



УДК 577.354.3 : 591.145.2-812

ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАЦИИ НЕЙРОТОКСИНА II
НАУА НАУА ОХИАНА НА СТЕХИОМЕТРИЮ КОМПЛЕКСОВ
С АЦЕТИЛХОЛИНОВЫМ РЕЦЕПТОРОМ

Карелин А. А., Плужников Ю. А., Цетлин В. И.

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

Обнаружена способность солиобилизованного ацетилхолинового рецептора из электрического органа ската *Torpedo marmorata* после облучения его комплекса с нейротоксином II, содержащим *n*-азидобензоильную группу в положении Lys²⁵, образовывать до четырех дополнительных участков связывания, специфичных для ацетилхолина и нейротоксина II, но не для нейротоксинов «длинного» типа. Такой же эффект наблюдался при облучении комплексов ацетилхолинового рецептора с другими фотоактивируемыми производными в том случае, если с одного из двух мест связывания они вытеснялись гекса(трифторацетил)нейротоксином II. Аналогичный эффект, но слабее выраженный, наблюдался для Lys²⁵([³H]Ac)-производного нейротоксина II. Показана зависимость образования дополнительных мест связывания от активности препаратов рецептора и взаимное влияние двух основных токсинсвязывающих центров в процессе формирования дополнительных участков связывания.

Исследования, проведенные ранее с помощью оптических методов и ЯМР-спектроскопии [1—4], показали, что производные нейротоксина II из яда кобры *Naja naja oxiana*, несущие в различных участках молекулы по одной спиновой или флуоресцентной метке, по своим пространственным характеристикам являются близкими аналогами природного нейротоксина. Эти мономодифицированные производные обладают значительной токсичностью и с высокой эффективностью связываются с никотиновым ацетилхолиновым рецептором [4—6], выделенным из электрического органа ската *Torpedo marmorata*. Изучение взаимодействия спин- и флуоресцентно-меченых производных, а также аналогичных мономодифицированных фотоактивируемых производных нейротоксина II с ацетилхолиновым рецептором методами ЭПР, флуоресценции и фотоиндуцируемых шивок позволило охарактеризовать связывающуюся поверхность молекулы нейротоксина, а также выяснить расположение двух молекул нейротоксина относительно α , β , γ , δ -субъединиц рецептора [6—9].

Стехиометрия токсин-рецепторных комплексов (2 : 1) была установлена при использовании различных радиоактивно-меченых нейротоксинов «короткого» или «длинного» типов [10], а также спин- и флуоресцентно-меченых производных нейротоксина II [11], принадлежащего к классу «коротких» токсинов, и является общепризнанной характеристикой взаимодействия нейротоксинов змей с ацетилхолиновым рецептором. Однако нами было обнаружено, что после облучения комплекса ацетилхолинового рецептора с одним из фотоактивируемых производных нейротоксина II рецептор приобретает способность связывать дополнительное число молекул нейротоксина сверх указанной стехиометрии [12]. Настоящее сообщение посвящено более детальному исследованию влияния модификации ϵ -аминогруппы нейротоксина II на стехиометрию его комплексов с рецептором и на способность вызывать в рецепторе конформационные превращения, приводящие к появлению дополнительных центров связывания полипептидных токсинов.

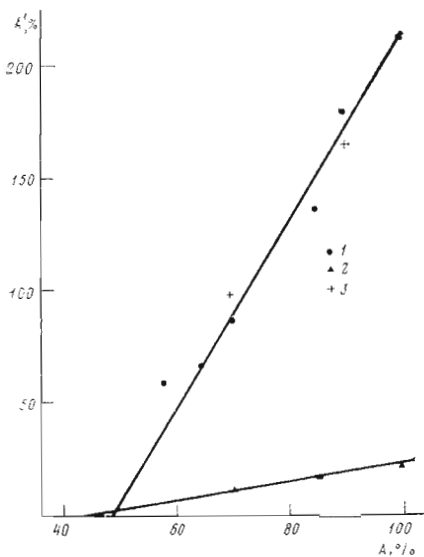
Связывание с очищенным, солиобилизованным в тритоне X-100 ацетилхолиновым рецептором из электрического органа ската *Torpedo marmorata* серии производных нейротоксина II, имеющих *n*-азидобензоильную (N₃Bz) группу в известном положении (Leu¹, Lys¹⁶, Lys²⁵, Lys²⁶, Lys⁴⁴, Lys⁴⁶) оценивали по конкуренции с ³H-ацетилированным нейроток-

