



УДК 591.145.2.088

© 1994 Ю. Н. Уткин, К. Вайзе\*, Е. Тритчер\*,  
Я. Махольд, П. Франке\*, В. И. Цетлин, Ф. Хухо\*

СТРУКТУРА ПЕПТИДНЫХ ФРАГМЕНТОВ КРОСС-СШИТОГО  
КОМПЛЕКСА [Lys(Abz)<sup>26</sup>]НЕЙРОТОКСИНА II  
*Naja naja oxiana* С НИКОТИНОВЫМ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫМ  
РЕЦЕПТОРОМ ИЗ *Torpedo californica*

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и  
Ю. А. Овчинникова РАН, Москва;

\* Институт биохимии Свободного университета Берлина, Берлин

Ключевые слова: нейротоксин, ацетилхолиновый рецептор, фотоиндуцированные сшивки.

После облучения комплекса никотинового ацетилхолинового рецептора (AChR) с иодированным [Lys(Abz)<sup>26</sup>]нейротоксином II выделяли меченую δ-субъединицу AChR, расщепляли ее с помощью LysC-эндопротеиназы и гидролизат разделяли офВЭЖХ. При масс-спектрометрическом анализе радиоактивной фракции обнаружен пептид δ-субъединицы 148—170 ( $M_r$  2593). В результате очистки радиоактивной офВЭЖХ-фракции с помощью электрофореза в трициновом геле получены три радиоактивные полосы ( $M \sim 16, 10$  и  $8$  кДа). Дегградация по Эдману дала для всех них последовательность фрагмента δ-субъединицы, начинающегося с Phe<sup>148</sup>. При дальнейшем расщеплении радиоактивной фракции в геле с помощью AspN-протеиназы и последующей офВЭЖХ радиоактивный пик элюировался в условиях, близких условиям элюции единственного радиоактивного пептида 30—44, получающегося при последовательном расщеплении [<sup>125</sup>I]нейротоксина II LysC/AspN-протеиназами. Этот результат указывает на присутствие соответствующего фрагмента нейротоксина в образце, в котором была обнаружена приведенная выше последовательность рецептора.

Так как в радиоактивных продуктах кросс-сшивок не были обнаружены последовательности нейротоксина, в модельных опытах на пикомольном уровне исследована дегградация по Эдману нейротоксина II, его фрагментов, а также влияние на дегградацию *n*-азидобензоильной группы и ее фотоактивации. В целом секвенирование нейротоксина II и его фрагментов, содержащих фотомеченый и йодированный остатки,

Сокращения: Abz — *n*-азидобензоильная группа; AChR — ацетилхолиновый рецептор; NT-II — нейротоксин II, офВЭЖХ — обращенно-фазовая хроматография, РГН — фенилтиогидантоин, трицин — *N*-трис(гидроксиметил)метилглицин.

проходит с крайне низкими начальными выходами; дальнейшее падение выходов наблюдается при деградации облученных  $Lys^{26}$ -меченых пептидов. Полученные результаты объясняют трудности в детектировании последовательностей нейротоксина в продуктах кросс-сшивок, доступных в количествах 10—20 пмоль. Для однозначной идентификации участков связывания нейротоксина на субъединицах AChR необходимы дальнейшие исследования, включающие изучение стабильности продуктов кросс-сшивок в ходе разделения и анализа пептидов.

Никотиновый ацетилхолиновый рецептор (AChR) принадлежит к классу лигандуправляемых ионных каналов (рецепторы типа I). Он содержит область, воспринимающую сигнал («R»), устройство для преобразования сигнала («T»), а также эффектор («E»), интегрированные в гетеропентамерном белковом комплексе, имеющем четвертичную структуру  $\alpha_2\beta\gamma\delta$  (см. обзоры [1—3]). Рецепторы типа I принципиально отличаются от G-белокзависимых рецепторов (тип II), которые построены из одной полипептидной цепи и взаимодействуют с компонентами «T» и «E», находящимися на других белках. Для рецепторов типа II различные функции могут быть легко соотнесены с отдельными белками, тогда как для рецепторов типа II такое соотнесение является более сложным. В частности, роль отдельных субъединиц AChR все еще обсуждается.

Благодаря усилиям многих лабораторий было выяснено, что  $\alpha$ -субъединица AChR играет ключевую роль в связывании агонистов и конкурентных антагонистов (см. [3]). Роль остальных субъединиц менее ясна. В настоящее время биологические функции субъединиц AChR изучаются разнообразными методами — такими, как направленный мутагенез [4], экспрессия различных комбинаций субъединиц [5, 6] и аффинное мечение [7—9]. Например, на  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  и  $\delta$ -субъединицах были локализованы остатки, которые фосфорилируются различными киназами [10], метятся блокаторами каналов [11, 12], а также фосфолипидными [13] и другими гидрофобными метками [14].

В этих экспериментах была получена информация об участии и других субъединиц, кроме  $\alpha$ , в формировании лигандсвязывающих областей [7, 15]. Для картирования лигандсвязывающих участков важно знать не только роль отдельных остатков различных субъединиц, но также и пространственное расположение таких остатков. В этом отношении  $\alpha$ -нейротоксины змей, пространственная структура которых известна (см. недавний обзор [16]), обладают рядом преимуществ перед другими лигандами AChR. Ранее было показано, что различные участки молекулы нейротоксина контактируют с различными субъединицами AChR (см. [17] и приведенные там ссылки). Так как  $\alpha$ -нейротоксины змей обладают сравнительно жесткой структурой, анализ токсин-рецепторных кросс-сшивок в принципе может быть использован для характеристики поверхности рецептора.

Следует отметить, что в модельных опытах, использующих синтетические или генетически экспрессированные фрагменты  $\alpha$ -субъединицы AChR, были идентифицированы районы, принимающие участие в связывании  $\alpha$ -нейротоксинов [18—22]. Однако до настоящего времени не имеется прямых биохимических данных, выявляющих роль отдельных остатков  $\alpha$ - или других субъединиц интактного пентаолигомерного AChR в его взаимодействии с нейротоксинами.

