

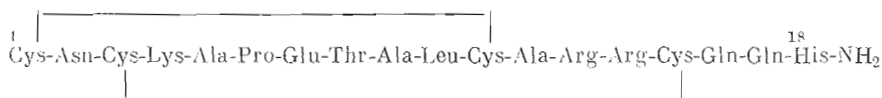


УДК 547.963.04

ВОССТАНОВЛЕНИЕ — РЕОКИСЛЕНИЕ АПАМИНА
И ЕГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ЖИДКИМ ФТОРИСТЫМ ВОДОРОДОМ*Нурибдинов А. Р., Елякова Е. Г., Малькова В. П.,
Цетлин В. И., Иванов В. Т.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Проведено исследование замыкания дисульфидных связей в восстановленном апаминоне. Показано, что реокисление и последующая хроматография на СМ-целлюлозе в описанных в литературе условиях приводят к неиндивидуальному продукту. Пептид, идентичный природному апамину по токсичности, данным ТСХ и КД, получен после дополнительной хроматографии на катионообменнике биорекс 70. Обнаружено, что данные КД являются наиболее надежным критерием при оценке идентичности получаемых продуктов природному апамину. Исследована устойчивость нативной и восстановленной форм апамина к действию жидкого HF . Идентичный природному апамину продукт удается получить после реокисления и хроматографии только в том случае, если при обработке HF восстановленного апамина используются тиолзащитные реагенты.

Апамин, содержащийся в яде пчел, является нейротоксином, действующим на центральную нервную систему. Выделение, изучение свойств и установление структуры апамина были осуществлены почти одновременно двумя группами исследователей, показавшими, что он представляет собой 18-членный пептид, имеющий 2 дисульфидных мостика [1—8]:



С помощью химической модификации получены некоторые данные о зависимости между структурой и функцией апамина [9, 10]. Исследования его пространственного строения спектральными методами [10, 11] выявили высокую конформационную стабильность молекулы и позволили детально охарактеризовать пространственное состояние части аминокислотных остатков [11]. Для дальнейшего развития этой работы необходимо иметь такие аналоги апамина, которые могут быть получены только синтетическим путем.

Хотя число аминокислотных остатков в апаминоне сравнительно невелико, его синтез представляет собой достаточно сложную задачу из-за высокого содержания в молекуле трифункциональных аминокислот, а также из-за необходимости образования на последней стадии двух определенным образом замкнутых дисульфидных связей. Поэтому, прежде чем приступить к синтезу аналогов, необходимо было убедиться, что обычно используемые синтетические методы в случае самого апамина приводят к продукту, идентичному природному. Полный синтез апамина является предметом следующего сообщения * [12].

* См. следующую статью в этом номере журнала.

Настоящая работа была предпринята с целью найти оптимальные условия удаления защитных групп на последней стадии синтеза, а также условия замыкания дисульфидных связей и выделения желаемого продукта. Для этого на образце природного апамина разработана методика его выделения после восстановления дисульфидных связей и окисления сульфгидрильных групп, а также изучена устойчивость нативной и восстановленной форм апамина к действию жидкого HF, применяемого для деблокирования синтетических защищенных пептидов.

В работах [9,13] сообщалось о том, что восстановление апамина протекает достаточно легко и приводит к продукту, полностью лишенному биологической активности. В этих же публикациях описано восстановление восстановленного природного апамина, однако полученный после гель-хроматографии на биогеле Р-4 продукт имел лишь 50—70% исходной активности токсина. Выделение синтетического апамина и его аналогов [14, 15] проводилось с использованием как гель-хроматографии, так и ионообменной хроматографии. Однако, поскольку при работе с апамином не был получен продукт, идентичный природному, становится очевидной необходимость специального исследования поведения сульфгидрильных групп в условиях деблокирования и их окисления, а также последующих хроматографических стадий выделения желаемого продукта.

