



УДК 577.353

**ФОТОАФФИННАЯ МОДИФИКАЦИЯ АЗИДОЦИТИЗИНОМ  
НИКОТИНОВОГО АЦЕТИЛХОЛИНОВОГО РЕЦЕПТОРА  
ИЗ ЗРИТЕЛЬНЫХ ГАНГЛИЕВ КАЛЬМАРА***Демущкин В. П., Котелевцев Ю. В.**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,  
кафедра биорганической химии биологического факультета*

На основе алкалоида цитизина, обладающего высоким сродством ( $K_{\text{дис}}=1,2 \cdot 10^{-7}$  М) к никотиновому ацетилхолиновому рецептору из зрительных ганглиев кальмара, синтезированы фотореактивные производные  $N_{(12)}$ -метилазидоцитизин и  $N_{(12)}$ -*n*-азидофенацилцитизин, полностью сохраняющие специфичность по отношению к рецептору. Освещение мембраносвязанного рецептора в присутствии этих соединений ( $\leq 1$  мкМ) приводит к его необратимой инактивации. При действии  $N_{(12)}$ - $[^3\text{H}]$ -метилазидоцитизина на свету специфически модифицируется лишь компонент рецептора с молекулярной массой 400 000 по данным хроматографии в растворе 2% холата натрия, 45 000 по данным гель-фильтрации в  $\beta$ -хлорэтаноле или 40 000 по данным электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Никотин, цитизин и тубокурарин в концентрации  $10^{-4}$  М защищают белковые компоненты рецептора от модификации.

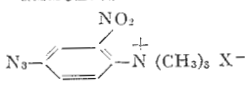
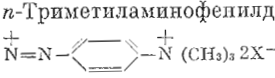
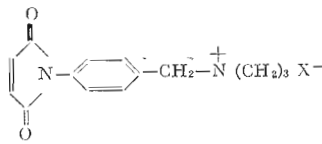
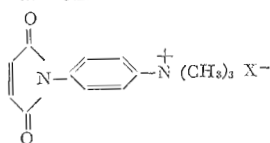
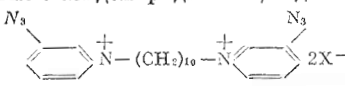
К настоящему времени описана аффинная модификация nAХР из электрических органов рыб и нейромышечных синапсов позвоночных некоторыми низкомолекулярными лигандами [1–7] и производными  $\alpha$ -бунгаротоксина [8]. Однако подавляющее большинство ацетилхолиновых рецепторов в вегетативной и центральной нервной системе млекопитающих, а также рецепторы в мозге моллюсков и насекомых не взаимодействуют с белковыми  $\alpha$ -нейротоксинами из яда кобр [9–14]. Низкомолекулярные лиганды обладают невысокой специфичностью (таблица). Таким образом, отсутствие эффективного необратимого ингибитора делает nAХР из нервной системы практически недоступными для структурно-функциональных исследований.

В данной работе на примере nAХР из зрительных ганглиев кальмара сделана попытка провести его ковалентную модификацию фотореактивными производными алкалоида цитизина. Этот алкалоид действует на холинергические ганглии никотинового типа [15]. Ранее методом равновесного радиолигандного анализа нами был охарактеризован мембраносвязанный nAХР в препаратах из зрительных ганглиев кальмара и по ингибированию связывания [ $^{14}\text{C}$ ]диметил-*d*-тубокурарина с рецептором показано, что цитизин обладает высоким сродством к nAХР ( $C_{50}$   $10^{-7}$  М) [16]. Чтобы придать связыванию необратимый характер, аффинный лиганд должен содержать реакционноспособную группировку. В качестве таковой мы выбрали арилазидную группу, которая инертна в темноте, а на свету превращается в весьма реакционноспособный нитрен [17].

