5)

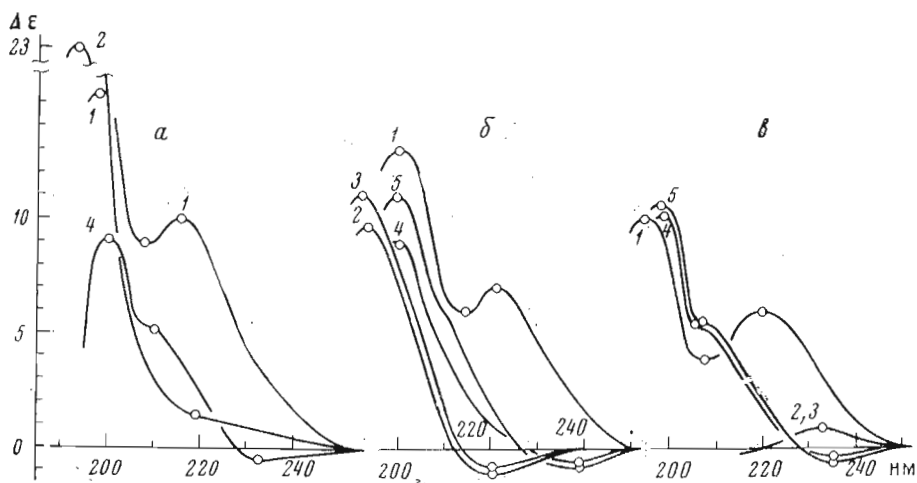


Рис. 6. Кривые  $V_m$  (а),  $V_m(\text{Lys})$  (б) и  $V_m(\text{Glu})$  (в) в различных растворителях: гептан (1); этанол (2); 96%-ый водный этанол + 1,2 экв.  $\text{Et}_3\text{N}$  (3);  $0,7 \cdot 10^{-2}$  М  $\text{KCl}$  в 96%-ном водном этаноле (4);  $0,7 \cdot 10^{-2}$  М  $\text{KCl}$  в 96%-ном водном этаноле + 1,2 экв.  $\text{Et}_3\text{N}$  (5)

показывает, что, как и у природных антибиотиков этой группы, переход от неполярных растворителей (гептан, диоксан) к более полярным ( $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) сопровождается значительной конформационной перестройкой (так называемый переход  $N \rightarrow P$  [2]), причем конформация «полярной» формы близка конформации  $\text{Na}^+$ - и  $\text{K}^+$ -комплексов. Кривые КД валиномициновых производных  $V_m(\text{Lys})$  и  $V_m(\text{Glu})$ , а следовательно, и их конформации также подобны валиномициновым (рис. 6).

Влияние ионного состояния боковых цепей на ионофорные свойства депептидов исследовалось на примере производных валиномицина в жидкостных (объемных) мембранных системах. Методом экстракции [6] изучалась способность  $V_m$ ,  $V_m(\text{Lys})$ ,  $V_m(\text{Glu})$  переводить в хлористый метилен ионы калия при pH водной фазы 5, 7 и 9. В качестве липофильного аниона был выбран пикрат ( $\text{Pi}^-$ ); его концентрация в органической фазе, а следовательно, и концентрация  $\text{K}^+$  определялись спектрофотометрически (исключения — экстракция  $V_m(\text{Lys})$  при pH 5 и  $V_m(\text{Glu})$  при pH 9, см. ниже). Проводились две серии опытов: А и Б. В серии А за счет высоких концентраций хлористого калия в водной фазе (1 М) создавались условия «насыщения» валиномицина солью, т. е. максимального вхождения пикрата калия в органическую фазу, а в серии Б концентрации веществ и объемы растворов выбирались таким образом, чтобы в системе по-прежнему присутствовали избытки  $\text{K}^+$  и  $\text{Pi}^-$  по отношению к ионофору, но не достигалось его полного комплексобразования. По результатам серии А определялась стехиометрия комплекса, а по результатам серии Б оценивалась относительная способность ионофора переводить ионы калия в органическую фазу. Из табл. 4 видно, что при больших избытках соли (серия А) во всех случаях в хлористом метиле присутствуют эквимоллярные комплексы ионофор  $\cdot \text{K}^+$ . При этом pH среды не влияет на экстракцию пикрата калия валиномицином. Данные серии Б по  $V_m(\text{Lys})$  при pH 7 и 9, а также по  $V_m(\text{Glu})$  при pH 5 и 7 указывают на снижение эффективности экстракции солей калия при введении в боковые цепи валиномицина полярных функциональных групп. Резкий рост концентрации  $\text{Pi}^-$ , экстрагированного  $V_m(\text{Lys})$  при переходе от pH 7 к pH 5, по-видимому, связан с протонизацией его аминогруппы и образованием двухзарядного комплексного катиона типа



сопряженного с двумя эквивалентами  $\text{Pi}^-$ .