Мы восстанавливали дисульфидные связи дитиотреитом (10-кратный избыток в расчете на каждую образующуюся SH-группу) в течение 6—8 ч при комнатной температуре, восстановитель и соли отделяли гель-фильтрацией в кислой среде, пептидную фракцию лиофилизировали. После удаления восстановителя отмечено спонтанное окисление сульфгидрильных групп, которое не удается предотвратить даже проведением обессоливания в 1% уксусной кислоте при 4° в токе азота: количество SH-групп (определенное реакцией Эллмана [16]) в элюате сразу после выхода с колонки не превышало 2,5—3,5 мкмоль SH/мкмоль пептида, а после лиофилизации составляло 2—2,5. Реокисление восстановленного апамина и последующую хроматографию проводили в условиях работы [14], причем, как оказалось, результаты не зависели от того, использовался ли лиофилизированный препарат, или же элюат после обессоливания разбавляли до необходимого объема буфером, применявшимся для реокисления, и далее доводили рН до 8,0.

После реокисления апамин выделяли с помощью хроматографии на СМ-целлюлозе СМ-32 (рис. 1), как это было предложено для синтетического апамина [14], при этом выход фракции, обладающей нейротоксической активностью (на рисунке отмечена), составил 42% (в расчете на исходный апамин). В работе [13] для реокисления апамина приведен выход 70%, однако в этом случае продукт не подвергался очистке с помощью ионообменной хроматографии.

Следует остановиться более подробно на определении биологической активности апамина. В литературе приводятся значения LD_{50} 4 [1, 3, 5] и 3—5 мг/кг [8], а также описание характерных эффектов апамина (судороги и т. д. [5]). Найденная для использовавшегося нами препарата природного апамина величина LD_{50} составляла 3—3,5 мг/кг на мышах. Было также показано, что при дозах 1,5 мг/кг симптомы, характерные для апамина, выражены очень слабо, а при 1,0 мг/кг отсутствуют.

Поскольку чувствительность к апамину сильно зависит от индивидуального состояния животных, для определения значений LD_{50} для различных фракций разделения восстановленного — реокисленного природного апамина потребовались бы испытания на больших группах животных, что в ряде случаев невозможно из-за малых количеств вещества. В связи с этим испытания проводились на группе из 5—6 животных и имели в значительной степени качественный характер.

Полученный после хроматографии на СМ-целлюлозе СМ-32 реокисленный апамин имеет кривую КД того же типа, что и природный (рис. 2),

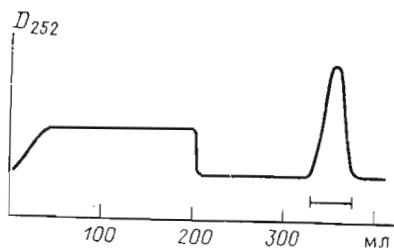


Рис. 1

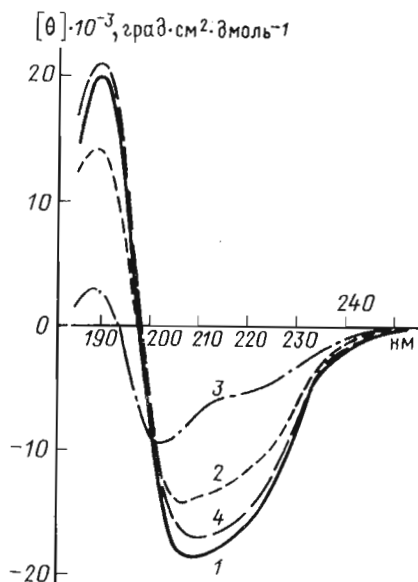


Рис. 2

Рис. 1. Хроматография реокисленного апамина на колонке с СМ-целлюлозой СМ-32 ($1 \times 2,5$ см). 0 — 200 мл — нанесение раствора, в котором проводилось реокисление (после подкисления до pH 5,1), промывка 0,1 М аммоний-ацетатным буфером, pH 5,1 (20 мл), градиент аммоний-ацетатного буфера 0,1 М, pH 5,1 (100 мл) — 0,2 М, pH 6,5 (50 мл), далее 0,2 М аммоний-ацетатный буфер, pH 6,5 (40 мл). Отмечена фракция, проявляющая активность апамина

