



УДК 547.962.04+543.4

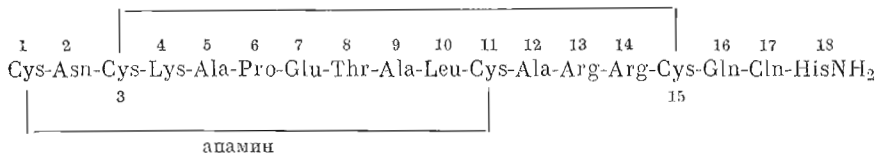
ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК НЕЙРОТОКСИНА АПАМИНА ИЗ ЯДА МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ *APIS MELLIFICA*

*Мирошников А. И., Елякова Е. Г., Куделин А. В.,
Сенявина Л. Б.*

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

Исследованы спектры КД нейротоксина апамина из яда пчелы *Apis mellifica* в растворе при различных значениях рН. Показано, что апамин обладает стабильной конформацией, практически не зависящей от рН раствора, полярности среды, добавления денатурирующих агентов. Химическая модификация апамина по функциональным группам боковых цепей не влияет на пространственное строение его молекулы.

В последнее время нейротоксины из ядов различных животных успешно используются при изучении тонких механизмов процесса передачи нервного возбуждения. В отличие от нейротоксинов ядов змей, скорпионов, морских анемонов, специфически действующих на периферическую нервную систему, один из нейротоксинов яда медоносной пчелы *Apis mellifica*, апамин, поражает прежде всего центральную нервную систему [1—3]. Строение апамина, полипептида из 18 аминокислотных остатков с двумя дисульфидными связями, было установлено в 1967—1978 гг. [4—6]. Сравнительная простота молекулы, возможность химической модификации без существенной потери токсичности [2, 3] и, наконец, полный химический синтез [7, 8] позволяют успешно использовать этот нейротоксин при исследовании нейрофизиологических процессов.



Целью настоящей работы явилось изучение методом кругового дихроизма конформационной подвижности молекулы апамина, а также ряда его модифицированных аналогов.

Для выделения апамина из яда пчелы была использована методика, предложенная в 1976 г. Гульди и сотр. [9]. Низкомолекулярная фракция ($M < 5000$), полученная после диализа раствора яда в аммоний-ацетатном буфере, была разделена на СМ-целлюлозе (рис. 1). По данным ТСХ на силикагеле, апамин * содержится в двух фракциях: I и II. Эти фрак-

* Для сравнения использован образец апамина, полученный от Е. Хаберманна (Гиссен, ФРГ).

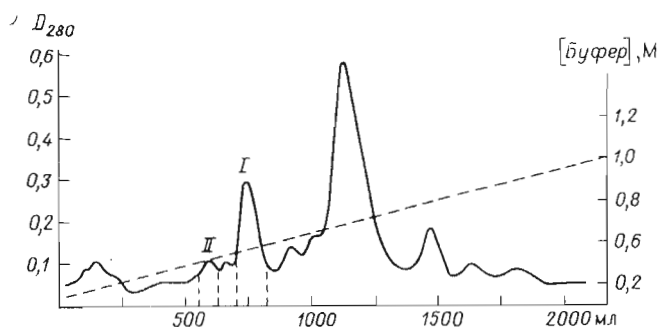


Рис. 1. Разделение низкомолекулярной фракции пчелиного яда на СМ-целлюлозе ($2,5 \times 35$ см) в градиенте аммоний-ацетатного буфера, рН 4,7. I и II — фракции, содержащие апамин

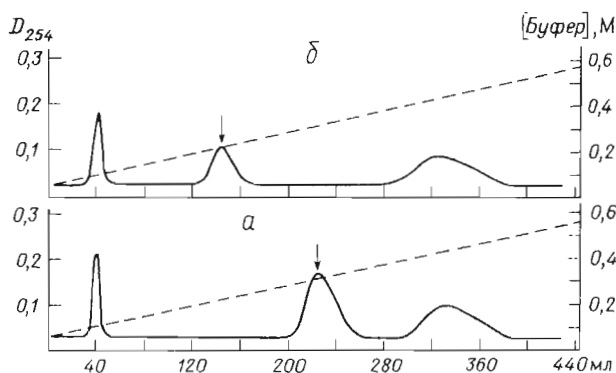


Рис. 2. Выделение апамина-1 (а) и апамина-2 (б) на колонке ($1,5 \times 10$ см) с Bio-Rex-70 в градиенте аммоний-ацетатного буфера (рН 7,5). Стрелкой указаны пики, отвечающие апамину

ции были рехроматографированы на ионообменной смоле Bio-Rex-70 (рис. 2а и б). Как видно из рис. 2, препараты, выделенные из фракций I и II, несколько различаются по хроматографическому поведению, хотя их аминокислотный состав и токсичность практически совпадают. N-Концевой анализ апамина-1 (фракция II) и апамина-2 (фракция I) дан-сильным методом показал, что N-концевой аминокислотный остаток апамина-2 блокирован. Природа блокирующего остатка в настоящее время выясняется.