сином II (^3H Ас-нейротоксин II), измеряя радиоактивность токсин-рецепторного комплекса, отделяемого от избытка свободного радиоактивного токсина гель-хроматографией на сефадексе G-75. После облучения комплексов ацетилхолинового рецептора с перечисленными фотоактивируемыми производными степень образования ковалентных сшивок определяли, вытесняя ковалентно не связавшиеся производные 10-кратным избытком ^3H Ас-нейротоксина II. Контрольные опыты показали, что в этих условиях производное токсина, не подвергавшееся облучению в комплексе с рецептором, вытесняется из него практически на 100%. Было установлено, что все перечисленные *n*-азидобензольные производные в темноте специфически связываются с рецептором. При облучении соединений, содержавших фотоактивируемые группировки на аминоклассовых остатках Leu¹, Lys¹⁵, Lys²⁶ или Lys⁴⁶, с высокой эффективностью образуются сшивки с рецептором, о чем свидетельствует подавление на 75—80% связывания с ^3H Ас-нейротоксином II. В случае Leu¹-, Lys¹⁵- и Lys²⁶-производных анализ образования сшивок проводился также и с использованием ^3H -ацетилированного токсина 3 (^3H Ас-токсин 3) из яда кобры *Naja naja siamensis*, являющегося представителем нейротоксинов «длинного» типа. При использовании обоих радиоактивных токсинов получены аналогичные результаты. Облучение комплекса рецептора с Lys⁴⁴-производным не препятствовало последующему взаимодействию с ^3H Ас-нейротоксином II, что свидетельствует об отсутствии контактов между группировками рецептора и фотоактивируемой группировкой в положении Lys⁴⁴.

Более сложный случай представляет собой взаимодействие с рецептором нейротоксина II, имеющего *n*-азидобензольную группу в положении Lys²⁵: облучение комплекса (соотношение токсин — рецептор 2,1 : 1) подавляет на 88% связывание с рецептором токсина 3 *N. n. siamensis* (как обычно, считая на стехиометрию 2 : 1), однако не препятствует связыванию ^3H Ас-нейротоксина II. По-видимому, две молекулы фотоактивированного Lys²⁵(N₃Bz)-производного нейротоксина II в ковалентном комплексе с рецептором занимают оба «нормальных» токсинсвязывающих центра, но фотоиндуцированные сшивки между *n*-азидобензольной группой и группировками рецептора вызывают в последнем конформационные превращения и образование дополнительных центров, с которыми, однако, могут взаимодействовать только нейротоксины «короткого» типа (нейротоксин II), но не длинного.

Взаимодействие ^3H Ас-нейротоксина II с дополнительными центрами является специфичным. Во-первых, присутствие 15-кратного избытка бычьего сывороточного альбумина не оказывает влияния на связывание ацетилированного нейротоксина с облученным комплексом фотоактивируемый токсин — ацетилхолиновый рецептор. Во-вторых, и это служит наиболее убедительным свидетельством специфичности, связывающийся по дополнительным центрам радиоактивный токсин можно полностью вытеснить из комплекса с рецептором избытком нативного нейротоксина II. Дополнительные центры связывания обладают специфичностью и по отношению к природному нейротрансмиттеру — ацетилхолину. Этот вывод следует из того, что 300-кратный избыток ацетилхолина (такое количество взято с учетом меньшего по сравнению с нейротоксином сродства к рецептору [13]) на 97% вытесняет ^3H Ас-нейротоксин II после его инкубации с облученным комплексом ацетилхолиновый рецептор — Lys²⁵(N₃Bz)-нейротоксин II.

Опыты с использованием препаратов, в которых активность ацетилхолинового рецептора, определяемая по связыванию радиоактивных нейротоксинов, варьировала от 58 до 100% (от 4,64 до 8 нмоль ^3H Ас-токсинов на 1 мг рецепторного белка с учетом стехиометрии токсин-рецепторных комплексов (2 : 1) и молекулярной массы ацетилхолинового рецептора 250 кДа [14]), выявили пропорциональную зависимость между активностью рецептора и количеством токсина, связывающегося по дополнительным центрам (рисунок, 1). При 100% активности исходного рецептора облучение его комплексов с Lys²⁵(N₃Bz)-производным приводило к тому, что активность, определяемая по связыванию ^3H Ас-производного ток-



Зависимость способности к образованию дополнительных центров связывания от активности ацетилхолинового рецептора. A — активность препарата рецептора; A' — активность, соответствующая дополнительным участкам связывания при использовании $\text{Lys}^{25}(\text{N}_3\text{Bz})$ -производного (1), $(\text{Tfa})_6$ - и $\text{Lys}^{15}(\text{N}_3\text{Bz})$ -производных (3), $\text{Lys}^{25}(\text{Ac})$ -производного; нейротоксина II (2)

Lys^{15} -производного эффективность составляла менее 10% (таблица). Поскольку все три указанных производных при связывании с основными центрами рецептора образуют ковалентные сшивки с примерно одинаковой эффективностью [8], полученные данные свидетельствуют об определенных различиях в характере связывания нейротоксинов с основными и дополнительными центрами ацетилхолинового рецептора.

