



УДК 591.145.2—544.088 : 577.354

© 1991 г.

В. Г. Красноперов*, О. Г. Шамотиенко, Е. В. Гришин*

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ α -[¹²⁵I]ЛАТРОКРУСТОТОКСИНА
С ПЛАЗМАТИЧЕСКИМИ МЕМБРАНАМИ НЕРВНЫХ КЛЕТОК
РЕЧНОГО РАКА *ASTACUS ASTACUS*Филиал Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Пушкина,
Московской обл.;

* Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва

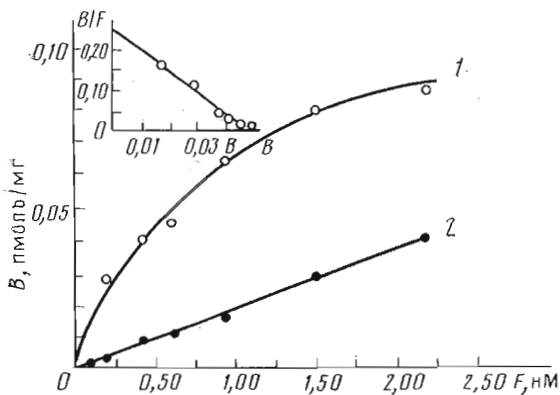
Нейротоксины, избирательно взаимодействующие с различными функционально важными компонентами нервных клеток, являются эффективными инструментами для изучения молекулярной и функциональной организации нервной системы. Наличие специфических нейротоксинов позволило решить проблему идентификации и выделения ряда ионных каналов, нейрорецепторов. При изучении структурной организации мембранных систем нервных клеток ракообразных важное значение может сыграть выделенный нами ранее α -латрокрустотоксин — нейротоксин из яда паука каракурта *Latrodectus mactans tredecimguttatus*, оказывающий в низких концентрациях летальное воздействие на многие виды ракообразных [1]. Присутствие именно этого токсина в яде каракурта, по-видимому, обуславливает пресинаптическую активность яда в отношении ракообразных, зарегистрированную на синаптических окончаниях нервных клеток омара [2]. Наличие радиоактивного производного α -латрокрустотоксина (ЛКТ) является необходимой основой для изучения как мембраносвязанного, так и солюбилизированного рецептора токсина, а в перспективе — для выделения рецептора в индивидуальном виде и определения его структуры. Так же интересной представляется возможность проведения сравнительного анализа рецептора α -латрокрустотоксина с выделенным ранее из мозга быка рецептором α -латротоксина [3].

В настоящей работе описано получение биологически активного радиоактивного производного ЛКТ и определение основных параметров связывания меченого токсина плазматическими мембранами нервных клеток *Astacus astacus*.

Радиоактивное мечение ЛКТ было проведено с помощью реактива Болтона — Хантера согласно методике [4]. Предварительно токсин был тщательно анализирован против 20 мМ Na-фосфатного буфера, pH 8,0. Доля биологически активного меченого токсина, извлекаемая из инкубационной среды избытком плазматических мембран, составила приблизительно 30%. Удельная радиоактивность препарата достигла 160 Ки/ммоль.

В качестве источника плазматических мембран нервных клеток использовали препараты брюшной и грудной нервных цепочек речного рака *A. astacus*. Исходный материал нервной ткани гомогенизировали с помощью аппарата Поттера в 20 мМ трис-HCl-буфере, pH 8,0, содержащем в качестве ингибиторов протеиназ 5 мМ EDTA и 0,1 мМ фенилметилсульфонилфторид. Гомогенат центрифугировали при 20 000g 30 мин. Полученный осадок мембранной фракции ресуспендировали и пересаживали в том же буфере.

Для изучения взаимодействия подтированного токсина с плазматическими мембранами смесь инкубировали в центрифужных пробирках



Зависимость общего (1) и неспецифического (2) связывания $[^{125}\text{I}]\text{ЛКТ}$ плазматическими мембранами из нервных клеток речных раков *A. asiacus*. Использовали 250 мкг мембранного белка. Связывание проводили в 20 мМ трис-НСl-буфере, рН 7,5, содержащем 0,1 М NaCl, 5 мМ CaCl₂, 1% бычьего сывороточного альбумина. Неспецифическое связывание определяли в присутствии 100 нМ нативного токсина. Вставка: рецепция $[^{125}\text{I}]\text{ЛКТ}$ мембранами в координатах Скэтчарда. B — количество связанного $[^{125}\text{I}]\text{ЛКТ}$, F — концентрация свободного $[^{125}\text{I}]\text{ЛКТ}$

(1,5 мл, фирма Eppendorf), центрифугировали, удаляли надосадочную жидкость и считали радиоактивность в осадке. Максимальное связывание $[^{125}\text{I}]\text{ЛКТ}$ при 20° С достигалось через 15 мин после начала инкубации.