Спектры КД апамина изучали в водных растворах при различных концентрациях токсина и различных значениях рН и ионной силы, а также в растворителях различной полярности.

На рис. 3 представлены кривые КД водных растворов апамина при различных значениях рН. В области $\pi \rightarrow \pi^*$ - и $n \rightarrow \pi^*$ -переходов пептидной группы наблюдается положительная полоса при ~ 190 и отрицательная при 208 нм с плечом при ~ 220 нм. Форма кривых и величина молекулярной эллиптичности сходны как со спектрами КД спиральных полипептидов и белков, так и со спектрами циклопептидов (например, грамицидина S), имеющих жесткую структуру типа «складчатый лист» [10, 11]. Из рис. 3 видно, что для трех указанных значений рН величина, положение и контур кривых КД остаются практически неизменными. На основании этих данных можно сделать вывод о стабильности структуры апамина в водных растворах в достаточно широком интервале рН. Изучение спектров КД апамина в водном диоксане, трифторэтаноле и водных растворах хлоргид-

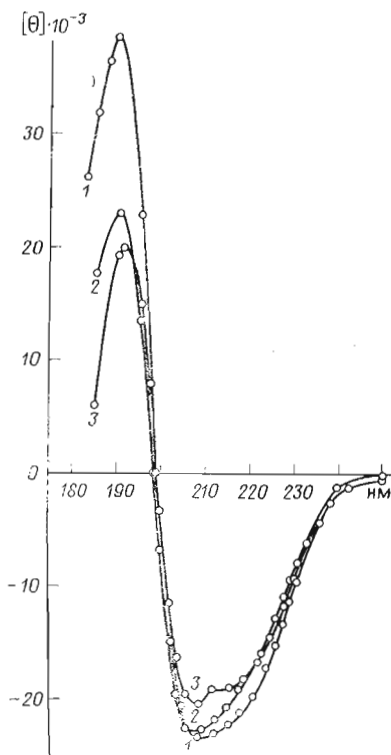


Рис. 3

Рис. 3. Спектры КД апамина в водных растворах при различных значениях pH (в скобках приведена концентрация, мМ): 1 — 7,1 (0,28), 2 — 2,3 (0,13), 3 — 12,3 (0,27)

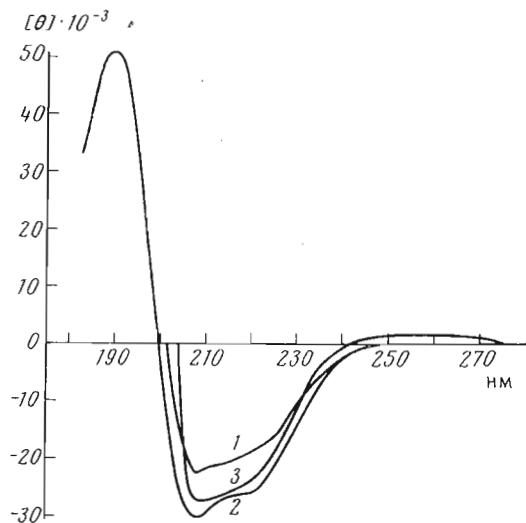


Рис. 4

Рис. 4. Кривые КД апамина в смеси диоксан — вода, 3 : 1 (1), трифторэтаноле (2), 6 М хлоридате гуанидина (3)

рата гуанидина (рис. 4) показывает, что полярность среды не оказывает существенного влияния на общую конформацию нейротоксина. Увеличение ионной силы раствора путем добавления NaCl вплоть до концентрации 1 М не влияет на спектр апамина. Даже в 5,3 М растворе LiCl наблюдается лишь незначительное уменьшение молекулярной эллиптичности отрицательной полосы КД.