Ранее [17] мы установили, что *n*-азидобензоильное производное нейротоксина II (NT-II) из яда кобры *Naja naja oxiana* (рис. 1), несущее эту фотометку на остатке  $Lys^{46}$ , взаимодействует с  $\alpha$ -субъединицей AChR, тогда как аналогичное  $Lys^{26}$ -производное метит  $\gamma$ - и  $\delta$ -субъединицы рецептора соответственно в высоко- и низкоаффинном участках связывания им *d*-тубокурарина. Так как в изолированном виде «не- $\alpha$ »-субъединицы ( $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) не связывают нейротоксины и отсутствует информация о том, какие их области входят в лигандсвязывающие

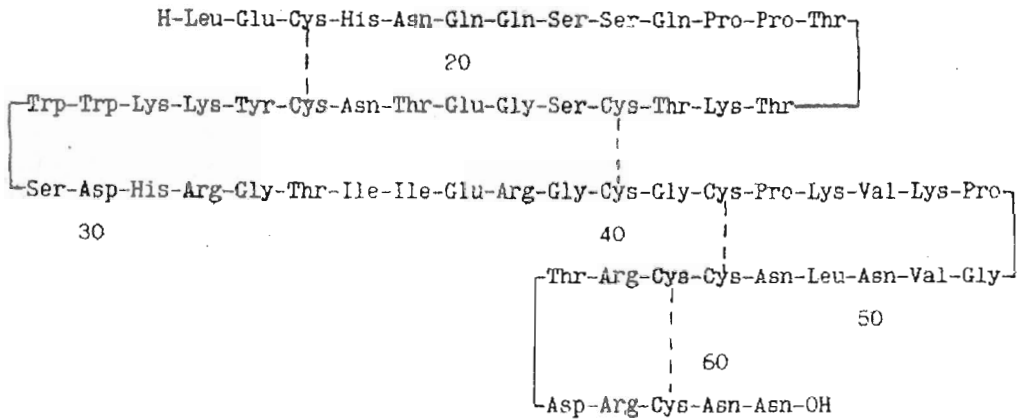


Рис. 1. Аминокислотная последовательность нейротоксина II из яда кобры *Naja naja oxiana*

участки олигомерного AChR, в настоящей работе предпринята попытка установить область  $\delta$ -субъединицы, контактирующую с молекулой нейротоксина.

*Взаимодействие иодированного фотоактивируемого производного нейротоксина II с AChR и выделение меченой субъединицы*

Для изучения взаимодействия нейротоксина с AChR в *n*-азидобензойное Lys<sup>26</sup>-производное нейротоксина вводили <sup>125</sup>I с помощью хлорамина T. Для выбора подходящих условий расщепления и последующего секвенирования было важно установить положение, по которому происходит иодирование токсина. При секвенировании <sup>125</sup>I-меченого нейротоксина II мы обнаружили, что иодируется главным образом His<sup>31</sup> [23] и в существенно меньшей степени остаток His<sup>4</sup>. Лишь небольшое количество радиоактивности было обнаружено в Tyr<sup>24</sup>. Интересно, что Мене и др. [24] показали, что радиомечение  $\alpha$ -нейротоксина *Naja nigricollis* с помощью иодирования и последующего дегалогенирования тритием проходит исключительно по остатку His, а не Tyr. Однако в упомянутой работе локализация меченого остатка His не была проведена.

После облучения комплекса AChR с <sup>125</sup>I-меченым Lys(Abz)<sup>26</sup>-производным NT-II продукты разделяли с помощью препаративного электрофореза. Объединенная радиоактивная фракция, отвечающая кросс-сшитой  $\delta$ -субъединице, использовалась для последующего анализа. Полученный образец содержал значительное количество немеченой  $\delta$ -субъединицы, но был практически свободен от других субъединиц рецептора, о чем свидетельствовали данные аналитического гель-электрофореза (результаты не приведены). Обычно около 3 мг суммарного белка наносилось на препаративный гель, и в результате получали ~10 мкг (140 пмоль) меченой  $\delta$ -субъединицы (рассчитано по радиоактивности). Такой образец содержал примерно семикратный избыток  $\delta$ -субъединицы, не связанной с токсином.

*Расщепление ковалентного комплекса  $\delta$ -субъединицы с нейротоксином и выделение радиоактивных пептидных фракций*

Выделенный продукт сшивки  $\delta$ -субъединицы с нейротоксином подвергали протеолитическому расщеплению LysC-эндопротеиназой, а затем разделяли офВЭЖХ (рис. 2). Профиль радиоактивности имеет два основных широких пика (пик I, фракции 52—57, и пик II, фракции 60—63). Вещества, соответствующие пикам I и II, разделяли в трициновом геле и переносили на иммобилон, используя методики, описанные в работах [25, 26]. Радиоавтография блота пика II обнаружила лишь слабые полосы, поэтому этот образец в дальнейшем не анализировали. Радиоавтография блота пика I выявила три основные радиоактивные полосы, отвечающие веществам с молекулярными массами 16, 10 и 8 кДа (рис. 3),

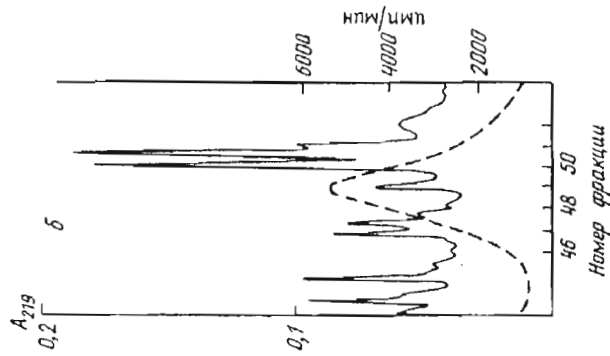
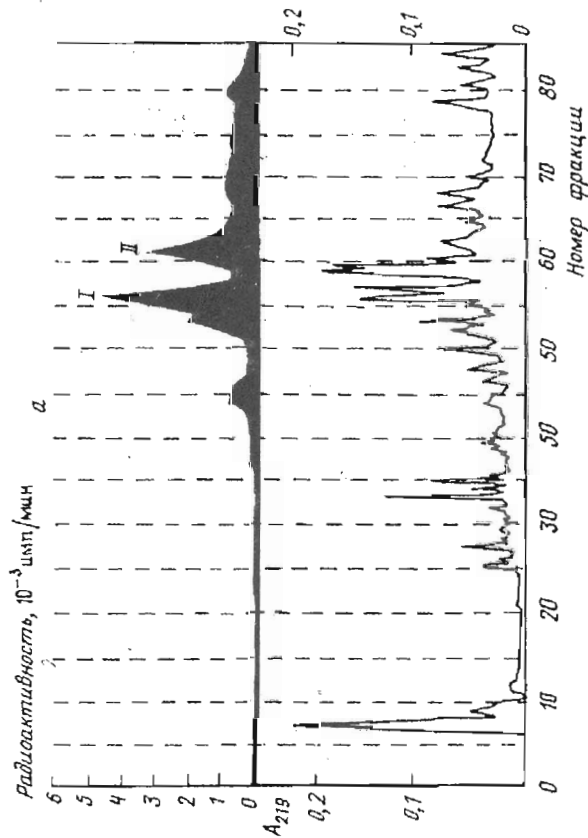