Рис. 2. Кривые КД (в воде) нативного апамина (1), восстановленного и реокисленного апамина после хроматографии на СМ-целлюлозе СМ-32 (2), фракций Б и В рис. 3 (3, 4 — соответственно). Здесь и на рис. 6 приведены значения $[\theta]$ в расчете на один остаток

но значения молярной эллиптичности при всех длинах волн существенно ниже. По данным аминокислотного анализа (таблица), в полученном образце в пропорциях, отвечающих природному апамину, присутствуют все необходимые аминокислоты, однако содержание пептидного материала в нем не превышало 60%. С помощью гель-хроматографии на сефадексах G-10, G-15, а также G-25 и биогеле Р-4 (использовавшихся в работах [13, 14]) не удалось освободиться от примесей. Очистка препарата была проведена хроматографией на катионообменнике биорекс 70 в градиенте аммоний-ацетатного буфера (рис. 3).

Фракция А выделена в незначительных количествах, не позволивших провести ее дальнейший анализ. Кривая КД (рис. 2) фракции Б существенно отличается от кривых КД нативного апамина и продукта, полученного после хроматографии на СМ-целлюлозе СМ-32. С другой стороны, фракция В (полученная с выходом 25% в расчете на наносившийся на колонку продукт и 10,5% в расчете на исходный апамин) элюируется при тех же условиях и имеет ту же кривую КД, что и нативный токсин. При дозах 8 мг/кг фракции Б и В вызывают типичные симптомы действия апамина и гибель животных, однако при дозе 4 мг/кг токсичностью обладает только фракция В.

По данным гель-хроматографии, фракции Б и В имеют одинаковый молекулярный вес, поэтому, вероятнее всего, фракция Б представляет собой продукт «неверного» замыкания дисульфидных связей.

Полученные данные позволяют сделать вывод, что из использовавшихся характеристик получаемых продуктов наиболее надежным критерием их идентичности природному апамину являются данные КД. Таким образом,

после реакций восстановления — реокисления с общим выходом 10,5% получен продукт (фракция В), идентичный природному апамину.

Далее исследовалось действие жидкого HF на нативный и восстановленный апамин. Обработку нативного апамина HF проводили в присутствии анизола при 0° в течение 1 ч, т. е. в условиях, при которых подобная обработка синтетических защищенных пептидов в наименьшей степени вызывает протекание побочных реакций [17—20]. После удаления HF и анизола продукт выдерживали 24 ч в 0,05 н. водном растворе NaHCO₃ (для обращения возможной N → O-ацильной миграции [17, 21]) и обессоливали. При хроматографии на колонке с биорексом 70 в условиях

хроматографии реокисленного апамина с выходом ~40% получается одна фракция (соответствующая фракции В, рис. 3), близкая по токсичности к приводимым характеристикам природному апамину, т. е. если обработке HF подвергается пептид с интактными дисульфидными связями, то с довольно высоким выходом удается регенерировать продукт, близкий по свойствам исходному, как это наблюдалось, например, для лизоцима [22] и основного панкреатического ингибитора трипсина [23].

В результате аналогичной обработки HF восстановленного апамина, повторного восстановления дитиотреитом и реокисления хроматография на СМ-целлюлозе СМ-32 приводит к профилю, аналогичному полученному для реокисленного апамина (рис. 1). Выход фракции, соответствующей апамину, составляет 17%, однако при ее последующем хроматографирова-

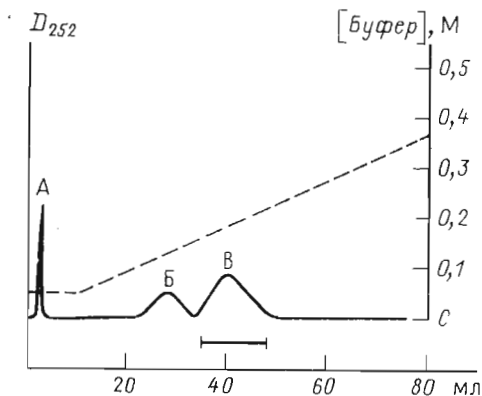


Рис. 3. Хроматография реокисленной апаминовой фракции (см. рис. 1) на биорексе 70 (1 × 2 см) в градиенте аммоний-ацетатного буфера (рН 7,5), 0,05—0,5 М (по 50 мл). Фракцию А не анализировали; из токсичных фракций Б и В последняя идентична апамину