Таким образом, во всех рассмотренных случаях кривые КД мало изменяются, что дает возможность сделать вывод об исключительной устойчивости конформации нейротоксина. Для решения вопроса о наличии ассоциации апамина в водных растворах была исследована концентрационная зависимость. Как видно из рис. 5, при изменении концентрации апамина в пределах трех порядков (от 4,6 до $2,7 \cdot 10^3$ мМ) не наблюдается существенных изменений спектров КД, что указывает на отсутствие заметной ассоциации.

Можно предположить, что обнаруженная конформационная устойчивость апамина обусловлена наличием двух дисульфидных мостиков в одной полипептидной цепи, состоящей всего из 18 аминокислотных остатков. Однако в апаине имеется несколько функциональных групп (амино- и гуанидиновые группы, свободная карбоксильная группа и имидазольный остаток гистидина), также способных внести определенный вклад в стабилизацию молекулы нейротоксина. С целью выяснения влияния этих групп на общее конформационное состояние апамина была проведена химическая модификация по функциональным группам и исследованы спектры КД полученных производных.

Рис. 5. Кривые КД апамина в водных растворах при различных концентрациях, мМ (в скобках приведена толщина слоя, см): 1 — 4,6 (0,001), 2 — 0,54 (0,01), 3 — 0,283 (0,01), 4 — $2,79 \cdot 10^{-2}$ (0,1); 5 — $2,74 \cdot 10^{-3}$ (1)

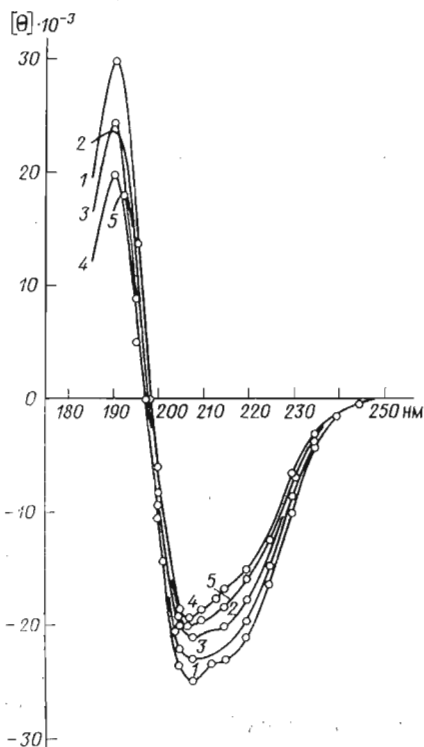


Рис. 6. Разделение ацетилированных аналогов апамина на Bio-Rex-70 ($1,5 \times 6$ см) в градиенте аммоний-ацетатного буфера, pH 7,0: I — [Ac-Cys¹, Lys⁴(Ac)]апамин, II — [Lys⁴(Ac)]апамин, III — [Ac-Cys¹]апамин, IV — апамин

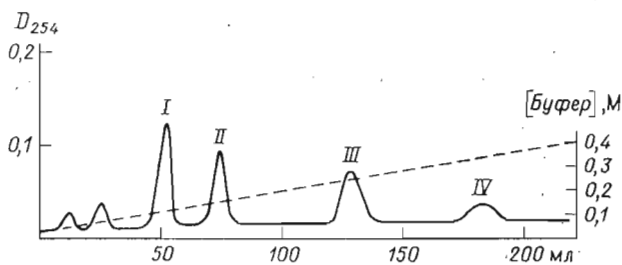


Рис. 5

Рис. 6

При обработке апамина 1,5-кратным избытком N-оксисукцинимидного эфира уксусной кислоты и последующем разделении продуктов реакции на ионообменной смоле Bio-Rex-70 были выделены диацетилапамин, N^α-Cys¹-ацетилапамин и N^ε-ацетил-Lys⁴-апамин (рис. 6).

Обработкой апамина избытком янтарного ангидрида было получено дисукцинилное производное апамина, несущее две дополнительные карбоксильные группы. Свободная карбоксильная группа остатка глутаминовой кислоты (в положении 7) была превращена в метиловый эфир обработкой нейротоксина 0,1 М раствором HCl в абсолютном метаноле. Аналогичная модификация была проведена и для диацетилированного аналога апамина. Остатки аргинина в положении 13 и 14 были превращены в производные пиримидина обработкой токсина тетраэтоксипропаном в 10 н. HCl [12]. C-Концевой остаток гистидина был модифицирован обработкой диэтилпирикарбонатом по ранее описанной методике [13]. Данные по биологической активности производных апамина приведены в таблице.