Рис. 2. офВЭЖХ продуктов катализируемого LysC-протеиназой гидролиза кросс-сшитого комплекса [Lys(Abz)<sup>26</sup>] NT-II с δ-субъединицей AChR на колонках Vydac C4 (4,6×250 мм) (а) и Nucleosil C4 (4,6×250 мм) (б). Градиент от 0 до 80% ацетонитрила за 80 мин, скорость элюции 0,5 мл/мин, объем фракции 0,5 мл (т. е. в выбранных условиях на рис. а и б номер фракции указывает как % ацетонитрила, так и время). Верхний и нижний профили на рис. а отвечают соответственно радиоактивности и поглощению при 219 нм; на рис. б радиоактивность обозначена пунктирной линией. На рис. б приведена часть хроматограммы в области пика, обладающего наиболее высокой радиоактивностью; фракции 46—51 исследовали с помощью масс-спектрометрии (см. табл. 2)



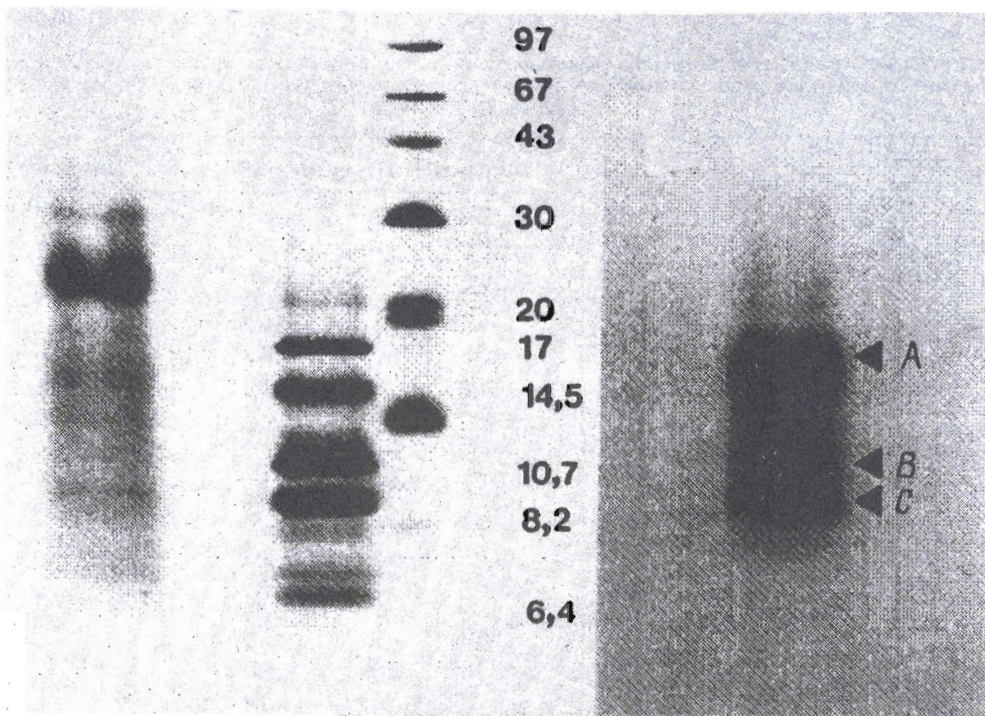


Рис. 3. Разделение пула I (см. рис. 2а) в трициновом геле в присутствии SDS. В левой части рисунка показано прокрашивание образца кумасси голубым, а также два набора маркеров молекулярных масс. В правой части рисунка приведена радиоавтография геля. Полосы А, В и С, отмеченные треугольниками, вырезали и секвенировали

которые были вырезаны и секвенированы. Во всех трех случаях главной последовательностью была Phe-Thr-Ala-Leu-Asp- (табл. 1), отвечающая пептиду, начинающемуся с остатка в положении 148  $\delta$ -субъединицы AChR. Количества этого пептида, определяемые по отщепляющимся фенолтиогидантоинам аминокислот, были близки количествам радиоактивных пептидов, взятых для деградации и оцененных по удельной радиоактивности фотоактивируемого производного нейротоксина II (см. табл. 1). Для полосы 16 кДа наблюдалась также побочная последовательность Glu-Thr-Asp-Glu-Thr-, отвечающая LysC-фрагменту  $\delta$ -субъединицы AChR, начинающемуся с остатка в положении 47. Эта последовательность отсутствовала в остальных двух случаях, где не наблюдалось каких-либо дополнительных последовательностей, отвечающих фрагментам рецептора. Преобладающая белковая полоса 22 кДа, обнаруживаемая при окрашивании геля кумасси (рис. 3), начиналась с последовательности Glu-Thr-Asp-Glu-Thr- и не содержала радиоактивности. Таким образом, можно заключить, что в полосах 16, 10 и 8 кДа радиоактивность связана с пептидами, имеющими идентичный N-концевой остаток (Phe<sup>148</sup>), но различающимися по молекулярной массе — по-видимому, из-за неполноты ферментативного расщепления.

Изложенные результаты могли бы рассматриваться как свидетельство в пользу локализации сшивки AChR-нейротоксин на пептиде  $\delta$ -субъединицы, начинающемся с Phe<sup>148</sup>. Однако нам не удалось обнаружить в комплексе последовательность, отвечающую фрагменту нейротоксина. В другом аналогичном эксперименте мы попытались избежать потерь, связанных с электрофорезом и последующим блотированием. Для этого узкие фракции (рис. 2б) ВЭЖХ анализировали с помощью масс-спектрометрии.

Данные табл. 2 показывают, что таким образом был идентифицирован ряд фрагментов  $\delta$ -субъединицы. Фракции 46 и 47 содержат почти исключительно

Результаты микросеквенирования радиоактивных полос, полученных после электрофореза и блоттинга продуктов расщепления LysC-протеиназой ковалентного комплекса [Lys(Abz)<sup>26</sup>]NT-II с δ-субъединицей AChR

Шаг	РГН аминокислоты	Количество РГН-производного (пмоль) для полос*		
		А	В	С
1	Phe	12,8	12,5	11,2
2	Thr	19,4	6,5	6,8
3	Ala	10,5	3,4	9,2
4	Leu	12,8	5,1	12,8
5	Asn	9,2	5,4	6,3
6	Tyr	7,8		4,8
7	Asp	12,5		9,7
8	Ala	10,2		6,0
9	Asn	11,4		5,5
10	Glu	11,5		5,7
11	He	12,6		7,8
12	Thr	6,4		2,2
13	Met	4,2		

\* Полоса А: *M* 16 кДа, количество пептида 13,7 пмоль (по радиоактивности); полоса В: *M* 10 кДа, 7,3 пмоль; полоса С: *M* 3,0 кДа, 8,9 пмоль.