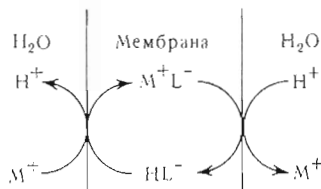
Экстракция пикрата калия валиномицином и его аналогами из воды в хлористый метилен (концентрация депсипептидов в хлористом метиле  $1 \cdot 10^{-2}$  М)

Соединение	рН	Концентрация пикрат-аниона в хлористом метиле, $M \cdot 10^4$		Экстрагируемая форма комплекса (схематически)	Степень комплексообразования		
		А *	Б *		А *	Б *	
(I) Vm	5	1,01	0,75	⊕	Количество образующее эквивалентного комплекса	0,75	
	7	1,02	0,74				
	9	0,99	0,76				
(II) Vm(Lys)	5	1,98	0,82	⊕ <chem>CCCC[NH3+]</chem>		0,41	
	7	1,01	0,46	⊕ <chem>CCCCN</chem>			0,45
	9	1,00	0,45				
(III) Vm(Glu)	5	0,98	0,51	⊕ <chem>CCCC(=O)O</chem>		0,50	
	7	0,99	0,49				0,56
	9	0,01	0,01	⊕ <chem>CCCC(=O)[O-]</chem>			

\* А и Б — серии опытов.

Что касается соединения Vm(Glu) при рН 9, то для него не наблюдается вхождения пикрат-аниона в органическую фазу, но образование  $K^+$ -комплекса было обнаружено путем его разрушения встряхиванием с водной соляной кислотой (рН 5) и определением  $K^+$  в водной фазе методом пламенной фотометрии. Из полученных данных следует, что экстрагируемая форма комплекса в этом случае электрически нейтральна, т. е. положительный заряд иона калия компенсируется отрицательным зарядом карбоксилат-аниона.

Таким образом, Vm(Glu) в определенных условиях приобретает свойства, характерные для нигерицина, моненсина и родственных им антибиотиков — большой своеобразной группы ионофоров, содержащих карбоксильную группу и осуществляющих неэлектрогенный перенос катионов в мембранных системах [7, 8] по следующей схеме:



где  $M^+$  — ион щелочного металла; L — молекула ионофора.

Одним из характерных тестов нигерициновых ионофоров на способность осуществлять обмен  $M^+ \rightleftharpoons H^+$  в искусственных мембранных системах являются опыты с U-образной трубкой [8]. Исследование поведения Vm(Glu) в такой системе (рис. 7) показало, что при рН водных фаз 5 или 7 не наблюдалось переноса  $K^+$  или изменения рН, однако при рН 9, как и ожидалось, происходило закисление раствора в правой части трубки и подщелачивание в левой, указывающее на протекание обмена  $K^+ \rightleftharpoons H^+$ . Следовательно, в кислых и нейтральных условиях Vm(Glu) — обычный, нейтральный ионофор (типа валиномицина, энниатинов или нактинов), а при увеличении рН включается неэлектрогенный перенос и данный аналог ведет себя подобно нигерицину.

Поведение энниатиновых аналогов в объемных мембранных системах не исследовалось, поскольку интерпретация полученных данных представляла бы значительные трудности из-за необходимости учета образования комплексов с соотношением макроцикл : катион, равным 2 : 1 и 3 : 2 [2]. В настоящее время отсутствуют соответствующие данные для простейших ионофоров этой группы — энниатинов А, В, С или боверицина. Экстракционные опыты с перечисленными соединениями проводятся в нашей лаборатории.

В заключение будут рассмотрены результаты исследования  $V_m(\text{Glu})$ ,  $V_m(\text{Lys})$ ,  $\text{En}(\text{MeLys})$  и  $\text{En}(\text{MeGlu})$  в других модельных мембранных системах.