На специфическую рецепцию $[^{125}\text{I}]\text{ЛКТ}$ мембранами оказывают воздействие многие вещества. Так, например, в присутствии 5 мМ CaCl₂ связывание токсина возрастает приблизительно на 30% по сравнению с контролем. На уровень неспецифического связывания ионы кальция существенного влияния не оказывают. EDTA, напротив, в концентрации 10 мМ снижает связывание на 28% по сравнению с контролем, однако полного подавления связывания в присутствии EDTA не происходит. Возрастанию специфического связывания в 1,5–2,0 раза способствует снижение рН инкубационной среды с 8,0 до 7,0.

Было также изучено конкурентное ингибирование связывания $[^{125}\text{I}]\text{ЛКТ}$ α -латротоксином и α -латроинсектотоксином — пресинаптическими нейротоксинами, специфически воздействующими соответственно на позвоночных и насекомых. Степень ингибирования связывания в присутствии 300–500-кратного избытка α -латротоксина и α -латроинсектотоксина составила не более 20–25%.

Зависимость уровня специфического связывания меченого токсина мембранами от концентрации $[^{125}\text{I}]\text{ЛКТ}$ приведена на рисунке. Плотность рецепторов ЛКТ составила приблизительно 0,04 пмоль/мг мембранного белка. Константа диссоциации токсин-рецепторного комплекса равна 0,07 нМ. Анализ кривой связывания в координатах Скэтчарда не обнаружил на графике точек перегиба, что свидетельствует о существовании участков связывания одного класса.

Интересно, что в случае плазматических мембран из мышц брюшка рака достоверное специфическое связывание $[^{125}\text{I}]\text{ЛКТ}$ не было обнаружено. Сравнение данных по связыванию $[^{125}\text{I}]\text{ЛКТ}$ с мембранами из нервных клеток рака (K_d 0,07 нМ, B_{max} 0,04 пмоль/мг) и α -латротоксина с мембранами из коры головного мозга крупного рогатого скота показывает, что в случае α -латротоксина связывание характеризуется практически таким же средством (K_d 0,16 нМ) и существенно большим удельным содержанием рецептора (B_{max} 0,5 пмоль/мг) [5]. Наиболее вероятной причиной этого различия является то, что кора головного мозга быка, применявшаяся для изучения рецепторов α -латротоксина, представляет собой наиболее богатый источник пресинаптических мембран, в то время как в случае ЛКТ использовали цельную ткань нервных узлов рака.

Авторы выражают благодарность Ж. П. Шурановой (ИВНД) за предоставление раков и помощь в проведении исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Красноперов В. Г., Шамотиенко О. Г., Гришин Е. В. // Биоорг. химия. 1990. Т. 16. № 11. С. 1567—1569.
2. Fritz L. C., Tzeng M.-C., Mauro A. // Nature. 1980. V. 283. № 5746. P. 486—487.
3. Petrenko A. G., Kovalenko V. A., Shamotienko O. G., Surkova I. N., Tarasyuk T. A., Ushkaryov Yu. A., Grishin E. V. // EMBO J. 1990. V. 9. № 6. P. 2023—2027.
4. Bolton A. E., Hunter W. M. // Biochem. J. 1973. V. 133. P. 529—539.
5. Петренко А. Г., Шамотиенко О. Г., Суркова И. Н., Коваленко В. А., Гришин Е. В. // Биоорг. химия. 1990. Т. 16. № 2. С. 149—157.

Поступило в редакцию
24.X.1990

V. G. KRASNOPEROV *, O. G. SHAMOTIENKO, E. V. GRISHIN *

INTERACTION OF α - 125 I]LATROCRUSTATOXIN WITH PLASMATIC MEMBRANES FROM THE NERVE CELLS OF THE CRAYFISH *ASTACUS ASTACUS*

*Branch of the M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Pushchino, Moscow Region;
* M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

α -Latrocrustatoxin, the crustacean-specific neurotoxin from the venom of the black widow spider *Latrodectus mactans tredecimguttatus* was radioactively labelled with Bolton — Hunter reagent to the specific activity of 160 Ci/mmol with retention of the biological activity. A highly specific binding of radioactive toxin on plasmatic membranes from the crayfish *Astacus astacus* nerve cells with $B_{\max} = 0,04$ pmol binding toxin/mg membrane protein and $K_d = 0,7 \cdot 10^{-10}$ M was demonstrated.

Технический редактор Н. Н. Беляева

Сдано в набор 20.02.91	Подписано к печати 03.04.91	Формат бумаги 70×108 ^{1/16}	
Высокая печать	Усл. печ. л. 12,6	Усл. кр.-отт. 9,5 тыс.	Уч.-изд. л. 14,5 Бум. л. 4,5
	Тираж 742 экз.	Зак. 1113	Цена 2 р. 60 к.

Адрес редакции: 117871, ГСП-7, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, корп. 32, комн. 306,
телефон: 330-60-38

2-я типография издательства «Наука», 121099, Москва, Шубинский пер., 6