фрагмент δ-субъединицы 1—19, во фракции 48 обнаружен пептид Phe<sup>148</sup>—Leu<sup>170</sup>. Последний присутствует также во фракции 49, которая соответствует центру радиоактивного пика. Отнесение масс 1911 и 2593 Да было подтверждено деградацией по Эдману соответствующих пептидов.

Сопоставление данных масс-спектрометрии с изложенными выше результатами электрофореза (рис. 3) показывает, что в обоих случаях радиоактивность присутствует в той же фракции, что и пептид, начинающийся с Phe<sup>148</sup>. Однако, как и ранее, ни данные масс-спектрометрии, ни секвенирование не выявили присутствия фрагментов последовательности токсина. Следует отметить, что при гель-электрофорезе самая низкомолекулярная радиоактивная фракция имела *M*~8 кДа, тогда как масс-спектрометрия дала значение *M*~2593 Да для пептида 148—170. Таким образом, остается возможность того, что в шпикве участвуют остатки δ-субъединицы, находящиеся после Leu<sup>170</sup>, а соответствующий продукт не детектируется масс-спектрометрически.

Мы предполагали, что при деградации по Эдману секвенирование фрагмента нейротоксина может блокироваться наличием кросс-сшивки: остаток Lys<sup>26</sup>, несущий фотолизываемую группу, после расщепления LysC-протеиназой оказывается N-концевым во фрагменте токсина. В связи с этим было использовано дополнительное расщепление для получения фрагмента токсина, более пригодного для последующего анализа. С этой целью была выбрана AspN-протеиназа, которая должна дать фрагмент токсина, начинающийся в положении Asp<sup>30</sup> после кросс-сшивки и содержащий йодированный остаток His<sup>31</sup> во втором положении. Расщепление с помощью AspN-протеиназы продуктов кросс-сшивки, полученных после действия LysC-протеиназы, проводили в геле по методике [27], после чего пептидные фрагменты элюировали и разделяли ВЭЖХ. Основной радиоактивный продукт элюировался приблизительно в том же положении в градиенте, что и единственный радиоактивный фрагмент, полученный при LysC/AspN-расщепле-

Данные масс-спектрометрии для фракций в области радиоактивного пика (см. рис. 2б)

Фракция	Мол. масса (Да) (по данным масс-спектрометрии)	Предполагаемый фрагмент $\delta$ -субъединицы	Мол. масса (Да) (рассчитано)
46	1911,3 $\pm$ 0,2	Val <sup>1</sup> —Lys <sup>19</sup>	1912,2
47	1911,3 $\pm$ 0,2	Val <sup>1</sup> —Lys <sup>19</sup>	1912,2
48	1910,9 $\pm$ 0,1	Val <sup>1</sup> —Lys <sup>19</sup>	1912,2
	2592,3 $\pm$ 0,1	Phe <sup>148</sup> —Leu <sup>170</sup>	2593,9
	2615,3 $\pm$ 0,1	(Phe <sup>148</sup> —Leu <sup>170</sup> ) + Na <sup>+</sup>	2616,8
49	2592,3 $\pm$ 0,1	Phe <sup>148</sup> —Leu <sup>170</sup>	2593,9
	2615,3 $\pm$ 0,1	(Phe <sup>148</sup> —Leu <sup>170</sup> ) + Na <sup>+</sup>	2616,8
	3033,6 $\pm$ 0,5	Val <sup>1</sup> —Lys <sup>25</sup>	3034,5
50	2592,3 (минорный)	Phe <sup>148</sup> —Leu <sup>170</sup>	2593,9
	3428,8 $\pm$ 1,2		
	(4247,3 $\pm$ 3,3)		
51	3429,1 $\pm$ 0,7		
	3059,1 $\pm$ 0,1	Asp <sup>171</sup> —Lys <sup>195</sup>	3059

нии восстановленного карбоксиметилированного [<sup>125</sup>I]нейротоксина II (рис. 4). Последний идентифицирован как Asp<sup>30</sup>—Lys<sup>44</sup> с помощью деградации по Эдману и масс-спектрометрии (данные не приведены). (Возможной причиной наличия двух близких пиков на рис. 4б может быть дополнительное неполное расщепление AspN-протеиназой фрагмента нейротоксина II по остатку Glu<sup>37</sup>.)

При деградации по Эдману продукта сшивки  $\delta$ -субъединицы, расщепленного с помощью LysC- и AspN-протеиназ (17,5 пмоль по оценке радиоактивности), последовательность токсина не была обнаружена. Ожидаемая последовательность соответствующего фрагмента  $\delta$ -субъединицы (161—164), AspLeuMetThr, была идентифицирована на уровне ~60 пмоль, что может быть вызвано коэлюцией соответствующего пептида из немеченой  $\delta$ -субъединицы.

Деградация по Эдману фрагмента 30—44 нейротоксина II была проведена несколько раз с использованием различных количеств пептида. Начальный выход составлял около 15% исходя из 350 пмоль и был еще ниже при секвенировании 30 пмоль. Следовательно, в ретроспективе неудивительно, что последовательность нейротоксина не была обнаружена при наличии малых количеств (менее 20 пмоль) кросс-сшитого продукта.

В связи с полученными результатами мы провели серию модельных опытов для того, чтобы проверить, как проходит на пикомольном уровне деградация по Эдману фотоактивируемых производных нейротоксина II, подвергавшихся различным обработкам.

#### *Модельные опыты деградации по Эдману фотоактивируемых производных нейротоксина II и их фрагментов*

Ранее при установлении положения фотоактивируемых меток в молекуле нейротоксина II азидную группировку предварительно восстанавливали до аминогруппы [28]. После этого не было сложностей при разделении и анализе триптических пептидов восстановленных — карбоксиметилированных производных. При дегра-