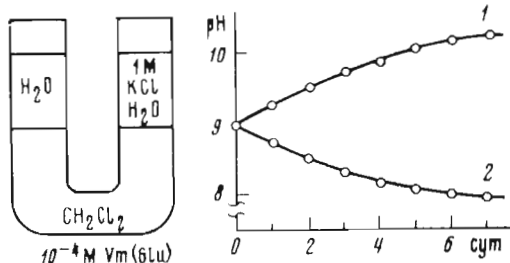


Рис. 7

Рис. 7. Кинетика  $M \rightleftharpoons N$  обмена через жидкостную мембрану, содержащую  $V_m(\text{Glu})$ . В U-образной трубке водные слои разделены раствором  $10^{-4}$  М  $V_m(\text{Lys})$  в хлористом метиле, перемешиваемом магнитной мешалкой. На графиках приведены изменения pH растворов в левой (1) и правой (2) частях трубки

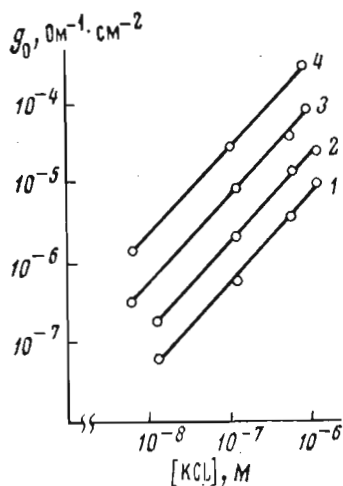


Рис. 8

Рис. 8. Зависимость проводимости  $V_m(\text{Lys})$  мембран от содержания в растворе  $V_m(\text{Lys})$  при различных концентрациях KCl: 1 —  $10^{-2}$  М; 2 — 0,1 М; 3 — 1 М; 4 — зависимость получена в растворе, содержащем 1 М KCl,  $10^{-5}$  М 1-метилтетрахлорбензимидазола,  $10^{-5}$  М  $\text{CuSO}_4$ ,  $5 \cdot 10^{-5}$  М гидрохинона, pH 3,5

Измерение скорости выхода хлорида калия из лецитиновых липосом в присутствии перечисленных соединений при pH 6,5 показало, что при введении в молекулу энниатина В или валиномицина амино- или карбоксильной группы у аналогов сохраняется способность не только связывать ионы  $\text{K}^+$  в растворах и переносить их в органическую фазу, но и переносить их через липидные мембраны [9] (табл. 5).

$V_m(\text{Lys})$ , способный образовывать как одно-, так и двухзарядные комплексы, исследовался более детально. Было найдено, что в растворах KCl этот аналог подобно валиномицину, хотя и значительно слабее, увеличивает проводимость бислойных липидных мембран (рис. 8). В диапа-

Таблица 5

Действие валиномицина, энниатина В и их аналогов на выход ионов калия из лецитиновых липосом, содержащих KCl  
Исходная концентрация депсипептидов  $10^{-4}$  М

Соединение	Выход $\text{K}^+$ через 5 мин после добавления ионофора (в % от общего содержания $\text{K}^+$ в липосомах)	Соединение	Выход $\text{K}^+$ через 5 мин после добавления ионофора (в % от общего содержания $\text{K}^+$ в липосомах)
(I) Vin	34	(VII) En	15
(II) $V_m(\text{Lys})$	29	(VIII) $\text{En}(\text{MeLys})$	18
(V) $V_m(\text{Glu})$	31	(X) $\text{En}(\text{MeGlu})$	9



зоне pH 3—7 создание градиента pH не приводит к возникновению мембранного потенциала в присутствии Vm(Lys). Напротив, при градиенте KCl мембранный потенциал в этом диапазоне pH достигает термодинамической величины. Знак этого потенциала (плюс — в растворе с меньшей концентрацией KCl) позволяет заключить, что основными носителями тока через мембрану являются ионы калия. В соответствии с высокой K/Na-из-