Химическая модификация всех функциональных групп, за исключением гуанидильных остатков аргинина, практически не влияет на биоло-

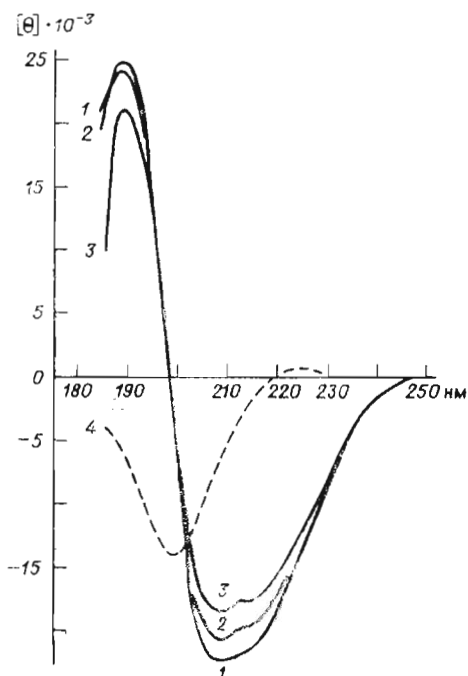


Рис. 7. Кривые КД модифицированных производных апамина: 1 — [Ac-Cys¹, Lys⁴(Ac)]-, 2 — [His¹⁸(EtOCO)]-, 3 — [Orn¹³(Pyr), Orn¹⁴(Pyr)]-, 4 — дез-Arg¹⁴-[Ac-Cys¹, Lys⁴(Ac)]-

Таким образом, в результате проделанной работы показано, что стабильная конформация апамина обеспечивается наличием двух дисульфидных связей в полипептидной цепи молекулы, состоящей из 18 аминокислотных остатков. Функциональные остатки боковых цепей аминокислот не оказывают существенного влияния на пространственное строение молекулы нейротоксина. Биологическая активность апамина, по-видимому, в большой степени определяется наличием свободных гуанидиногрупп остатков аргинина, специфически закрепленных в бициклической структуре нейротоксина.

Экспериментальная часть

Яд медоносной пчелы *Apis mellifica* был получен из Научно-исследовательского института химии, Горьковского университета им. Н. Г. Лобачевского. Лиофилизированный пчелиный яд (50 г) растворяли в 2 л 0,05 М аммоний-ацетатного буфера (рН 4,7) и диализовали с помощью СНДР/15 Mini Plant Dialyzer (США) при постоянном объеме растворенного яда. После лиофилизации низкомолекулярной фракции получали 15 г продукта. Продукт (1 г) растворяли в 0,1 М аммоний-ацетатном буфере (рН 4,7) и хроматографировали на колонке с СМ-целлюлозой (2,5 × 35 см), уравновешенной тем же буфером. Колонку промывали 300 мл стартового буфера и затем элюировали линейным градиентом аммоний-ацетатного буфера от 0,1 до 1 М (рис. 1). Хроматографический анализ в тонком слое силикагеля Eastman 6060 Silica Gel (Kodak, США) в системе *n*-бутанол — пиридин — вода — уксусная кислота (15 : 10 : 12 : 3) (проявление нингидрином, сравнение с апамином, полученным от Хаберманна (Гиссен, ФРГ)) показал, что апамин содержится как во фракции I, так и во фракции II. Окончательную очистку каждой фракции проводили на колонке (1,5 × 10 см) с ионо-

гическую активность апамина. Одновременная модификация нескольких функциональных групп, например свободных аминогрупп (N-концевой и N^ε-аминогруппы лизина) и карбоксильной группы остатка глутаминовой кислоты, приводит к практически полной потере токсичности.

Из спектров КД модифицированных производных апамина (рис. 7) видно, что химическая модификация слабо влияет на общую конформацию бициклической структуры нейротоксина. Из этого следует, что функциональные группы аминокислотных остатков практически не участвуют в стабилизации пространственной структуры молекулы апамина, которая, по-видимому, определяется основной полипептидной цепью, стабилизированной двумя дисульфидными связями. Для проверки этого предположения мы расщепили полипептидную цепь нейротоксина в положении 13—15 обработкой N^α,N^ε-ди-ацетилапамина трипсином. Удаление остатка аргинина-14 из молекулы полностью дестабилизирует конформацию нейротоксина, как это видно из рис. 7 (кривая 4).