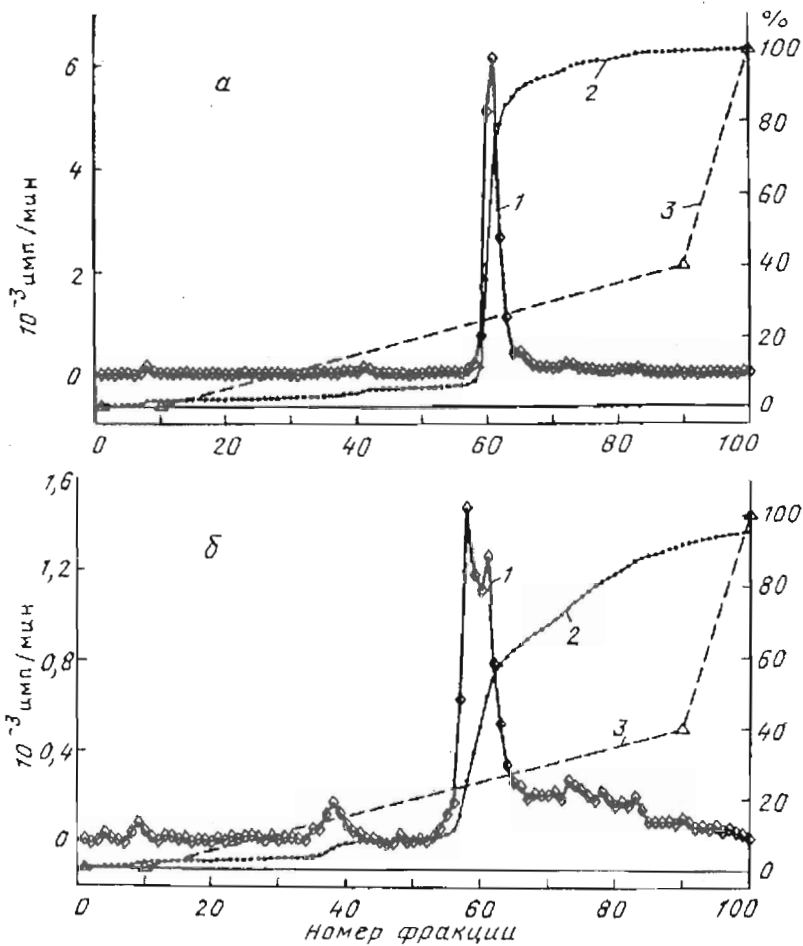


Рис. 4. ВЭЖХ радиоактивных пептидов, полученных в результате последовательного расщепления с помощью LysC- и AspN-протеиназ восстановленного карбоксиметилированного  $[Lys(Abz)^{26}]NT-II$  (а) и кросс-сшитого комплекса этого производного с  $\delta$ -субъединицей AChR (б). Колонка Nucleosil C<sub>18</sub> (4,6×250 мм). Скорость элюции 0,5 мл/мин, объем фракций 0,5 мл. 1 — профиль радиоактивности, 2 — профиль интегрирования элюируемой радиоактивности, 3 — градиент ацетонитрила. На левой оси ординат указаны величины имп/мин, значения на правой оси отвечают одновременно % ацетонитрила и выходу радиоактивности

дации по Эдману наномольных количеств восстановленного карбоксиметилированного Lys<sup>26</sup>-производного нейротоксина II, содержащего *n*-азидо [<sup>14</sup>C]бензоильную группу, было обнаружено, что эта группа не препятствует деградации; действительно, на шаге 26 было обнаружено высвобождение радиоактивности.

Так как продукты расщепления кросс-сшитого комплекса нейротоксина II с AChR были доступны лишь в пикомольных количествах, для того чтобы облегчить анализ секвенирования в модельных экспериментах, казалось целесообразным, чтобы остаток, несущий фотометку, а также иодированный остаток располагались бы в пределах 10—15-членного фрагмента N-концевой последовательности. Такой фрагмент, Thr<sup>21</sup>—Glu<sup>37</sup>, образуется при расщеплении нейротоксина II протеиназой V8 *Staphylococcus*.

При деградации радиоактивного V8-пептида, выделенного из восстановленного и карбоксиметилированного [<sup>14</sup>C]Lys<sup>26</sup>-производного нейротоксина II наиболее высокая радиоактивность высвобождалась на шаге 6 (Lys<sup>26</sup>), но она составляла лишь 10% от внесенной радиоактивности.



Для лучшего моделирования продуктов токсин-рецепторных кросс-сшивок иодированное фотоактивируемое  $\text{Lys}^{26}$ -производное сначала облучали и лишь затем проводили восстановление и карбоксиметилирование. Такая обработка привела к значительно более широкому пику при офВЭЖХ по сравнению с производным, в котором *n*-азидобензоильная группа сначала была восстановлена. После расщепления протеиназой V8 пик радиоактивного пептида 21—37, выделенный ВЭЖХ на колонке Ultrapore C8 TM, также оказался очень широким (данные не приведены). Причиной может быть множественность хроматографической сходных продуктов, образующихся при фотоактивации *n*-азидобензоильной группы. По-видимому, процессы фотоактивации и возможные внутримолекулярные кросс-сшивки затрагивают в первую очередь остатки в ближайшем окружении фотоактивируемой группы: по сравнению с рассмотренными выше случаями наблюдается в 2 раза более низкий выход фенилтиогидантоина  $\text{Lys}^{25}$ . На шаге, отвечающем  $\text{Lys}^{26}$ , не наблюдается пика РТН  $\text{Lys}$ ; если предварительно проводилось восстановление *n*-азидобензоильной группы, то значительно позднее является новый интенсивный пик. В этом случае, исходя из 150 пмоль пептида, нам не удалось на 12-м шаге обнаружить РТН His<sup>31</sup>. Ожидаемая радиоактивность высвободилась на этом шаге, однако ее количество не превышало 1 пмоль. Когда для секвенирования было взято 30 пмоль этого же пептида, удалось надежно идентифицировать только РТН-производное Thr и Asp на первых двух шагах.

Таким образом, представленные результаты свидетельствуют об определенных трудностях секвенирования фрагмента нейротоксина II, содержащего фотометку на  $\text{Lys}^{26}$ . По-видимому, эти трудности — в значительной мере следствие фотоактивации *n*-азидобензоильной группы, находящейся именно в этом положении, о чем свидетельствуют результаты опытов с *n*-азидо [<sup>14</sup>C]бензоильным  $\text{Lys}^{46}$ -производным нейротоксина II: когда это соединение восстанавливали и карбоксиметилировали с предварительным облучением или без него, а затем расщепляли трипсином, не наблюдалось уширения пика радиоактивного пептида Val<sup>45</sup>—Arg<sup>55</sup> при ВЭЖХ. В обоих случаях пептид удается секвенировать. Повторный выход для Val<sup>45</sup> и Val<sup>49</sup> составлял 85—95%. Однако, подобно вышеописанным фрагментам нейротоксина II, начальный выход составлял ~20%. В свете описанных модельных опытов неудивительно, что при секвенировании малых количеств продуктов кросс-сшивок нейротоксина II с AchR мы не смогли обнаружить последовательностей  $\text{Lys}^{26}$ -меченого нейротоксина.