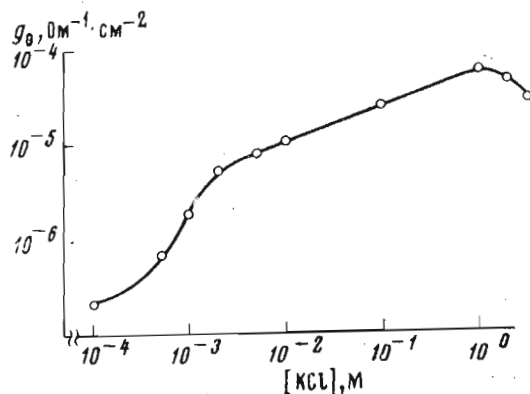


Рис. 9. Зависимость проводимости от концентрации KCl в растворе, содержащем  $1,3 \cdot 10^{-6}$  M Vm(Lys), pH 6,5

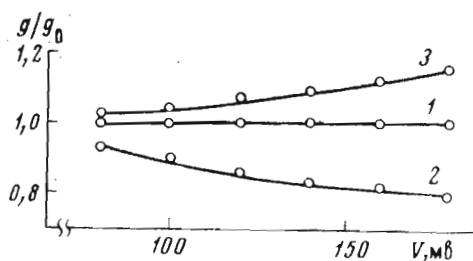


Рис. 10. Зависимость показателя кривизны —  $g/g_0$  ( $g_0$  — проводимость при нулевом токе,  $g$  — интегральная проводимость) вольт-амперных характеристик от напряжения на мембране в растворах KCl, содержащих Vm(Lys), pH 6,5; 1 — 1M KCl,  $1,3 \cdot 10^{-8}$  M Vm(Lys); 2 — 1 M KCl,  $1,3 \cdot 10^{-6}$  M Vm(Lys); 3 — 3 M KCl,  $1,3 \cdot 10^{-8}$  M Vm(Lys)

бирательностью комплексообразования присутствие Vm(Lys) практически не сказывается на проводимости мембран в растворах NaCl, а создание градиента NaCl не приводит к возникновению мембранного потенциала.

Зависимость проводимости мембран, модифицированных Vm(Lys), от концентрации KCl имеет максимум при 1M KCl (рис. 9). Аналогичная зависимость была найдена ранее для мембран из липидов мозга, содержащих валиномицин [10].

В 1 M растворе KCl, содержащем  $1,3 \cdot 10^{-8}$  M Vm(Lys), вольт-амперные характеристики мембран линейны; увеличение концентрации циклодепептида в 100 раз приводит к некоторому возрастанию показателя их кривизны, тогда как переход от 1M к 3M растворам KCl вызывает его уменьшение (рис. 10). Подобная зависимость кривизны вольт-амперных характеристик от концентрации переносимого иона и ионофора характерна и для валиномицина [11].

Для сравнения Vm(Lys) с валиномицином мы исследовали также свойства этого аналога на границе раздела вода — воздух. Подобно валино-

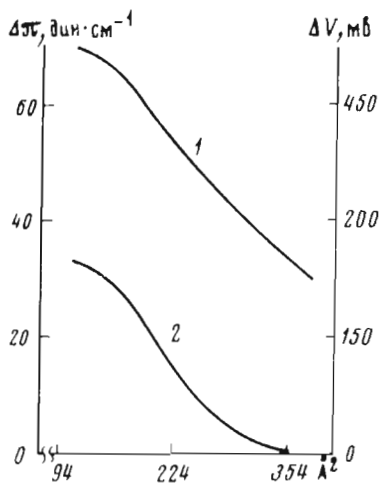


Рис. 11

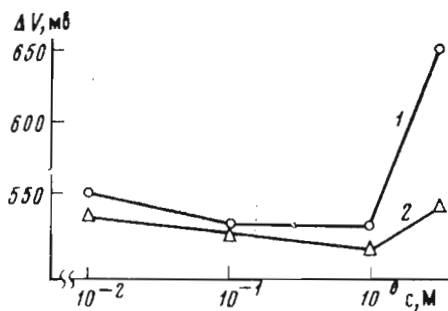


Рис. 12

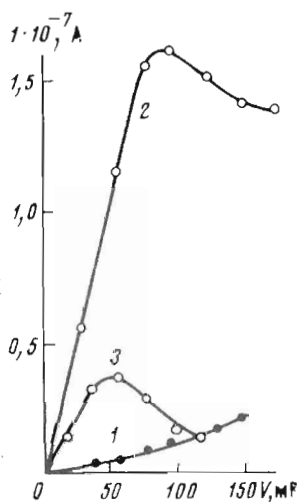


Рис. 13

Рис. 11. Зависимость поверхностного потенциала  $\Delta V$  (1) и давления  $\Delta P$  (2) монослоев  $Vm(Lys)$  от площади, приходящейся на одну молекулу; монослои нанесены на поверхность 0,01 М раствора  $KCl$ ;  $pH$  6,5