Аминокислотный состав апамина и продуктов его восстановления — окисления и HF обработки

Аминокислоты	Теорет.	Природный апамин	Апамин реокисленный, хроматография на СМ-32 (рис. 1)	Апамин реокисленный, хроматография на биорексе 70 (рис. 3)		Обработка HF		Обработка HF (в присутствии цистеина) восстановленного апамина, хроматография на биорексе 70, фракция В (рис. 5)
				фракция Б	фракция В	природного апамина, хроматография на биорексе 70	восстановленного апамина, хроматография на СМ-32	
Asn	1	} 1,0	1,2	1,5	1,0	1,0	1,0	1,0
Asp	0		1,0	1,3	1,0	1,0	1,0	1,0
Thr	1	} 3,0	3,0	2,0	2,9	2,9	1,4	2,8
Gln	2		0,8	0,8	0,8	0,8	0,5	0,9
Glu	3	3,0	3,1	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Pro	4	2,0	2,3	3,7	2,9	2,0	1,0	2,2
Ala	1	0,9	1,0	0,9	1,0	0,7	0,9	1,0
Cys *	4	0,9	0,9	0,8	1,0	0,8	0,8	0,9
Leu	1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
His	1	1,9	1,9	2,0	2,0	2,0	1,7	2,0
Lys	1							
Arg	2							

* Данные для цистеина заштрихованы из-за его окисления в стандартных условиях гидролиза; специально анализ для определения цистеина не проводился.

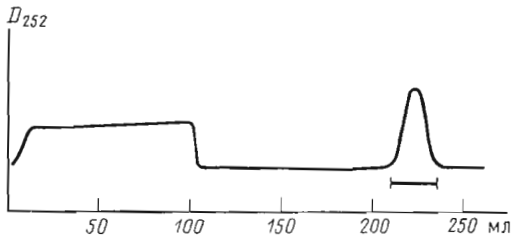


Рис. 4

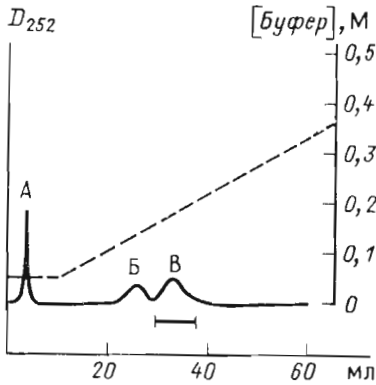


Рис. 5

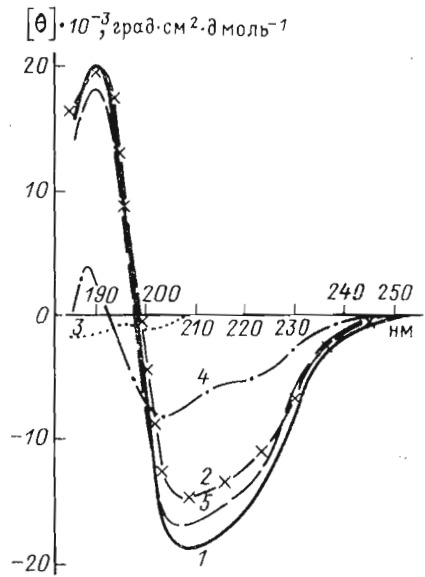


Рис. 6

Рис. 4. Хроматография на колонке с СМ-целлюлозой СМ-32 (1 × 2 см) реокисленного апамина после обработки восстановленной формы НФ в присутствии цистеина. 0 — 100 мл — нанесение раствора, в котором проводилось реокисление (после подкисления до pH 5,1), промывка 0,1 М аммоний-ацетатным буфером, pH 5,1 (12 мл), градиент аммоний-ацетатного буфера 0,1 М, pH 5,1 (80 мл) — 0,2 М, pH 6,5 (40 мл), далее 0,2 М аммоний-ацетатный буфер, pH 6,5 (30 мл). Отмечена фракция, обладающая токсичностью апамина