Одной из проблем, с которой мы столкнулись в настоящем исследовании, было уширение радиоактивных пиков и их множественность, наблюдавшаяся при разделении ферментативного гидролизата  $\delta$ -субъединицы, кросс-сшитой с нейротоксином. Модельные опыты показывают, что по крайней мере частично эти осложнения вызваны облучением, влияющим на *n*-азидобензоильную группу  $\text{Lys}^{26}$  и на аминокислотные остатки в ее окружении (вероятно, Tyr<sup>24</sup>, Trp<sup>27</sup>, Trp<sup>28</sup>).

Другой вероятной причиной присутствия многих радиоактивных пиков и невозможности детектировать фрагменты кросс-сшитого нейротоксина может быть неустойчивость фотоиндуцированных кросс-сшивок в условиях разделения и анализа пептидов. Действительно, в литературе имеются данные, указывающие на нестабильность кросс-сшивок, образованных различными типами фотометок, в условиях химического и ферментативного расщепления [29, 30].

Анализ литературы показывает, что азидные фотометки весьма успешно использовались для мечения рецепторов или их субъединиц и для определения соответствующих молекулярных масс [31], тогда как локализации кросс-сшивок в терминах идентифицированных последовательностей или конкретных остатков немногочисленны [32, 33]. В ряде случаев для локализации использовались непрямые подходы, например анализ взаимодействия между продуктами протеолиза кросс-сшитого комплекса, образованного нейротоксином скорпиона с натриевым каналом, и антителами против синтетических фрагментов последнего [34].

Полученные в настоящей работе данные указывают на то, что одним из участков  $\delta$ -субъединицы AChR, образующих кросс-сшивки с Lys<sup>26</sup>-фотоактивируемым производным нейротоксина II в комплексе с мембранным AChR, является фрагмент, начинающийся с Phe<sup>48</sup>. Структура соответствующего пептида установлена с помощью различных методов. О присутствии ковалентно связанного нейротоксина или его фрагментов в анализируемых фракциях свидетельствовало наличие в них радиоактивности при разделении субъединиц AChR, хроматографическом или электрофоретическом разделении LysC-фрагментов кросс-сшивков, а также выщеплении из последних при действии AspN-протеиназы радиоактивного пептида, совпадающего по хроматографическим характеристикам с аутентичным пептидом, полученным из [<sup>125</sup>I]нейротоксина II при последовательном действии LysC- и AspN-протеиназ. С другой стороны, в продуктах кросс-сшивков не удалось идентифицировать фрагменты нейротоксина непосредственно деградацией по Эдману или масс-спектрометрически, хотя модельные опыты выявили сложности в секвенировании фотоактивируемых производных нейротоксина II на пикомольном уровне.

Модельные опыты, выявившие сложности в секвенировании фотоактивированных производных нейротоксина II, свидетельствуют о необходимости получения продуктов кросс-сшивков в значительно больших количествах для идентификации в них фрагментов нейротоксина II непосредственно деградацией по Эдману. Это позволяет однозначно установить роль вышеупомянутого фрагмента  $\delta$ -субъединицы в связывании нейротоксина II. Вообще для надежной локализации контактов между нейротоксинами змей и AChR необходимы более эффективные способы выделения кросс-сшитых продуктов в больших количествах, а также использование различных типов фотометок — например, диазиринов [31, 35] или производных бензоилбензойной кислоты [36, 37], которые кажутся предпочтительнее нитренгенерирующих азидов по селективности или по эффективности кросс-сшивков [38, 39].

### Экспериментальная часть

В работе использовали нейротоксин II из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana* (Kemotex, Эстония),  $\alpha$ -бунгаротоксин, *d*-тубокурарин, хлорамин Т и *N*-гидрокси-сукцинимидный эфир *n*-азидобензойной кислоты (Sigma, Германия); Na<sup>125</sup>I (Amersham-Buchler, Германия). [<sup>125</sup>I]- $\alpha$ -Бунгаротоксин получен с помощью иодирования  $\alpha$ -бунгаротоксина в присутствии лактопероксидазы. Ткани электрического органа *Torpedo californica* доставлены в жидком азоте от К. Винклера (Сан-Педро, США). Использовались следующие ферменты: эндопротеиназа LysC из *Lysobacter enzymogenes* и эндопротеиназа AspN из *Pseudomonas fragi* производства Boehringer — Mannheim (ФРГ), лактопероксидаза (Sigma, США).

Мембраны, обогащенные ацетилхолиновым рецептором, получали из электрического органа *Torpedo*, как описано ранее [40]. Активные препараты определяли по связыванию [<sup>125</sup>I]- $\alpha$ -бунгаротоксина по методике [41] после добавления 0,1% тритоном X-100. Мембранные препараты, как правило, имели удельную активность около 4 нмоль  $\alpha$ -бунгаротоксинсвязывающих участков на 1 мг белка.

Фотоактивируемые производные нейротоксина II получали как описано ранее в работе [28], а [<sup>14</sup>C]Lys<sup>46</sup> — как в работе [42], с дополнительной очисткой ионообменной ВЭЖХ [17].

Иодирование [<sup>125</sup>I]NT-II. Na<sup>125</sup>I разбавляли KI (2 мг/мл) до удельной радиоактивности 560 000 расп./нмоль. 80 нмоль [Lys(Abz)<sup>26</sup>]NT-II в 300 мкл натрий-фосфатного буфера (50 mM, pH 7,4) инкубировали с 30 мкл K<sup>125</sup>I и 60 мкл хлорамина Т (1 мг/мл) в течение 5 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 120 мкг Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Продукты реакции разделяли офВЭЖХ (колонка Vydac C18, 4,6×250 мм) с использованием бинарной градиентной ВЭЖХ системы (Кнауер, Германия). Водная фаза (A) — 0,1% TFA,



органическая фаза (В) — 0,1% ТФА в ацетонитриле (линейный градиент В в А от 15 до 65% за 30 мин). Радиоактивная фракция, элюирующаяся при ~55% В, была использована для дальнейших экспериментов.

*Образование фотоиндуцированных сшивок.* К 1 мл (40 нмоль  $\alpha$ -бунгаротоксинсвязывающих участков) суспензии мембран, обогащенных AChR, добавляли 7 мл раствора радиоактивного [Lys(Abz)<sup>26</sup>]NTII (20—30 нмоль), в котором предварительно доводили pH до 7,3—7,4. Такое соотношение выбрано потому, что не все  $\alpha$ -бунгаротоксинсвязывающие участки, определенные в присутствии детергента, доступны для связывания токсина в мембранах. Смесь инкубировали 1 ч в темноте при комнатной температуре, затем центрифугировали 15 мин при 10 000 g. Полученный осадок суспендировали в 2,5 мл 0,25 М трис-НСl-буфера (pH 7,0) и облучали 4 мин УФ-светом (лампа Type 5241 Quarzlampen GmbH, Напау, ФРГ) с расстояния 8 см. Облученные мембраны осаждали центрифугированием (15 мин, 10 000 g) и использовали для дальнейших экспериментов.