Рис. 12. Зависимость поверхностного потенциала ( $\Delta V$ ) монослоев  $Vm(Lys)$  от ионной силы подстилающих растворов:  $KCl$  (1) и  $NaCl$  (2). Приведенные значения поверхностного потенциала отвечают плато на кривых зависимости потенциала от сжатия монослоя;  $pH$  6,5

Рис. 13. Вольт-амперные характеристики мембран в растворах, содержащих  $1,3 \cdot 10^{-6}$  М  $Vm(Lys)$ ,  $10^{-5}$  М  $CuSO_4$ ,  $5 \cdot 10^{-5}$  М гидрохинон и  $KCl$  в различных концентрациях: 1 — 1 М  $KCl$  (контроль); 2 — 1 М  $KCl$  +  $10^{-5}$  М 1-метилтетрагидрохлорбензимидазол; 3 — 3 М  $KCl$  +  $10^{-5}$  М 1-метилтетрагидрохлорбензимидазол;  $pH$  3,5

мицину и некоторым его аналогам [11]  $Vm(Lys)$  обладает значительной поверхностной активностью. Как видно из рис. 11, у мономолекулярных слоев этого соединения при сжатии область коллапса достигается при давлении  $\sim 300$  дин/см<sup>2</sup>. Поверхностный потенциал таких монослоев, зависимость которого от площади, приходящейся на одну молекулу, показана на том же рисунке, положителен и достигает нескольких сотен милливольт — величины, характерной для циклодепептидов группы валиномицина [11]. Величина поверхностного потенциала монослоя зависит от концентрации  $KCl$  или  $NaCl$  в подстилающем растворе. При увеличении концентрации  $KCl$  или  $NaCl$  от  $10^{-2}$  до 1 М поверхностный потенциал несколько уменьшается (рис. 12). Этот эффект практически не зависит от природы катиона и, по-видимому, отражает изменение потенциала двойного электрического слоя, образованного протонированными аминогруппами циклодепептида и противоионами из водного раствора. Дальнейшее увеличение концентрации соли приводит к росту поверхностного потенциала, причем в случае калиевых растворов этот эффект выражен значительно сильнее. Зависящее от природы катиона увеличение поверхностного потенциала, вызванное комплексобразованием, наблюдается и у валиномициновых монослоев [11, 12]. Это дает основание полагать, что

у монослоев, образованных  $Vm(Lys)$ , увеличение поверхностного потенциала с ростом концентрации  $KCl$  также вызвано комплексообразованием. Хорошо выраженная зависимость величины поверхностного потенциала таких монослоев от концентрации  $KCl$  в подстилающем растворе позволяет оценить величину константы равновесия гетерогенной реакции комплексообразования. Из данных, приведенных на рис. 12, следует, что эта константа не превышает  $0,1 M^{-1}$ .

Таким образом,  $Vm(Lys)$  по своим свойствам на границе раздела вода — воздух, так же как и по мембранной активности, сходен с валиномицином, что указывает на идентичность механизма действия этих циклодепептидов.

Вместе с тем, поскольку молекула этого циклодепептида содержит протонируемую аминогруппу, то в бислойной мембране, как и в растворах, он может находиться и в нейтральной



и в протонированной



формах и функционировать не только как нейтральный, но и как положительно заряженный переносчик ионов  $K^+$ . В этом случае в соответствии с предсказаниями теоретической модели, предложенной Маркиным, Либберманом и др. [13], можно было бы ожидать, что при низких значениях  $pH$  на стационарных вольт-амперных характеристиках мембран появится участок с отрицательным наклоном. Такие участки могут возникнуть благодаря тому, что с увеличением электрического поля протонированные молекулы  $Vm(Lys)$  «отжимаются» к катодно поляризуемой границе мембраны и тем самым выводятся из цикла переноса катионов. Таким образом, с ростом напряжения должен уменьшаться внутримембранный поток не связанных с  $K^+$  молекул ионофора и, следовательно, скорость переноса ионов через анодно поляризуемую границу бислоя. В действительности такой «падающий» участок не наблюдается при любых значениях  $pH$  во всем диапазоне концентрации  $KCl$  (рис. 10). Это может быть следствием прежде всего малой внутримембранной концентрации протонированных молекул из-за большого положительного скачка потенциала на границе бислойной мембраны [14].