В настоящей работе при электрофоретическом разделении субъединиц ацетилхолинового рецептора после облучения соответствующего комплекса мы обнаружили, что радиоактивность в полосе, отвечающей δ -субъединице, возрастает при увеличении соотношения $\text{Lys}^{25}(\text{N}_3\text{Bz})$ -производное — ацетилхолиновый рецептор.

Представляет интерес выяснить, на каких субъединицах рецептора расположены дополнительные центры. С использованием n -азидо- $[^{14}\text{C}]$ бензоильных (N_3Bz^*)-производных нейротоксина II нами ранее были иден-

Ковалентное связывание фотоактивируемых N_3Bz -монопроводных нейротоксина II с ацетилхолиновым рецептором

Модифицированный остаток нейротоксина II	Активность препарата ацетилхолинового рецептора, %	Активность токсин-рецепторного комплекса после вытеснения ковалентно не связавшегося N_3Bz -токсина, % от активности рецептора **		Ковалентное связывание по дополнительным местам, %
		A	B	
Leu ¹	85	Не определялась	18	Не определялась
Lys^{15}	85	19	18	10
Lys^{26}	100	24	28	55
Lys^{44}	90	100	Не определялась	
Lys^{46}	90	23	»	
Lys^{25}	100	220	12	75
a+b *	90	31	Не определялась	—
b+a *	90	176	»	—

* Указана последовательность добавления $(\text{Tfa})_6$ -NT II (a) и $\text{Lys}^{15}(\text{N}_3\text{Bz})$ -NT II (b).
** Определена по вытеснению $[^3\text{H}]\text{Ac}$ -нейротоксина IT (A) и $[^3\text{H}]\text{Ac}$ -токсина 3 (B).

тифицированы контакты между отдельными боковыми цепями нейротоксина и определенными субъединицами рецептора, что позволило предлжсжить два варианта топографии токсин-рецепторных комплексов [6, 9]. Нейротоксин II с N_3Vz^* -группой в положении Lys^{25} образовывал сшивки с α -, β - и δ -субъединицами, при этом последний контакт не мог быть реализован ни в одной из моделей.

На основании изложенных данных можно полагать, что наблюдаемое в случае Lys^{25} -производного мечение δ -субъединицы обусловлено его связыванием в дополнительном центре. Другими словами, δ -субъединица принимает участие в формировании дополнительных центров связывания нейротоксинов.

Полученные нами данные выявили особую роль ϵ - NH_2 -группы остатка Lys^{25} по сравнению с остальными аминогруппами нейротоксина II: фотоактивируемая группировка, связанная с этим остатком, контактирует с «чувствительным» участком рецептора, образование ковалентных связей с которым вызывает конформационные перестройки, приводящие к формированию дополнительных центров связывания нейротоксинов. Можно было предположить, что различные модификации остатка Lys^{25} должны повлиять и на свойства нековалентных комплексов, образуемых этими производными. Действительно, после инкубации рецептора с производным нейротоксина II, имеющим [3H]Ac-группу в положении Lys^{25} , и отделения избытка несвязавшегося токсина гель-хроматографией радиоактивность токсин-рецепторного комплекса была на 10—20% выше, чем при использовании для анализа тех же препаратов рецептора [3H]Ac-токсина 3 или [3H]Ac-производных нейротоксина II по остаткам Lys^{26} , Lys^{44} , Lys^{46} (рисунок, 2). Экспериментальная ошибка при определении активности рецептора не превышает 6%. Как и при образовании ковалентных сшивок, количество $Lys^{25}(Ac)$ -производного, связывающегося с рецептором сверх стехиометрии 2 : 1, пропорционально активности рецептора (рисунок). По-видимому, связывание с рецептором производных нейротоксина II, в которых блокирована ϵ -аминогруппа Lys^{25} , приводит к конформационному переходу и установлению равновесия между формами, одна из которых (исходная) связывает две молекулы токсина, а другая (вновь образовавшаяся) наряду с этим обладает и дополнительными центрами связывания. Образование ковалентных связей с $Lys^{25}(N_3Vz)$ -производным нейротоксина II необратимо фиксирует соответствующие конформационные изменения и сдвигает равновесие в сторону последней из обсуждавшихся форм.