Светочувствительные лиганды для аффинной модификации рецептора и ряд других производных цитизина синтезировали по приведенной схеме. В качестве модельных соединений для последующего получения радиоактивных производных синтезированы метил- и диметилцитизин (I) и (II). Азидопроизводные цитизина получали либо алкилированием цитизина *n*-азидофенацилбромидом, либо введением азидной группы в  $\alpha$ -пиридиноное кольцо цитизина. Алкилирование цитизина и метилцитизина *n*-азидофенацилбромидом в нитрометане дает кристаллические продукты (III) и (IV). Последний получен также из соединения (III) обработкой

Принятые сокращения: nAХР – никотиновый ацетилхолиновый рецептор.

Соединения, используемые для аффинной модификации nAХР

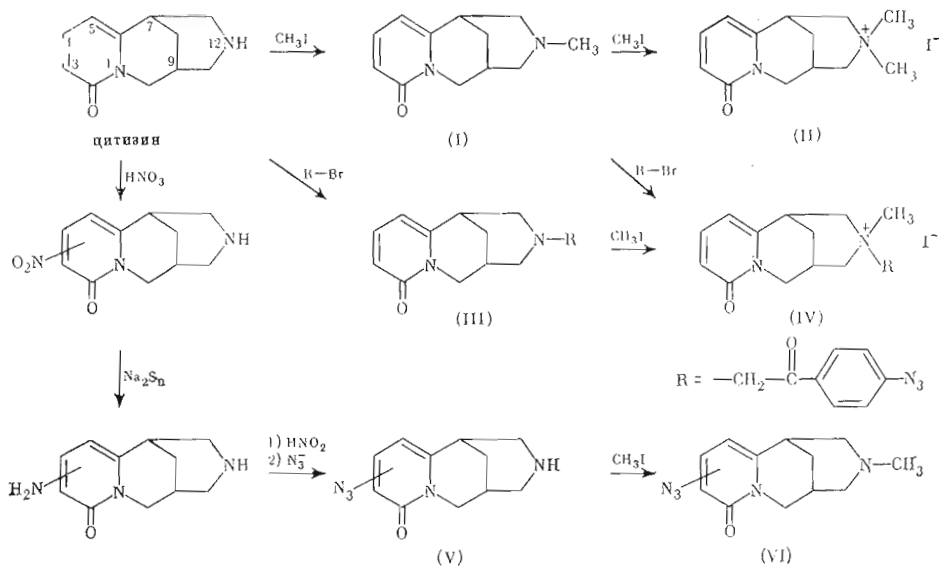
Соединение	Локализация модифицируемых nAХР	$K_{дис. M}$	Источник
$\alpha$ -Бромацетилхолин $BrCH_2COOCH_2CH_2\overset{+}{N}(CH_3)_3 X^-$	Нейромышечные синапсы	$0,16 \cdot 10^{-7}$	[1]
4-Азидо-2-нитрофенилтриметиламмоний 	Повсеместная	$2 \cdot 10^{-4}$	[2]
n-Триметиламинофенилдиазоний 	»	— *	[3, 4]
4-N-Малеимидобезилтриметиламмоний 	Нейромышечные синапсы	$8 \cdot 10^{-5}$	[5]
4-N-Малеимидофенилтриметиламмоний 	То же	—	[6]
Бис-3-азидопиридилий-1,10-декан 	»	—	[7]
Арилизидные производные $\alpha$ -буцгаротоксина	»	$10^{-11}$	[8]

\* Не определялась.

подистым метилом. Введение азидной группы в  $\alpha$ -пиридоновое кольцо осуществляли в несколько стадий. После нитрования цитизина нитрогруппу восстанавливали до аминогруппы, а затем действием азида натрия на соответствующую соль диазония получали азидоцитизин (V), который превращали в N<sub>12</sub>-метилазидоцитизин (VI) действием подистого метила.