Как было показано ранее [14], этот положительный скачок электрического потенциала может быть уменьшен введением в состав липидного бислоя поверхностно-активных веществ, дипольные моменты молекул которых ориентированы антипараллельно диполям полярных групп липидов. Одним из таких веществ являются комплексы 1-метилтетрахлорбензимидазола с ионами одновалентной меди. Эти комплексы не изменяют проводимости мембран в отсутствие переносчиков ионов, но значительно увеличивают внутримембранный поток положительно заряженных липофильных молекул [14, 15].

Естественно предположить, что в присутствии модификаторов уменьшающих разность электрических потенциалов между мембраной и омывающими ее водными растворами, внутримембранная концентрация, а следовательно, и вклад протонированных молекул циклодепептида в транспорт ионов калия будут возрастать. Действительно, в концентрированных растворах  $KCl$  ( $\geq 1 M$ ) при  $pH$  3,5 в присутствии 1-метилтетрахлорбензимидазола и ионов  $Cu^+$  наряду с увеличением проводимости при нулевом токе, которое является следствием возрастания внутримембранного потока комплексов, на вольт-амперных характеристиках появляется участок с отрицательным наклоном (рис. 13).

Таким образом, трансмембранный перенос ионов калия в присутствии  $Vm(Lys)$  в этих условиях в значительной степени осуществляется двухзарядными комплексами



С другой стороны, полученный результат может служить прямым подтверждением упоминавшейся модели Маркина, Либермана и др. [13].

### Экспериментальная часть

Кристаллические комплексы соединений (VIII) — (XV) получали сливанием растворов свободных депсипептидов и избытка роданистого калия в этилацетате. Выпавшие осадки отфильтровывали, перекристаллизовывали из метанола; т. пл.  $> 350^\circ$  (с разл.).

ИК-спектры регистрировали на приборе UR-10 (ГДР) с призмами из LiF или NaCl. Образцы снимали в таблетке с KBr.

Кривые КД снимали на спектрополяриметре Cary-60 с приставкой CD-6001 («Varian», США) при концентрации растворов  $(2 \div 6) \cdot 10^{-4}$  М и  $23-26^\circ$ ; толщина кювет  $0,01-2,0$  см. Относительно метода расчета констант устойчивости комплексов по кривым КД см. работы [2,4]. В случае энниатиновых аналогов для расчета использовали длины волн  $225-230$  нм, а валиномициновых аналогов  $230$  нм. Контрольные опыты показали, что у природных депсипептидов добавление кислоты или основания не влияет на параметры кривых КД и на устойчивость  $K^+$ -комплексов. При исследовании кривых КД энниатиновых производных в растворах  $NaClO_4$ , содержащих HCl выпадал осадок NaCl, который перед измерением удалялся центрифугированием.

Условия кондуктометрических измерений см. в работе [3].

Солевые растворы для экстракционных опытов готовили из препаратов KCl марки ос.ч.-6-4 и дважды дистиллированной воды. рН водных растворов устанавливали добавлением  $0,1$  н. LiOH и  $2$  н. HCl. Уравновешивание водного ( $2,5$  мл  $1$  н. KCl +  $5,0 \cdot 10^{-4}$  М PiOH в серии А и  $5$  мл  $10^{-4}$  М KCl +  $0,75 \cdot 10^{-4}$  М PiOH в серии Б) и органического ( $2,5$  мл  $10^{-4}$  М  $Vm$ ,  $Vm(Lys)$  или  $Vm(Glu)$  в  $CH_2Cl_2$ ) растворов проводили их встряхиванием в течение  $3-5$  мин в делительной воронке. Контрольные опыты показали, что дальнейшее увеличение продолжительности встряхивания не сказывается на результатах. Оптическую плотность растворов после экстракции измеряли на приборе «Specord UV Vis» (ГДР), толщина кювет  $1$  см. Для расчета использовали данные по оптической плотности при длине волны  $376$  нм, отвечающей максимуму поглощения пикрат-аниона в хлористом метиле. Эксперименты в условиях полной экстракции пикрат-аниона валиномицином привели к значению коэффициента молярной экстинкции  $\epsilon = 1,9 \cdot 10^4$ , согласующемуся с литературными данными [6]. При рН  $5$  в органическую фазу переходит также небольшое количество ( $20\%$  от концентрации пикрат-аниона) пикриновой кислоты, слабо поглощающей при  $376$  нм ( $\lambda_{\text{макс}} = 339$  нм) и поэтому не мешающей определению пикрат-аниона. Данные, приведенные в табл. 4, являются средними значениями из  $3-4$  опытов.