Ранее было обнаружено, что изменение стехиометрии токсин-рецепторных комплексов имеет место еще при одной модификации нейротоксина II: после одновременного блокирования всех шести аминогрупп образующееся гекса(трифторацетильное) производное $(Tfa)_6$ -NT II) вытесняло мономодифицированные спин- и флуоресцентно-меченые производные нейротоксина II лишь с 50% связывающих центров ацетилхолинового рецептора [11, 15]. В развитие этих исследований мы изучили образование фотоиндуцированных сшивок между фотоактивируемыми производными нейротоксина II и ацетилхолиновым рецептором в присутствии гекса(трифторацетил)нейротоксина II. Если это соединение сначала добавляется к рецептору (в соотношении 40 : 1), а затем вносится производное нейротоксина с N_3Vz^* -группой в положении Lys^{25} , то в результате последующего облучения образующегося тройного комплекса на 1 моль ацетилхолинового рецептора включаются $\sim 0,7$ моль радиоактивного токсина, т. е. степень ковалентных сшивок снижается по сравнению с контрольными опытами более чем вдвое (таблица). Однако при обратном порядке добавления $Lys^{25}(N_3Vz^*)$ -фотомеченого и $(Tfa)_6$ -производных нейротоксина II, т. е. инкубации с фотомеченым производным (соотношение токсин — рецептор 2,6 : 1), а затем вытеснения гекса(трифторацетил)нейротоксином (40-кратный избыток по отношению к рецептору) с одного из мест связывания, последующее облучение и инкубация с [3H]Ac-нейротоксинами обнаружили возрастание токсинсвязывающей способности, подобное тому, которое было рассмотрено выше для Lys^{25} -производных нейротоксина II (таблица). При этом количество дополнительных центров связывания также было

пропорционально активности рецептора (рисунок, 3). Например, при 80% активности рецептора увеличение радиоактивности токсин-рецепторного комплекса за счет появления дополнительных центров связывания составляет 130%, что совпадает с данными, полученными при использовании препарата рецептора с такой же активностью и $\text{Lys}^{25}(\text{N}_3\text{Vz})$ -производного (рисунок, 3). Можно предположить, что способность гекса(трифторацетил)нейротоксина II приводить к появлению дополнительных участков связывания в значительной степени обусловлена блокированием в этом производном положительно заряженной ϵ -аминогруппы остатка Lys^{25} .

Из рисунка видно, что при использовании как производных нейротоксина II с *n*-азидобензойной или ацетильной группой в положении

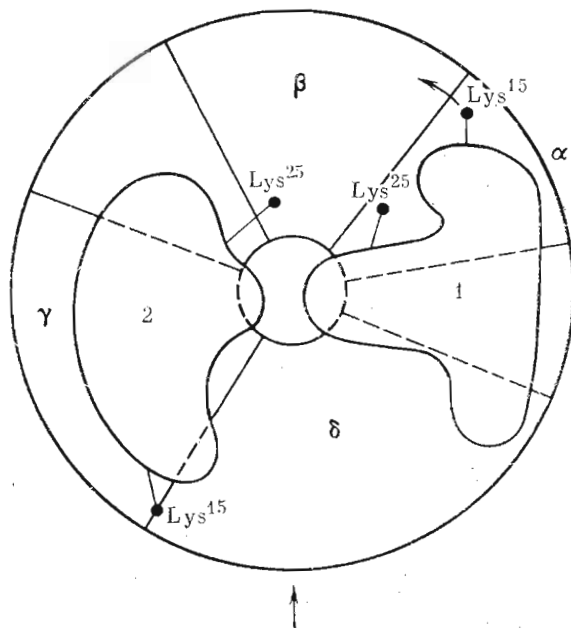


Схема взаиморасположения нейротоксинсвязывающих участков в молекуле ацетилхолинового рецептора (положение одной из α -субъединиц не указано, так как в рамках моделей [6, 9] она может находиться между γ - и β - или δ - и α -субъединицами). Изображения молекул токсина даны в проекции на наружную поверхность мембраны. 1 и 2 — основные участки связывания. Стрелки указывают дополнительные участки связывания нейротоксина II

Lys^{25} , так и гекса(трифторацетил)нейротоксина II экстраполяция зависимостей числа дополнительных центров от активности рецептора до пересечения с осью абсцисс приводит практически к одному и тому же значению активности рецептора, т. е., если активность рецептора меньше или равна 44–48%, «открытия» дополнительных участков не происходит. На наш взгляд, наиболее вероятное объяснение такой зависимости состоит в том, что для индуцирования конформационных перестроек и появления дополнительных центров связывания нейротоксинов в молекуле рецептора необходимо, чтобы были заняты оба основных токсинсвязывающих участка, и достаточно, чтобы на одном из них находился определенным образом модифицированный нейротоксин: Lys^{25} -производное или гекса(трифторацетил)нейротоксин II. Очевидно, «чувствительный» участок рецептора, взаимодействие с которым инициирует формирование дополнительных центров, находится в пределах одного из двух основных центров связывания токсинов, а именно того центра, с которым способен связываться гекса(трифторацетил)нейротоксин II (основной центр 2, см. схему).