*Восстановление и карбоксиметилирование продуктов сшивок.* К осадку облученных мембран добавляли 1,5 мл 0,1 М трис-НСl-буфера (pH 8,5), содержащего 1% додецилсульфат натрия, и интенсивно встряхивали до полного растворения мембран. К полученному солибилизату добавляли раствор 4 мг дитиотреита в 50 мкл того же буфера, инкубировали 18 ч при 4° С, а затем добавляли раствор 10 мг иодуксусной кислоты в 300 мкл 0,2 М NaOH. Через 30 мин добавляли 6 мг дитиотреита в 50 мкл 0,1 М трис-НСl-буфера (pH 8,5), содержащего 1% додецилсульфат натрия, и инкубировали еще 30 мин. Обработанные таким образом белки осаждали с использованием смеси хлороформ — метанол в условиях работы [43] и подвергали препаративному электрофорезу.

*Восстановление и карбоксиметилирование производных NT II.* К раствору 10—15 нмоль производного в 1,5 мл 0,2 М трис-НСl-буфера (pH 8,5), содержащего 8 М мочевины и 10<sup>-3</sup> М EDTA, добавляли раствор 4 мг дитиотреита в 50 мкл этого же буфера. Инкубировали 18 ч при комнатной температуре, затем добавляли раствор 10 мг иодуксусной кислоты в 300 мкл 0,2 М NaOH, инкубировали 30 мин и добавляли раствор 6 мг дитиотреита в 50 мкл трис-НСl-буфера, содержащего EDTA и мочевины (см. выше). Через 30 мин восстановленное карбоксиметилированное производное очищали методом офВЭЖХ.

*Субъединицы рецептора разделяли с помощью гель-электрофореза в додецилсульфате натрия, как описано ранее [12].*

*Ферментативное расщепление.* Фракции, содержащие продукты сшивки  $\delta$ -субъединицы с [Lys(Abz)<sup>26</sup>]NTII, концентрировали и отмывали от избытка додецилсульфата натрия на микроконцентраторе Centricon (Amicon, Нидерланды). Ферментативное расщепление проводили с использованием LysC-протеиназы (соотношение фермент — субстрат 1 : 100) в 25 мМ трис-НСl-буфере (pH 8,5, 1 мМ EDTA, 5% ацетонитрила по объему) в течение 24 ч при 37° С с повторным добавлением аликвоты фермента (соотношение фермент — субстрат 1 : 100) и инкубированием (24 ч).

Радиоактивные полосы, вырезанные из трицинового геля (см. ниже), подвергали расщеплению в геле с помощью AspN-протеиназы (50 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 8,0, содержащий 10% ацетонитрила, весовое соотношение фермент — субстрат 1 : 50, 18 ч при 37° С). Получающиеся пептиды элюировали как описано в работе [27].

*Разделение продуктов расщепления офВЭЖХ.* Получающиеся при ферментативном расщеплении пептиды разделяли на колонках С4 (рис. 2) или С18 (рис. 4) с использованием градиента концентрации ацетонитрила в присутствии 0,1% ТФА (см. подписи к рис. 2 и 4).

*Электрофоретическое разделение пептидов и блоттинг.* Радиоактивные фракции после офВЭЖХ собирали, концентрировали и наносили на 16,5% трициновый гель согласно методу [25]. Пептиды переносили из геля на поливинилидендифторидную мембрану с помощью полусухого блоттинга [26].

*Секвенирование радиоактивно меченого токсина осуществляли на секвенаторе*

Кнауер 810, имеющем ВЭЖХ-систему для разделения РТН-производных аминокислот. На каждом цикле деградации по Эдману отбиралась аликвота (1/3 от общего количества) для определения радиоактивности.

В блотах, содержащих продукты расщепления кросс-сшитых комплексов, аминокислотные последовательности определяли на секвенаторе ABI 473. Для анализа данных использовалась программа Model 610A. Секвенирование фракций непосредственно после офВЭЖХ (рис. 2б) выполняли на этом же приборе.

Масс-спектрометрический анализ проводили на квадрупольном масс-спектрометре (Finnigan MAT TSQ 700). Перед анализом образцы высушивали и суспендировали в небольшом объеме MeOH — 1% водная уксусная кислота (1 : 1).