Полученные вещества очищены хроматографией в тонком слое силикагеля и ионообменной хроматографией на бюрексе-70 (рис. 1). Наличие соответствующих функциональных групп подтверждалось качественными реакциями и данными ИК- и ПМР-спектров. Соединения (I), (II) и (VI) получали также в виде <sup>3</sup>H-производных, применяя подистый [<sup>3</sup>H]метил. Синтезированные фотоаффинные лиганды предполагалось использовать для модификации мембраносвязанных nAХР зрительных ганглиев кальмаров, не подвергая их предварительной солибилизации, чтобы сохранить окружение рецепторов близким к нативному. Кроме того, постеннаптические рецепторы в солибилизированных и очищенных препаратах иногда имеют меньшее на один-два порядка сродство к лигандам [18] и нет строгих доказательств того, что центры связывания холинергических лигандов идентичны у мембраносвязанных и солибилизированных рецепторов.

Синтез производных цитизина



Полученные лиганды могли быть пригодны для аффинной модификации только в том случае, если они полностью вытесняют холинергические лиганды из комплекса с нАХР и если концентрация центров связывания для них совпадает с концентрацией нАХР в пробе, определенной по связыванию других холинергических лигандов, например  $^{14}\text{C}$  диметил-*d*-тубокурарина. Поэтому мы исследовали способность фотоаффинных лигандов вытеснять тубокурарин и отдельно определяли  $K_{\text{дис}}$  лиганд-рецепторных комплексов и концентрацию центров связывания радиоактивных лигандов.

При исследовании соединений (I)–(VI) на способность подавлять рецепторное связывание  $^{14}\text{C}$  диметил-*d*-тубокурарина мембранными препаратами активными оказались соединения (I), (III), (V), (VI), между тем как соединения (II) и (IV) вплоть до концентрации  $10^{-4}$  М были неактивны (рис. 2).

$^3\text{H}$  метилцитизин и  $^3\text{H}$  метилазидоцитизин специфически связываются мембранными препаратами нАХР (рис. 3). Величина  $K_{\text{дис}}$  лиганд-рецепторного комплекса  $^3\text{H}$  метилцитизина равна 0,12 мкМ, а концентрация мест связывания — 280 пмоль/г ткани, что совпадает с концентрацией мест связывания  $^{14}\text{C}$  тубокурарина. Величина  $K_{\text{дис}}$   $^3\text{H}$  метилазидоцитизина несколько выше ( $1 \pm 0,5$  мкМ).

Образование необратимого комплекса аффинных лигандов с нАХР при освещении доказывалось двумя независимыми способами: по необра-

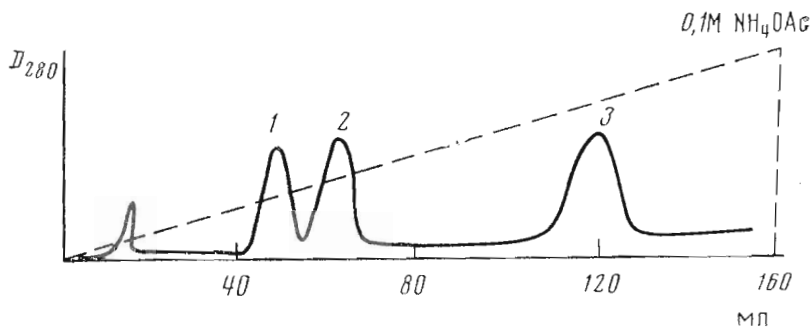


Рис. 1. Ионообменная хроматография искусственной смеси цитизина (1), азидоцитизина (2) и аминцитизина (3) на смоле биорекс-70 (колонка  $1 \times 10$  см) с использованием линейного градиента аммоний-ацетатного буфера

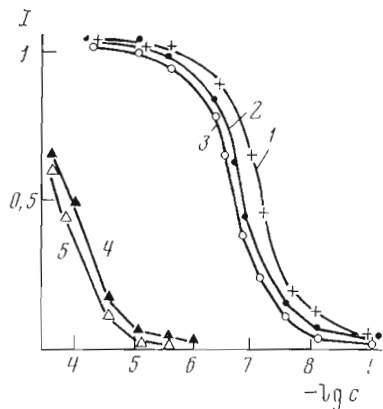


Рис. 2

Рис. 2. Ингибирование связывания  $[^{14}\text{C}]$ диметил-*d*-тубокурарина с nAChP-производными цитизина. *I* — относительное ингибирование, выраженное в долях от полного ингибирования никотином. 1 — цитизин и метилцитизин, 2 — *n*-азидофенацилцитизин, 3 — азидоцитизин и метилазидоцитизин, 4 — диметилцитизин, 5 — *N*-метил, *N*-(*n*-азидофенацил)цитизин