При опытах с U-образной трубкой на ее дно помещали  $10^{-4}$  М раствор  $Vm(Glu)$  в хлористом метиле, в правую часть —  $1$  н. KCl в воде, в левую часть — воду (обе части были закрыты трубочками с натронной известью); рН измеряли, отбирая по  $0,5$  мл раствора из каждого колена трубки.

Липосомы получали из яичного лецитина в растворе  $0,15$  М KCl. Приготовление липосом и измерение их проницаемости для  $K^+$  под действием ионофоров проводили как описано в работе [9].

Липиды для опытов с бислойнными мембранами выделяли из мозга быка по методу Мюллера и др. [16]. Растворы KCl и NaCl готовили из ре-

активов марки ос.ч и дважды дистиллированной воды. Исследование электрических свойств мембран выполняли на установке, подобной описанной в работе [17], в стеклянной термостатированной ( $30 \pm 1^\circ$ ) ячейке объемом 20 мл, снабженной внутренним тефлоновым перфорированным стаканчиком (площадь отверстия для мембраны  $0,03 \text{ см}^2$ ). В качестве измерительных использовали Ag/AgCl-электроды площадью примерно  $0,5 \text{ см}^2$ . Для формирования мембраны использовали раствор липидов в гептане марки «эталонный» (около 15 мг/мл). Циклодепептид и 1-метилтетрахлорбензимидазол вносили в водный раствор в виде растворов в этаноле, причем концентрация последнего не превышала 0,5%.

Комплексы одновалентной меди с 1-метилтетрахлорбензимидазолом получали введением последнего в водный раствор, содержащий  $\text{CuSO}_4$  и гидрохинон в качестве восстановителя.

Измерения поверхностного потенциала монослоев на границе раздела вода — воздух проводили с помощью установки, аналогичной описанной в работе [18]. Эта установка позволяла автоматически регистрировать зависимость поверхностного потенциала от площади монослоя. Циклодепептид в виде раствора в *n*-гептане (не более 0,1 мл) наносили на поверхность водного раствора KCl или NaCl, заполняющего ванну из органического стекла площадью  $850 \text{ см}^2$  с парафинированными бортами и тефлоновой пластинкой в качестве подвижного барьера.

Поверхностное давление монослоя, нанесенного на поверхность солевого раствора, заполняющего описанную выше ванну, измеряли методом Вильгельми [19]. Периметр поперечного сечения платиновой пластинки составлял 4 см. Непрерывную регистрацию изменения веса пластинки при сжатии монослоя осуществляли с помощью механотрана 6МХ1С.