Производное апамина *	LD ₅₀ мод./LD ₅₀ нат. [14]
[Ac-Cys ¹]-	1,5
[Lys ⁴ (Ac)]-	1,5
[Ac-Cys ¹ , Lys ⁴ (Ac)]-	2,5
[Suc [*] -Cys ¹ , Lys ⁴ (Suc)]-	3,0
[Glu ⁷ (OMe)]-	2,0
[Ac-Cys ¹ , Lys ⁴ (Ac), Glu ⁷ (OMe)]-	>20
[Orn ¹³ (Pyr), Orn ¹⁴ (Pyr)]-	>20
[His ¹⁸ (EtOCO)]-	2,0
дез-Arg ¹⁴ -[Ac-Cys ¹ , Lys ⁴ (Ac)]-	>20

* Suc — сукцинил, Pyr — пиримидил—; остальные сокращения приведены в соответствии с рекомендациями комиссии по номенклатуре IUPAC—IUB (Eur. J. Biochem. (1977) 80, 1—17).

обменной смолой Bio-Rex-70, уравновешенной 0,1 М аммоний-ацетатным буфером (рН 7,5) с использованием линейного градиента этого буфера от 0,1 до 0,55 М (рН 7,3) (рис. 2а, б). Апамин-1 и апамин-2 хроматографически однородны, их аминокислотный состав, определенный после 24-часового гидролиза в 6 н. HCl, одинаков.

Спектры КД сняты на дихрографе Jouan 111 (Jobin-Yvon, Франция). Результаты выражены в величине [θ] — «молекулярная эллиптичность» (град·см²·моль⁻¹). Молекулярный вес апамина равен 2036. Концентрация раствора 0,5 мг/мл, толщина слоя 0,01 см.

Ацетилирование апамина. Апамин (45 мг) растворяли в 2,5 мл натрий-фосфатного буфера (рН 7,2) и добавляли 4,5 мг N-оксисукцинимидного эфира уксусной кислоты. После 2-часового перемешивания при 25° реакционную смесь обессоливали на колонке (1,5×20 см) с биогелем P-2 в 1% уксусной кислоте, продукты разделяли на колонке (1,5×6 см) с Bio-Rex-70, уравновешенной 0,05 М аммоний-ацетатным буфером (рН 7,0). При элюировании линейным градиентом аммоний-ацетатного буфера от 0,1 до 0,4 М (рН 7,0) были выделены (рис. 6) диацетильное производное (10,3 мг) (фракция I), N^ε-ацетил-Lys⁴-апамин (6,8 мг) (фракция II) и N^α-ацетил-Cys¹-апамин (6,2 мг) (фракция III). В последней фракции (IV) был найден свободный апамин (4 мг). Идентификацию моноацетильных производных проводили дансильным методом.

Сукцинирование апамина. Апамин (11,7 мг, 5,43 мкмоль) растворяли в 3,9 мл 0,1 натрий-бикарбонатного буфера (рН 8,7) и добавляли 75 мг янтарного ангидрида. Через 30 мин реакционную смесь обессоливали на колонке с P-2, уравновешенной 5% уксусной кислотой. Окончательную очистку продукта проводили на колонке (1,5×6 см) с Bio-Rex-70, уравновешенной 0,05 М аммоний-ацетатным буфером (рН 7). При элюировании линейным градиентом от 0,05 до 0,1 М аммоний-ацетатного буфера (рН 7) был выделен N^α,N^ε-дисукциноилапамин (9,6 мг). Полнота ацилирования проверена дансильным методом.

Метилловый эфир апамина. Апамин (14,7 мг, 7,2 мкмоль) растворяли в 3 мл абс. метилового спирта, насыщенного HCl (0,1 н.), и перемешивали 2 ч при комнатной температуре. Продукт обессоливали хроматографией на биогеле P-2 в 1% уксусной кислоте. N-Концевой анализ не показал наличия остатка треонина, что могло бы быть в результате N → O-ацильной миграции. Аналогично была проведена реакция и с диацетильным производным апамина.

Модификация по остаткам аргинина. Апамин (10,8 мг, 5,29 мкмоль) растворяли в 0,1 мл воды и добавляли 3 мл конц. HCl и 1 мл тетрагидроксипропана. Реакционную смесь перемешивали 2 ч при 4°. Затем раствор нейтрализовали до рН 3,5 добавлением бикарбоната аммония. После обессоливания на колонке с сефадексом G-10 в 5% уксусной кислоте и

последующей очистки на колонке с Bio-Rex-70, уравновешенной 0,01 М аммоний-ацетатным буфером (рН 7), с использованием градиентного элюирования от 0,01 до 0,1 М аммоний-ацетатного буфера (рН 7) был выделен дипириимидил-Огп¹³, Огп¹⁴-апамин. Полнота превращения остатков аргинина в остатки производного пиримидина была показана отсутствием специфической окраски при обработке продукта реагентом Сакагучи.