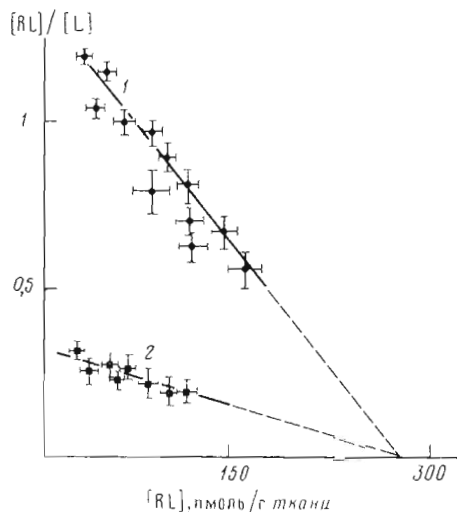


Рис. 3

Рис. 3. График Скетчарда для связывания с nAChP  $[^3\text{H}]$ метилцитизина (1) и  $[^3\text{H}]$ метилазидоцитизина (2).  $[L]$  — концентрация свободного лиганда,  $[RL]$  — концентрации связанного лиганда (по оси абсцисс  $[RL]$  пересчитана в пмоль/г ткани)

тимой инактивации рецепторов при модификации перадиоактивными лигандами и по специфическому включению радиоактивной метки в мембранные препараты при модификации  $[^3\text{H}]$ метилазидоцитизином. При модификации nAChP нерадиоактивным метилазидоцитизином наступала необратимая инактивация рецепторов, которая измерялась по величине связывания  $[^3\text{H}]$ метилцитизина мембранными препаратами после фотоиндуцированной модификации и многократной отмывки несвязавшихся лигандов (рис. 4). В отсутствие освещения рецепторное связывание полностью восстанавливалось. Освещение само по себе не влияло на nAChP. Никотин в концентрации  $10^{-4}$  М защищал рецепторы от инактивации. Таким образом, необратимая инактивация рецепторов обусловлена ковалентным присоединением лиганда к центру связывания nAChP.

При освещении мембранных препаратов в присутствии различных концентраций  $[^3\text{H}]$ метилазидоцитизина происходит специфическое, подавляемое никотином включение радиоактивной метки в белковые компоненты мембранных препаратов (рис. 4, пунктир). Как видно, кривые зависимости величины аффинной модификации от концентрации модифицирующего лиганда, полученные двумя независимыми методами, совпадают. В дальнейшем фотоаффинную модификацию nAChP проводили при концентрации соединения (VI) 0,25 мкМ. Связывание  $[^3\text{H}]$ метилазидоцитизина в темноте происходит достаточно специфично (рис. 5). Никотин и цитизин в концентрации  $10^{-4}$  М ингибируют связывание соединения (VI) с nAChP, причем в темноте они полностью вытесняют его из комплекса с рецептором. При освещении мембранных препаратов в присутствии соединения (VI) специфические центры связывания модифицируются на 80–90%. Холинергические лиганды, добавленные после освещения, не способны вытеснить радиоактивную метку, связавшуюся с мембранами, что доказывает необратимость модификации. В присутствии  $10^{-4}$  М никотина специфическая модификация полностью подавляется, а неспецифическая составляет 60–70% от общей.

Таким образом, данные об ингибировании связывания тубокурарина и результаты прямого измерения связывания с рецептором свидетельствуют, что метилазидоцитизин связывается с никотиновым ацетилхолиновым рецептором.