Авторы признательны акад. В. Т. Иванову за ценные замечания. Выражаем благодарность Г. Байеру и Г. Бандини (Институт биохимии, Берлин) за высококвалифицированную техническую помощь и Е. Чертовой за участие в секвенировании фотоактивируемых нейротоксинов. Настоящая работа финансировалась Немецким исследовательским обществом (SWB 312 и грант для русско-немецкой кооперации), Фондом химической индустрии и Министерством науки, высшей школы и технической политики РФ («Международные проекты»). Я. Махольд благодарит Исследовательское общество (Schering) за предоставление стипендии.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hucho F.//Eur. J. Biochem. 1986. V. 158. № 2. P. 211—226.
2. Changeux J.-P.//Trends Pharm. Sci. 1990. V. 11. № 12. P. 485—492.
3. Karlin A.//Harvey Lect. 1991. V. 85. P. 71—107.
4. Sakmann B., Methfessel C., Mishina M., Takahashi T., Takai T., Kurotaki M., Fukuda K., Numa S.//Nature. 1985. V. 318. № 6046. P. 538—543.
5. Blount P., Merlie J. P.//Neuron. 1989. V. 3. P. 349—357.
6. Sine S. M., Claudio T.//J. Biol. Chem. 1991. V. 266. № 29. P. 19369—19377.
7. Pedersen S. E., Cohen J. B.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. № 7. P. 2785—2789.
8. Tsetlin V. I., Pluzhnikov K., Karelin A., Ivanov V.//Toxins as Tools in Neurochemistry/Eds Ovchinnikov Yu., Hucho F. B.—N. Y.: Walter de Gruyter & Co. 1983. P. 159—169.
9. Chatrenet B., Tremeau O., Bontems F., Goeldner M. P., Hirth C. G., Menez A.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. № 9. P. 3378—3382.
10. Wagner K., Edson K., Heginbotham L., Post M., Haganir R. L., Czernik A. J.//J. Biol. Chem. 1991. V. 266. № 35. P. 23784—23789.
11. Giraudat J., Dennis M., Heidmann T., Chang J. Y., Changeux J.-P.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 8. P. 2719—2723.
12. Oberthur W., Muhn P., Baumann H., Lottspeich F., Wiltmann-Liebold B., Hucho F.//EMBO J. 1986. V. 5. № 8. P. 1815—1819.
13. Blanton M. P., Wang H. W.//Biochemistry. 1990. V. 29. № 5. P. 1186—1194.
14. White B. H., Cohen J. B.//J. Biol. Chem. 1992. V. 267. № 22. P. 15770—15783.
15. Middleton R. E., Cohen J. B.//Biochemistry. 1991. V. 30. № 28. P. 6987—6997.
16. Endo T., Tamiya N.//Snake Toxins./Ed. Harvey A. N. Y.: Pergamon Press, 1991. P. 165—222.
17. Kreienkamp H.-J., Utkin Yu. N., Weise C., Machold J., Tsetlin V. I., Hucho F.//Biochemistry. 1992. V. 31. № 35. P. 8239—8244.
18. Wilson P. T., Lentz T. L., Hawrot E.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 24. P. 8790—8794.
19. Lentz T. L., Wilson P. T.//Int. Rev. Neurobiol. 1988. V. 29. P. 117—160.
20. Neumann D., Barchan D., Safran A., Gershoni J. M., Fuchs S.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 9. P. 3008—3011.
21. Aronheim A., Eshel Y., Mosckovitz R., Gershoni J. M.//J. Biol. Chem. 1988. V. 263. № 20. P. 9933—9937.
22. Conti-Tronconi B. M., Diethelm B. M., Spencer S. R., Reinhardt-Maelicke S., Maelicke A.//Biochemistry. 1990. V. 29. № 26. P. 6221—6230.
23. Хухо Ф., Вайзе Х., Крейенкамп Х.-Ю., Цетлин В. И., Уткин Ю. Н., Махольд Я.//Биоорганическая химия. 1992. Т. 18. № 10—11. С. 1319—1329.
24. Menez A., Morgat J. L., Fromageot P., Rosenray A. M., Boquet P., Changeux J.-P.//FEBS Lett. 1971. V. 17. № 2. P. 333—338.
25. Schagger H., von Jagow G.//Anal. Biochem. 1987. V. 166. № 2. P. 368—379.



26. Jungblut P., Eckerskorn C., Lottspeich F.//Electrophoresis. 1990. V. 11. № 7. P. 581—588.
27. Eckerskorn C., Lottspeich F.//Chromatographia. 1989. V. 28. P. 92—94.
28. Плужников К. А., Карелин А. А., Уткин Ю. Н., Цетлин В. И., Иванов В. Т.//Биоорган. химия. 1982. Т. 8. № 7. С. 905—913.
29. Boyd N. D., Macdonald S. G., Kage R., Lubner-Narod J., Leeman S. E.//Ann. N. Y. Acad. Sci. 1991. V. 632. P. 79—93.
30. Bullough D. A., Ceccarelli E. A., Verburg J. C., Allison W. S.//J. Biol. Chem. 1989. V. 264. № 16. P. 9155—9163.
31. Shuster D. I., Probst W. C., Ehrlich G. K., Singh G.//Photochem. and Photobiol. 1989. V. 49. № 6. P. 785—804.
32. James P., Maeda M., Fischer R., Verma A. K., Krebs J., Penniston J. T., Carafoli E.//J. Biol. Chem. 1988. V. 263. № 6. P. 2905—2910.
33. Yamazumi K., Doolittle R. F.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. P. 2893—2896.
34. Tejedor F. J., Catterall W. A.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. № 22. P. 8742—8746.
35. Hatanaka Y., Nakayama H., Kanaoka Y.//Chem. Pharm. Bull. 1992. V. 40. № 9. P. 2537—2539.
36. Breslow R.//Acc. Chem. Res. 1980. V. 13. № 6. P. 170—177.
37. Kauer J. C., Erickson-Viitanen S., Wolfe H. R., Jr., De Grado W. F.//J. Biol. Chem. 1986. V. 261. № 23. P. 10695—10700.
38. Boyd N. D., White C. F., Cerpa R., Kaiser E. T., Leeman S. E.//Biochemistry. 1991. V. 30. № 1. P. 336—342.
39. Thiele C., Fahrenholz F.//Biochemistry. 1992. V. 31. № 10. P. 2741—2746.
40. Schiebler W., Lauffer L., Hucho F.//FEBS Lett. 1977. V. 81. № 1. P. 39—41.
41. Hartig P., Raftery M.//Biochemistry. 1979. V. 18. № 7. P. 1146—1150.
42. Цетлин В. И., Плужников К. А., Карелин А. А., Карлсон Е., Иванов В. Т.//Биоорган. химия. 1984. Т. 10. № 2. С. 176—187.
43. Wessel D., Flugge U. I.//Anal. Biochem. 1984. V. 138. № 1. P. 141—143.

Поступила в редакцию 19.VII.1993

После доработки 28.XII.1993

Yu. N. Utkin, C. Weise\*, E. Tritscher\*, J. Machold,  
P. Franke\*, V. I. Tsetlin, F. Hucho\*

STRUCTURE DETERMINATION OF PEPTIDE FRAGMENTS FROM  
THE CROSS-LINKED COMPLEX OF Lys26—*p*-AZIDOBENZOYL  
NEUROTOXIN II FROM *Naja naja oxiana* WITH THE  
NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR FROM  
*Torpedo californica*

M. M. Skemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,  
Russian Academy of Sciences, Moscow;

\*Freie Universität Berlin, Institut für Biochemie, Berlin

Ключевые слова: neurotoxin, acetylcholine receptor, photoinduced cross-links.

After irradiating the acetylcholine receptor complex with the title neurotoxin derivative, the labeled  $\delta$ -subunit was separated by preparative SDS-PAGE, reduced-carboxymethylated and cleaved with LysC endoproteinase. One of the radioactive peptides isolated by HPLC was further purified by electrophoresis in a tricin gel. Edman degradation of the radioactive fractions yielded the sequence of the  $\delta$ -subunit fragment starting from Phe<sup>148</sup>. The AspN-cleavage of the radioactive peptide from the LysC digest gave on HPLC a radioactive peak which eluted similarly to peptide 33—44 generated by LysC/AspN-cleavage of <sup>125</sup>I-neurotoxin II. In model experiments, irradiation of the photoactivable derivative was found to produce a heterogeneous mixture of reaction products. Unusually low initial and repetitive yields were observed for neurotoxin II and its fragments containing the photolabeled and radiolabeled residues. These results might explain why the neurotoxin sequence was not detected on Edman degradation of the cross-linked products available at a low picomole level.