Как уже отмечалось выше, в комплексе с ацетилхолиновым рецептором были обнаружены контакты между N_3Vz -группировкой в положении

Lys²⁵ нейротоксина II и α -, β - и δ -субъединицами. В рамках предложенных нами моделей [6] в молекуле нейротоксина, распалагающейся в том участке, где связывается гекса(трифторацетил)нейротоксин II, N₃Vz-группа в положении Lys²⁵ контактирует с β -субъединицей. Очевидно, «чувствительный» участок рецептора, ответственный за появление дополнительных центров, находится в той области β -субъединицы, которая является частью основного центра 2 (схема).

Представление о «величине» упомянутых конформационных изменений дает определение субъединиц, образующих фотоиндуцированные сшивки с Lys¹⁵(N₃Vz*)-производным. Как показано в работе [9], это производное при инкубации с рецептором и последующем облучении образует сшивки с α -, γ - и δ -субъединицами. Если оно в соотношении 1 : 1,1 добавляется к рецептору, предварительно инкубированному с 20-кратным избытком гекса(трифторацетил)нейротоксина II, т. е. когда один из двух основных участков занят, то наблюдается мечение только α -субъединицы. Если Lys¹⁵(N₃Vz*)-производное добавляется к облученному комплексу рецептора с Lys²⁵(N₃Vz)-производным (т. е. когда основные центры связывания заняты, но образованы дополнительные), то, как уже отмечалось, степень образования им сшивок существенно снижается. В том случае, когда рецептор инкубируется с Lys²⁵(N₃Vz*)-нейротоксином II, а затем с помощью гекса(трифторацетил)нейротоксина II фотоактивируемый токсин вытесняется с одного из основных мест, после облучения полученного тройного комплекса основная радиоактивность обнаруживается уже не в α -, а β -субъединице. Таким образом, обнаруженные конформационные изменения не ограничиваются какой-либо одной субъединицей рецептора, а затрагивают, по-видимому, значительную часть олигомерного комплекса.

До сравнительно недавнего времени преобладало мнение (см., например, [16]), что из пяти субъединиц ацетилхолинового рецептора (2α , β , γ , δ) в связывании двух молекул нейротоксина участвуют лишь две α -субъединицы. Это подтверждалось, например, тем, что из субъединиц рецептора, выделенных с помощью электрофореза в полиакриламидном геле и частично ренатурированных, лишь α -субъединица связывает α -бунгаротоксин [17]. Тем не менее ряд данных из других лабораторий [18, 19], а также наши результаты показывают, что в комплексе с рецептором связанные нейротоксины имеют контакты со всеми субъединицами.

Между кинетическими исследованиями связывания нейротоксинов с ацетилхолиновым рецептором имеются расхождения по вопросу о том, эквивалентны ли два центра связывания [20]. Использование фотоактивируемых монопроизводных нейротоксина II позволило доказать неэквивалентность этих центров, показав различие образующих их субъединиц, а также роль взаимодействий модифицированных нейротоксинов с «чувствительным участком» одного из центров, приводящих (при условии занятости и второго центра) к формированию дополнительных центров связывания нейротоксинов.

Особого рассмотрения заслуживает возможная функциональная роль дополнительных центров, с которыми, как отмечалось выше, способны связываться не только нейротоксины, но и ацетилхолин. Установление аминокислотных последовательностей всех субъединиц ацетилхолинового рецептора [21—23] выявило между ними очень высокую степень гомологии и дало основание предположить, что функциональные свойства ацетилхолинового рецептора, будь то взаимодействие с холинергическими лигандами или с соединениями, блокирующими собственно ионпроводящую способность рецептора (так называемыми неконкурентными блокаторами — гистрионикотоксином, фенциклидином и др.), должны определяться всеми субъединицами рецепторного комплекса. В этой связи интересна работа [24], в которой показано, что при облучении рецептора с азидо[³H]-фенциклидином метка вводится в α -, γ -, δ -субъединицы.