Рис. 5. Хроматография токсичной фракции (см. рис. 4) на колонке с биорексом 70 (1 × 1 см) в градиенте аммоний-ацетатного буфера (pH 7,5), 0,05—0,5 М (по 40 мл). Фракции А, Б, В аналогичны таковым на рис. 3. Отмечена фракция, идентичная апамину

Рис. 6. Кривые КД (в воде) нативного апамина (1), апамина с интактными дисульфидными связями после обработки НФ и хроматографии на биорексе 70 (2), восстановленного апамина после обработки НФ и хроматографии на СМ-целлюлозе СМ-32 (3), фракций Б и В рис. 5 (4 и 5 соответственно)

нии на биорексе 70 выделена только фракция, соответствующая пику А на рис. 3, которая в дозе 5 мг/кг не проявляла апаминовой активности, а по данным КД (см. ниже) и аминокислотного анализа (таблица, заниженное содержание Glu и Pro) значительно отличалась от апамина. Следует отметить, что даже после упоминавшегося повторного восстановления дитиотреитом содержание SH-групп в полученной фракции (определявшееся перед реокислением) составляло 25% от теоретического значения. Очевидно, при действии на восстановленный апамин жидкого НФ протекают побочные реакции [23, 24], затрагивающие свободные сульфгидрильные группы.

Вероятность побочных реакций может быть уменьшена, если обработку жидким фтористым водородом проводить в присутствии тиолзащитных реагентов. Мы обрабатывали восстановленный апамин НФ в присутствии цистеина, как это было предложено [24] для восстановленного лизоцима. В связи с относительно невысоким молекулярным весом апамина (~2000) определенные трудности возникают при отделении больших количеств

цистеина и дитиотреита, использовавшегося при повторном восстановлении. Оптимальные результаты обессоливания получены на колонке с сефадексом G-10.

На рис. 4 и 5 представлены хроматограммы деления реокисленного продукта на CM-32 (выход 33%) и биорексе 70. Продукт фракции Б (рис. 5) не проявляет апаминовой активности при дозе 4 мг/кг, а его кривая КД практически совпадает с кривой продукта аналогичной фракции восстановленного реокисленного апамина, не подвергавшегося действию HF (рис. 2 и 6). Фракция В (ее выход 18% в расчете на наносившийся на колонку продукт) имеет кривую КД, близкую к таковой природного апамина, и не отличается от последнего по токсичности.

Таким образом, в настоящей работе показано, что продукт, выделяемый после реокисления восстановленного природного апамина с помощью хроматографии на CM-целлюлозе, хотя и близок по ряду свойств природному апамину, не является индивидуальным соединением. Удаление примеси (предположительно продукта с «неверно» замкнутыми S—S-связями) и получение соединения, не отличающегося от природного апамина по токсичности и данным КД, было достигнуто благодаря использованию дополнительной хроматографии на ионообменнике биорекс 70. Поскольку хроматография на CM-целлюлозе была основной стадией очистки синтетического апамина и его аналогов в работах [14, 15], очевидно, полученные соединения могли в большей или меньшей степени содержать аналогичные примеси.

Продукт, идентичный природному апамину по биологической активности и данным КД, удается получить после реокисления и хроматографии восстановленного апамина, подвергавшегося обработке HF в присутствии тиолзащитающих реагентов. Эти результаты были использованы при выборе условий деблокирования синтетического защищенного октадекапептида, отвечающего аминокислотной последовательности апамина, и при проведении последующих стадий очистки и выделения желаемого продукта [12].