Модификация остатка гистидина. Апамин (10,8 мг) растворяли в 0,2 мл 0,5 М натрий-фосфатного буфера (рН 7,5), содержащего 0,15 М NaCl, и при 0° добавляли раствор 0,5 мл диэтилпирокарбоната в 0,5 мл этанола. Через 2 ч продукт обессоливали на биогеле Р-2 в 1% уксусной кислоте. Полноту модификации контролировали по снижению адсорбции при 242 нм [13].

Расщепление диацетилапамина трипсином. Диацетилапамин (13 мг) растворяли в 3 мл 0,02 М трис-НСl-буфера (рН 7,5), содержащего 0,1М NaCl и 0,01 М CaCl₂, добавляли 1 мг трипсина и инкубировали 20 ч при 25°. После гель-фильтрации на биогеле Р-2 (2×50 см) в 1% уксусной кислоте лиофилизированный продукт растворяли в 0,01 М аммоний-ацетатном буфере (рН 7,0) и хроматографировали на Bio-Rex-70, уравновешенном тем же буфером, с использованием линейного градиента от 0,01 до 0,1 М аммоний-ацетатного буфера (рН 7,0). Аминокислотный анализ показал отсутствие одного остатка аргинина.

Токсичность была выражена в LD₅₀ на белых мышах, согласно методике Миранда и согр. [14].

Авторы выражают благодарность руководителю настоящей работы акад. Ю. А. Овчинникову за участие в обсуждении результатов и критические замечания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Habermann E., Cheng-Raude D. (1975) *Toxicon*, 13, 465—473.
2. Cheng-Raude D., Treloar M., Habermann E. (1976) *Toxicon*, 14, 467—476.
3. Vincent J. P., Schweitz H., Lazdunski M. (1975) *Biochemistry*, 14, 2521—2525.
4. Haux P., Sawerthai H., Habermann E. (1967) *Hoppe-Seyler Z. Physiol. Chem.*, 347, 737—743.
5. Shipolini R., Bradbury A. F., Callewaert G. L., Vernon C. A. (1967) *Chem. Commun.*, 679—680.
6. Callewaert G. L., Shipolini R., Vernon C. A. (1968) *FEBS Lett.*, 1, 111—113.
7. Van Rietschoten J., Granier C., Rochat H., Lissitzky S. (1976) *Eur. J. Biochem.*, 56, 35—40.
8. Cosand W. L., Merrifield R. B. (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 74, 2771—2775.
9. Gauldie J., Hanson J. M., Rumjanek F. D., Shipolini R. A., Vernon C. A. (1976) *Eur. J. Biochem.*, 61, 369—376.
10. Болотина И. А. (1973) сб. «Итоги науки и техники», Молекулярная биология, т. 1, с. 61—84, М.
11. Мирошников А. И., Снежкова Л. Г., Сычев С. В., Червин И. И., Сениавина Л. В., Иванов В. Т., Овчинников Ю. А. (1977) *Биоорг. химия*, 3, 180—191.
12. Модянов Н. Н., Мурапов А. В. (1974) Тезисы докладов 3-го Всесоюзного симпозиума по химии пептидов и белков, с. 101, Киев.
13. Аваева С. М., Краснова В. И. (1975) *Биоорг. химия*, 1, 1600—1605.
14. Miranda F., Koreyan C., Rochat H., Rochat C., Lissitzky S. (1970) *Eur. J. Biochem.*, 16, 514—523.

Поступила в редакцию
26.1.1978

PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISTICS OF APAMIN, A NEUROTOXIN FROM HONEY-BEE *APIS MELLIFICA*

MIROSHNIKOV A. I., ELYAKOVA E. G., KUDELIN A. B., SENYAVINA L. V.

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

The CD spectra of apamin were taken over a wide range of conditions. The neurotoxin was found to have a stable conformation, showing virtually no dependence of the CD curves on pH, polarity of the medium, or the presence of denaturing agents. The apamin spatial structure was also unaffected by chemical modification of side-chain functional groups.