Что касается участков связывания агонистов, то для них было убедительно показано расположение на α -субъединицах [25]. Для этой цели, в частности, использовался бром[³H]ацетилхолин. Недавние работы Раф-

тери и сотр. [26] показали, однако, что после блокирования двух участков связывания бромацетилхолином рецептор сохраняет способность связывать карбамоилхолин, хотя и с относительно низким сродством. Авторы предполагают, что эти участки низкого сродства находятся не на α -, а на других субъединицах и взаимодействие агонистов именно с этими участками приводит к активации канала, тогда как взаимодействие с участками высокого сродства на α -субъединицах в значительной степени ответственно за процесс десенситизации [27]. Хотя в тритоне X-100, в котором проводились наши исследования, активация канала ацетилхолинового рецептора невозможна [28], значительное подобие пространственных характеристик мембраносвязанной и сольбилизированной форм рецептора позволяет высказать предположение о том, что обнаруженные нами дополнительные центры связывания нейротоксинов и ацетилхолина могут быть близки или идентичны центрам низкого сродства ацетилхолинового рецептора.

Авторы выражают глубокую благодарность чл.-кор. АН СССР В. Т. Иванову за внимание к работе и ценные критические замечания.

Экспериментальная часть

*Выделение ацетилхолинового рецептора из электрического органа скампа *T. tarmorata** (модифицированная методика [5]). К 522 г замороженного электрического органа (-70°C) добавляли 500 мл 10 мМ Na-фосфатного буфера (pH $\sim 7,4$), содержащего 0,1 М NaCl, 0,02% NaN_3 , 10^{-3} М EGTA, $3 \cdot 10^{-3}$ М EDTA (буфер А), и размораживали теплой водой до -0°C , после чего добавляли 5,3 мкл диизопропилфторфосфата в 4 мл пропанола и 90 мг фенилметилсульфенилфторида (Serva) в 5 мл этанола. Орган гомогенизировали 1,5 мин ножевым гомогенизатором (тип 302) при 14 000 об/мин, а затем центрифугировали на центрифуге Sorwall 19 (США) 40 мин при 18 000 об/мин. Осадок суспендировали в 500 мл буфера А, содержащего 90 мг фенилметилсульфенилфторида и 6 мкл диизопропилфторфосфата, и проводили двукратное центрифугирование на Sorwall 19 в тех же условиях по 20 мин. Осадок суспендировали в 450 мл исходного буфера, содержащего все ингибиторы, добавляли 115 мл 10% тритона X-100 и перемешивали 1 ч при 4°C , после чего центрифугировали 1,5 ч на роторе Beckman (США) 35 Ti при 35 000 об/мин. К супернатанту добавляли 15 мл BtCN-активированной сефарозы 4В (Serva) с иммобилизованным нейротоксином II и инкубировали 18 ч при 4°C и постоянном перемешивании. Затем носитель отфильтровывали и промывали сначала 50 мл буфера А, содержащего 1% тритон X-100, затем 50 мл буфера А, содержащего 1 М NaCl и 1% тритон X-100, затем 50 мл буфера А, содержащего 0,025% тритон X-100 (буфер Б). К аффинному сорбенту добавляли 15 мл 1 М карбамоилхолина в буфере Б и инкубировали при 4°C и постоянном перемешивании 20 ч. После инкубации аффинный сорбент отфильтровывали и промывали 35 мл буфера Б. Раствор диализовали 2 раза против 5 л 3 мМ Na-фосфатного буфера (pH 7,5), содержащего 0,025% тритон X-100, 0,02% NaN_3 , 10^{-3} М EGTA, $3 \cdot 10^{-3}$ М EDTA и 90 мг фенилметилсульфенилфторида. Продукт наносили на колонку ($1,5 \times 7$ см) с DEAE-целлюлозой DE-52, уравновешенной 3 мМ Na-фосфатным буфером (pH 7,5), содержащим 0,025% тритон X-100, 0,02% NaN_3 , и элюировали в градиенте концентрации Na-фосфатного буфера от 3 мМ до 0,5 М (по 50 мл). Ацетилхолиновый рецептор элюируется в объеме ~ 4 мл. Выход 12,3 мг белка.

Активность ацетилхолинового рецептора определяли с помощью [^3H]Ac-нейротоксина II [7] как описано в работе [8]. Активность выделенного рецептора составляла 90—100%. При хранении активность рецептора снижалась. Получение серии фотоактивируемых монопроизводных нейротоксина II описано в работе [8], гекса(трифторацетил)нейротоксина II — в работе [29].