Авторы выражают благодарность Н. А. Скобелеву за кондуктометрические измерения и Л. Б. Сенявиной — за снятие ИК-спектров.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Иванов В. Т., Сумская Л. В., Михалева И. И., Лайне И. А., Рябова И. Д., Овчинников Ю. А. (1974) *Химия природы. соедин.*, 346—358.
2. Ovchinnikov Yu. A., Ivanov V. T., Evstratov A. V., Mikhaleva I. I., Bystrov V. F., Portnova S. L., Balashova T. A., Mescheryakova E. A., Tulchinsky V. M. (1974) *Int. J. Peptide Prot. Res.*, 6, 465—498.
3. Андреев И. М., Маленков Г. Г., Шкроб А. М., Шемякин М. М. (1971) *Молекулярн. биология*, 5, 614—623.
4. Shemyakin M. M., Ovchinnikov Yu. A., Ivanov V. T., Antonov V. K., Vinogradova E. I., Shkrob A. M., Malenkov G. G., Evstratov A. V., Laine I. A., Melnik E. L., Ryabova I. D. (1969) *J. Membr. Biol.*, 1, 402—430.
5. Иванов В. Т., Лайне И. А., Абдуллаев Н. Д., Плетнев В. З., Липкинд Г. М., Архипова С. Ф., Сенявина Л. Б., Мецерыкова Е. А., Попов Е. М., Быстров В. Д., Овчинников Ю. А. (1971) *Химия природы. соедин.*, 221—246.
6. Eisenman G., Ciani S. M., Szabo G. (1969) *J. Membr. Biol.*, 1, 294—345.
7. Овчинников Ю. А., Иванов В. Т., Шкроб А. М. (1974) *Мембрано-активные комплексы*, «Наука», М.
8. Ashton R., Steinrauf L. K. (1970) *J. Mol. Biol.*, 49, 547—556.
9. Барсуков Л. И., Шкроб А. М., Бергельсон Л. Л. (1972) *Биофизика*, 17, 1032—1036.
10. Шкроб А. М., Мельник Е. И., Терехов О. П., Овчинников Ю. А. (1973) *Биофизика*, 18, 649—654.
11. Маленков Г. Г., Римская В. А., Терехов О. П. (1972) Тезисы доклада на IV Международном биофизическом конгрессе, ЕХв 4/5, с. 150—151, М.
12. Kemp G., Wenner S. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, 232, 116—123.
13. Маркин В. С., Пастушенко В. Ф., Кришталик Л. И., Либерман Е. А., Топалы В. П. (1969) *Биофизика*, 14, 462—473.
14. Демян В. В., Бабаков А. В., Шкроб А. М. (1971) *Биофизика мембран*, ч. 1, с. 337—347, Каунас.
15. Демян В. В., Шкроб А. М., Овчинников Ю. А. (1972) Тезисы доклада на IV Международном биофизическом конгрессе, ЕХв 4/4, с. 148—149, М.
16. Mueller P., Rudin D. O. (1963) *J. Phys. Chem.*, 67, 534—540.
17. Либерман Е. А., Мохова Б. Н., Скулачев В. П., Топалы В. П. (1968) *Биофизика*, 13, 188—193.

18. Бабаков А. В., Мягков И. В., Сотников П. С., Терехов О. П. (1972) Журн. физ. химии, 46, 1873—1876.  
19. Wilhelmy G. H. (1979) Proc. K. Akad. Witsensch., Amsterdam, 21, 357—362.

Поступила в редакцию  
22.X.1975

## VALINOMYCIN AND ENNIATIN B FUNCTIONAL DERIVATIVES AS COMPLEXONES AND IONOPHORES

SUMSKAYA L. V., CHEKHLIYAeva N. M., BARSUKOV L. I.,  
TEREKHOV O. P., DJOMIN V. V., SHKROB A. M., IVANOV V. T.,  
OVCHINNIKOV Yu. A.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy  
of Sciences of the USSR, Moscow*

Valinomycin (Vm) and Enniatin B (En) analogs possessing amino and carboxyl groups in their side chains have been shown to form complexes with  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  and to transport  $\text{K}^+$  in artificial membrane systems. All the investigated compounds induce potassium permeability in lecithin liposomes and bind metal ions in solutions both in ionized and in non-ionized form. The ionized side chain carboxyl in the  $\text{K}^+$  complex of En(Glu) was shown to interact with the  $\text{K}^+$  cation located in the molecular cavity. In the two-phase systems, the functional derivatives of valinomycin have different charges at different pH. Vm(Lys) complexes at pH 7—9 and Vm(Glu) complexes at pH 5—7 have + 1 charge; valinomycin complexes at all the pH have + 1 charge. At pH 5 Vm(Lys) gives a two-charged complexes, and Vm(Glu) complex at pH 9 bears no charge at all, similarly to nigericine ionophores. At the water-air interface and in bilayer membranes Vm(Lys) properties are similar to those of valinomycin. Vm(Lys) enhances  $\text{K}^+$  permeability of lipid bilayers and is highly K/Na selective. Application of dipole modifiers has shown that in acid media,  $\text{K}^+$  can be transported across membranes by two-charged complexes.

---