Экспериментальная часть

Апамин из яда пчелы выделяли как описано в работе [10]. Во всех опытах использовался препарат, который при рехроматографии на биорексе 70 в градиенте 0,05—0,5 М аммоний-ацетатного буфера (pH 7,5) дает один пик. Кислотный гидролиз пептидов проводили 6 н. HCl при 110° в течение 24 ч. Аминокислотный состав определяли на аминокислотном анализаторе (Durrum D-500, США). Обработка жидким HF осуществлялась в приборе Сакакибары [25]. Аминокислотный состав апамина и продуктов его восстановления — реокисления и обработки HF приведен в таблице. Кривые КД получены на дихрографе Jobin-Yvon III при 23—26° в H₂O (*c* 1,71—1,81·10⁻⁴ М). Индивидуальность получаемых апаминовых фракций контролировали ТСХ на пластинках с закрепленным слоем силикагеля Eastman Kodak в условиях работы [8] в системе *n*-бутанол — уксусная кислота — вода — пиридин (30 : 6 : 24 : 20) (*R_f* апамина 0,35).

Восстановление и реокисление природного апамина. Апамин (6 мг, 3 мкмоль) растворяли в 2 мл 0,2 М трис-HCl-буфера (pH 8,0), содержащего 8 М мочевины, 0,02 М EDTA·2 Na, и в атмосфере аргона добавляли 17,8 мг дитиотреита (5-кратный избыток на каждую дисульфидную связь), выдерживали 8 ч при 20°, после чего обессоливали на колонке (2,5 × 30 см) с сефадексом G-10, уравновешенной 0,1 М уксусной кислотой. Элюат, содержащий пептидную фракцию, лиофилизировали, остаток растворяли в 200 мл 0,1 М трис-HCl-буфера (pH 8,0) и оставляли при слабом перемешивании на 48 ч при 20° [14]. Подкисляли уксусной кислотой до pH 5,1 и пропускали через колонку с CM-целлюлозой CM-32, уравновешенную

0,05 М аммоний-ацетатным буфером (рН 5,4), и проводили хроматографию, как указано в подписи к рис. 1. Полученный продукт (2,5 мг) хроматографировали на колонке с биорексом 70 (см. рис. 3). Выход пептида (фракция В), идентичного природному апамину по хроматографическому поведению и кривой КД, составил 25% (или 10,5% в расчете на исходный апамин).

Обработка фтористым водородом природного апамина. Апамин (1 мг) перемешивали 1 ч с 3 мл HF и 0,3 мл анизолу при 0°. После удаления HF в вакууме остаток растворяли в 10 мл воды, промывали эфиром (3 × 20 мл), к водному раствору добавляли 42 мг NaHCO₃ и оставляли на 24 ч при комнатной температуре. Упаривали до объема 3 мл и обессоливали на колонке (2,5 × 30 см) с сефадексом G-10 в 0,1 М уксусной кислоте. Пептидную фракцию после лиофилизации хроматографировали на колонке с биорексом 70 (условия см. подпись к рис. 3). Выход 0,4 мг (40%), R_f 0,35.

Обработка HF природного апамина с восстановленными дисульфидными связями. Лيوфилизованный восстановленный апамин (3,8 мг, получен, как описано выше, из 4 мг апамина) обрабатывали 4 мл HF в присутствии 0,4 мл анизолу. После удаления HF остаток растворяли в 10 мл воды, раствор промывали эфиром и лиофилизовали. Восстановление дитиотреитом, обессоливание, реокисление, хроматографию на СМ-целлюлозе СМ-32 (выход пептидной фракции 17%) и рехроматографию на биорексе 70 проводили как описано выше (рис. 1,3).

Обработка HF восстановленного природного апамина в присутствии цистеина. Восстановленный апамин (3,8 мг), 174 мг цистеина, 0,7 мл анизолу и 7 мл HF перемешивали 1 ч при 0°. Удаляли HF и остаток растворяли в 3 мл фосфатного буфера (рН 8,0), добавляли 460 мг дитиотреита и выдерживали 8 ч при 20°. После обессоливания, реокисления и хроматографии на СМ-целлюлозе СМ-32 (рис. 4) получали 1,3 мг (33%) фракции, обладающей токсичностью, из которой при хроматографии на биорексе 70 (рис. 5) выделяли 0,3 мг (выход 7,5%) апамина. R_f 0,35. Данные аминокислотного анализа приведены в таблице, кривая КД — на рис. 6.

Авторы выражают благодарность Л. Б. Сенявиной за съемку кривых КД.