Анализ ковалентного связывания нейротоксинов с ацетилхолиновым рецептором. В две кварцевые кюветы вносили по 0,4 мл сольбилизованного ацетилхолинового рецептора с концентрацией 0,1 мг/мл. В одну кю-

вету добавляли 0,05 мл раствора [³H]Ас-нейротоксина II, что служило контролем активности рецептора, в другую — 0,03 мл раствора фоточувствительного N₃Vz-производного нейротоксина II (двукратный избыток по отношению к активным центрам рецептора). Обе кюветы инкубировали 1 ч в темноте, после чего облучали светом галогенной лампы мощностью 250 Вт, находящейся на расстоянии 12 см от кювет. Облучение проводили в три приема по 2 мин с 2-мин перерывами. После облучения ацетилхолиновый рецептор из контрольной кюветы отделяли от несвязавшегося токсина на колонке с сефадексом G-75, как и при определении активности рецептора [8], а в кювету, содержащую фоточувствительное производное, вносили 0,05 мл радиоактивного токсина, инкубировали 1 ч и отделяли комплекс от несвязавшегося токсина на колонке с сефадексом G-75. Для определения радиоактивности из фракций объемом 2 мл отбирались аликваты по 0,4 мл. Измерение проводили в сцинтилляторе Брэя на счетчике Intertechnique SL-30. В случае использования [³H]Ас-производных токсина 3 *N. n. siamensis* (концентрация 0,15 мг/мл, удельная активность 150 000 расп/мин·мкг) к рецептору добавляли 0,01 мл такого раствора, сохраняя все прочие условия.

Для определения степени ковалентного связывания по дополнительным центрам после инкубации рецептора с производным нейротоксина II, содержащим фотоактивируемую группу на остатке Lys²⁵, в описанных выше условиях и облучения полученного комплекса несвязавшийся токсин отделяли диализом против 5 л 30 мМ Na-фосфатного буфера (рН 7,5), содержащего 0,025% тритон X-100. Затем образец переносили в кварцевую кювету и вносили туда 0,05 мл раствора N₃Vz-нейротоксина II (25-кратный избыток по отношению ко всем активным центрам рецептора). Раствор в кювете инкубировали 1 ч в темноте, после чего облучали, инкубировали 1 ч с 0,05 мл раствора радиоактивного [³H]Ас-токсина, отделяли несвязанный токсин на колонке с сефадексом G-75 и измеряли радиоактивность.

Исследование связывания фотоактивируемых монопроизводных нейротоксина II в присутствии гекса(трифторацетил)нейротоксина II. В кварцевую кювету вносили 0,4 мл солюбилизованного рецептора с концентрацией 0,1 мг/мл, затем добавляли 0,025 мл раствора N₃Vz-нейротоксина II (1,3-кратный избыток по отношению к активным центрам рецептора). Инкубировали 1 ч в темноте, а затем вносили 0,05 мл раствора (Tfa)₆-нейротоксина II (40-кратный избыток по отношению к фоточувствительному производному). После инкубации в темноте (1 ч) проводили облучение как описано выше и содержимое кюветы диализовали против 5 л 30 мМ Na-фосфатного буфера (рН 7,5), содержащего 0,025% тритон X-100, затем вносили 0,05 мл [³H]Ас-токсина и инкубировали 1 ч. От несвязавшегося токсина освобождались с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-75, после чего определяли радиоактивность. Параллельно ставился эксперимент по определению активности рецептора.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сурин А. М., Уткин Ю. Н., Плужников К. А., Ефремов Е. С., Цетлин В. И. Биоорг. химия, 1981, т. 7, № 3, с. 342—356.
2. Пашков В. С., Арсеньев А. С., Уткин Ю. Н., Цетлин В. И., Быстров В. Ф. Биоорг. химия, 1982, т. 8, № 5, с. 588—615.
3. Пашков В. С., Плужников К. А., Уткин Ю. Н., Хинче Р., Арсеньев А. С., Цетлин В. И., Иванов В. Т., Быстров В. Ф. Биоорг. химия, 1983, т. 9, № 9, с. 1181—1219.
4. Уткин Ю. Н., Пашков В. С., Плужников К. А., Курятов А. Б., Арсеньев А. С., Цетлин В. И., Быстров В. Ф., Иванов В. Т. Биоорг. химия, 1983, т. 9, № 4, с. 437—449.
5. Tsetlin V. I., Karlsson E., Arseniev A. S., Utkin Yu. N., Surin A. M., Pashkov V. S., Pluzhnikov K. A., Ivanov V. T., Bystrov V. F., Ovchinnikov Yu. A. FEBS Lett., 1979, v. 106, № 1, p. 47—52.
6. Tsetlin V., Pluzhnikov K., Karelin A., Ivanov V. In: Toxins as tools in neurochemistry/Eds Ovchinnikov Y. A., Hucho F. B.— N. Y.: Walter de Gruyter & Co, 1983, p. 159—169.

7. Tsetlin V. I., Karlsson E., Utkin Yu. N., Pluzhnikov K. A., Arseniev A. S., Surin A. M., Kondakov V. V., Bystrov V. F., Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A. *Toxicol.* 1982, v. 20, № 1, p. 83—93.
8. Плужников К. А., Карелин А. А., Уткин Ю. Н., Цетлин В. И., Иванов В. Т. *Биоорган. химия*, 1982, т. 8, № 7, с. 905—913.
9. Цетлин В. И., Плужников К. А., Карелин А. А., Карлссон Е., Иванов В. Т. *Биоорган. химия*, 1984, т. 10, № 2, с. 176—187.
10. Dame V. N., Karlin A. *Biochemistry*, 1978, v. 17, № 11, p. 2039—2041.
11. Ivanov V. T., Tsetlin V. I., Mikhaleva I. I., Volpina O. M., Nuriddinov A. R., Utkin Yu. N., Arseniev A. S., Pashkov V. S., Karlsson E., Surin A. M., Bystrov V. F. In: *Peptides 1978*/Eds Kuprishevsky G., Siemion I. S. *Wroclaw University Press*, 1979, p. 41.
12. Плужников К. А., Карелин А. А., Цетлин В. И. Тез. докл. III двустороннего симпозиума СССР — Швейцария «Биологические мембраны. Структура и функция». Ташкент, 1983, с. 138.
13. Sugiyama H., Changeux J.-P., *Eur. J. Biochem.*, 1975, v. 55, p. 505—515.
14. Reynolds J. A., Karlin A. *Biochemistry*, 1978, v. 17, № 11, p. 2035—2038.
15. Карелин А. А., Плужников К. А. Тез. докл. двустороннего симпозиума СССР — Франция «Структура и функции белков и нуклеиновых кислот». Цхалтубо, 1982, с. 127—128.
16. Zingsheim H. P., Barrantes F. J., Frank J., Hönicke W., Neugebauer D.-Ch. *Nature*, 1982, v. 299, p. 81—84.
17. Tzartos S. J., Changeux J.-P. *EMBO J.*, 1983, v. 2, № 3, p. 381—387.
18. Hucho F. *FEBS Lett.*, 1979, v. 103, № 1, p. 27—32.
19. Nathanson N. M., Hall Z. W. *J. Biol. Chem.*, 1980, v. 255, № 4, p. 1698—1703.
20. Rang H. P. *Quart. Rev. Biophys.*, 1975, v. 7, № 3, p. 283—399.
21. Sumikawa K., Houghton M., Smith J. C., Bell L., Richards B. M., Barnard E. A. *Nucl. Acids Res.*, 1982, v. 10, № 9, p. 5809—5822.
22. Claudio T., Ballivet M., Patrick J., Heinemann S. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1983, v. 80, № 2, p. 1111—1115.
23. Noda M., Takahashi H., Tanabe T., Tojoso M., Kikuyotani S., Hirose T., Asai M., Takashima H., Inayama S., Miyata T., Numa S. *Nature*, 1983, v. 301, p. 251—255.
24. Haring R., Kloog Y., Kalir A., Sokolovsky M. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1983, v. 113, № 2, p. 723—729.
25. Hucho F., Schielber W. *Mol. and Cell. Biochem.*, 1977, v. 18, № 1, p. 151—154.
26. Dunn S. M. J., Conti-Tronconi B. M., Raftery M. A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1983, v. 22, № 11, p. 2512—2516.
27. Conti-Tronconi B. M., Dunn S. M. J., Raftery M. A. *Biochem. and Biophys. Commun.*, 1982, v. 107, № 1, p. 123—129.
28. Dunn S. M. J., Raftery M. A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1982, v. 79, № 14, p. 6757—6761.
29. Tsetlin V. I., Arseniev A. S., Utkin Yu. N., Gurevich A. Z., Senyavina L. B., Bystrov V. F., Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A. *Eur. J. Biochem.*, 1979, v. 94, № 2, p. 337—346.

Поступила в редакцию
30.IX.1985

THE EFFECTS OF NEUROTOXIN II *NAJA NAJA OXIANA* MODIFICATION ON THE STOICHIOMETRY OF ITS COMPLEXES WITH THE ACETYLCHOLINE RECEPTOR

KARELIN A. A., PLUZHNIKOV K. A., TSETLIN V. I.

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

It was discovered that illumination of the complex formed by the solubilized acetylcholine receptor from *Torpedo marmorata* and Lys²⁵-*p*-azidobenzoyl derivative of neurotoxin II results in the appearance on the receptor of up to 4 additional binding sites. Acetylcholine and neurotoxin II, but not the long-chain neurotoxins bind specifically to these sites. The additional binding sites could be also detected after illuminating the receptor complex with other photoactivable derivatives, provided the latter were displaced from one of the two main binding sites by hexa(trifluoroacetyl)neurotoxin II. A similar, but less pronounced effect, was observed on binding Lys²⁵ (Ac) derivative of neurotoxin II. The formation of the additional binding sites was found to depend on the activity of the receptor preparations as well as on the mutual influence of the two main toxin-binding sites.