ЛИТЕРАТУРА

1. Habermann E., Reiz K. G. (1965) *Biochem. Z.*, **341**, 451—460.
2. Shipolini R., Bradbury A. F., Callewaert G. Z., Vernon C. A. (1967) *Chem. Commun.*, 679—680.
3. Haux P., Sawerthal H., Habermann E. (1967) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **348**, 737—738.
4. Callewaert G. Z., Shipolini R., Vernon C. A. (1968) *FEBS Lett.*, **1**, 111—113.
5. Habermann E. (1972) *Science*, **177**, 314—322.
6. Yang C. C. (1974) *Toxicon*, **12**, 1—43.
7. Spoerri P. E., Jentsch J., Gleys P. (1975) *FEBS Lett.*, **2**, 143—147.
8. Gaudie J., Hanson J. M., Rumjanek F. D., Shipolini R., Vernon C. A. (1976) *Eur. J. Biochem.*, **61**, 369—376.
9. Vincent J. P., Schweits H., Lazdunski M. (1975) *Biochemistry*, **14**, 2521—2525.
10. Мирошников А. И., Елякова Е. Г., Куделин А. Б., Сенявина Л. Б. (1978) *Биоорг. химия*, **4**, 1022—1028.
11. Bystrov V. F., Arseniev A. S., Cavrillov Yu. D. (1978) *J. Magn. Res.*, in press.
12. Нуридинов А. Р., Жукова Г. Ф., Цетлин В. И., Иванов В. Т. (1978) *Биоорг. химия*, **4**, 1322—1333.
13. Hartter P., Weber U. (1975) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **356**, 693—699.
14. Rietschoten J. Van., Granier C., Rochat H., Lissitzky S., Miranda F. (1975) *Eur. J. Biochem.*, **56**, 35—40.
15. Cosand Wesley L., Merrifield R. B. (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 2771—2775.
16. Ellman G. L. (1959) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **82**, 370—372.
17. Sakakibara S. (1971) in *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins* (Weinstein B., ed.), vol. 1, pp. 51—82, N. Y.
18. Sharp J. J., Robinson A. B., Kamen M. D. (1973) *J. Amer. Chem. Soc.*, **95**, 6097—6107.
19. Sano S., Kawanishi S. (1975) *J. Amer. Chem. Soc.*, **97**, 1380—1384.

20. Feinberg R. S., Merrifield R. B. (1975) *J. Amer. Chem. Soc.*, **97**, 3485—3496.
21. Iwai K., Ando T. (1967) in *Methods in Enzymology* (Hirs C. H. W., ed.), vol. 11, pp. 263—282, Acad. Press, N. Y.
22. Aimoto S., Shimonishi Y. (1975) *Bull. Chem. Soc. Japan*, **48**, 3293—3297.
23. Rocche R., Benassi C. A., Tomatis R., Ferroni R., Menegatti E. (1976) *Int. J. Peptide Prot. Res.*, **8**, 167—175.
24. Aimoto S., Shimonishi Y. (1976) *Bull. Chem. Soc. Japan*, **49**, 317—320.
25. Sakakibara S., Shimonishi Y., Kishida V., Okada M., Sugihara H. (1967) *Bull. Chem. Soc. Japan*, **40**, 2164—2167.

Поступила в редакцию
23.III.1978

APAMIN REDUCTION-REOXIDATION AND ITS INTERACTION WITH LIQUID HF

NURIDDINOV A. R., ELYAKOVA E. G., MAL'KOVA V. P.,
TSETLIN V. I., IVANOV V. T.

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

A study of disulfide reformation in reduced apamin has been undertaken. It was shown that reoxidation and subsequent chromatography on carboxymethylcellulose under the conditions described in literature lead to inhomogeneous product; after additional chromatography on cation-exchanger Bio-Rex 70 the peptide was isolated which was identical to apamin by toxicity, thin-layer chromatography and circular dichroism data. The identity of the CD curves was found to be the most stringent criterium of the identity of the products obtained and of intact apamin. The stability of intact apamin and of its reduced form to the action of liquid HF was examined. Starting with reduced apamin, a product indistinguishable from apamin was successfully isolated only when thiol-protecting reagents were used during HF treatment.