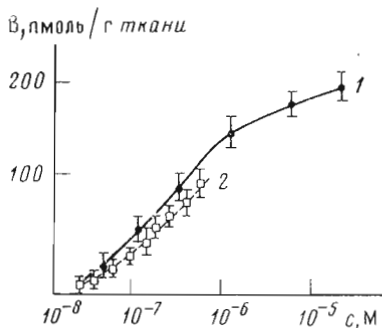


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость фотоаффинной модификации nAChR метилазидоцитизинном (1) (измерена по необратимой инактивации связывающего  $[^3\text{H}]$ метилцитизина) и  $[^3\text{H}]$ метилазидоцитизинном (2) (измерена по специфическому необратимому связыванию метки с мембранами) от концентрации лиганда (с). В — концентрация модифицированных рецепторов

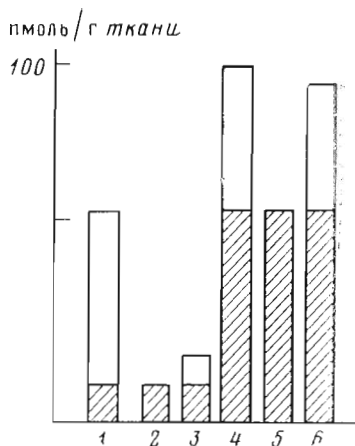


Рис. 5

Рис. 5. Специфическое и неспецифическое (зачерчено) связывание  $[^3\text{H}]$ метилазидоцитизина: 1 — общее темновое связывание, 2 — неспецифическое темновое связывание, 3 — остаточное темновое связывание после добавления цитизина, 4 — общее фотоиндуцированное связывание, 5 — неспецифическое фотоиндуцированное связывание, 6 — остаточное фотоиндуцированное связывание после добавления цитизина

Чтобы установить специфичность аффинной модификации и оценить молекулярную массу модифицированных компонентов рецептора, использовали гель-фильтрацию и электрофорез солиubilизированных компонентов мембран. В одной серии опытов мембраны, модифицированные  $[^3\text{H}]$ метилазидоцитизинном, солиubilизировали в растворе 2% хлората натрия и хроматографировали на сефарозе CL-6B (рис. 6). Было обнаружено, что специфической модификации подвергается компонент с молекулярной массой 400 000, причем половина этой массы приходится на фосфолипиды. Никотин в концентрации  $10^{-4}$  M полностью защищает этот компонент от модификации.

В другой серии экспериментов солиubilизацию мембран проводили  $\beta$ -хлорэтанолом, растворяющим большинство мембранных белков и разрушающим белок-белковые и белок-липидные взаимодействия [19–20], после чего хроматографировали на сефакриле S-200 в системе  $\beta$ -хлорэтанол — водный раствор 2 M LiCl (9:1), pH 3. LiCl добавляли для подавления адсорбции, имеющей место на этом геле при кислотных значениях pH [21]. Радиоактивность распределялась между двумя фракциями — высокомолекулярной и низкомолекулярной (рис. 7). Первая из них отвечала компоненту с  $M$  45 000 и отсутствовала при модификации в присутствии никотина. Низкомолекулярная фракция присутствует как при модификации с никотином, так и без него и по подвижности соответствует фосфолипидам.

Наконец, при электрофорезе белков модифицированных мембран в присутствии додецилсульфата натрия (рис. 8) также обнаруживается радиоактивная полоса, отвечающая компоненту с  $M$   $(40 \pm 3) \cdot 1000$ , который защищается от модификации никотином. Анализ фракций, содержащих компоненты рецепторного комплекса, полученных гель-фильтрацией на сефарозе CL-6B и сефакриле S-200, показал, что их радиоактивность обусловлена присутствием белка с  $M$   $(40 \pm 3) \cdot 1000$ .

Таким образом, минимальная белковая субъединица nAChR из зрительных ганглиев кальмара, которая является мишенью фотоаффинного лиганда, имеет молекулярную массу около 40 000. Она входит в состав протеолипидного комплекса с  $M$  400 000, из которого освобождается под действием додецилсульфата натрия или  $\beta$ -хлорэтанола.

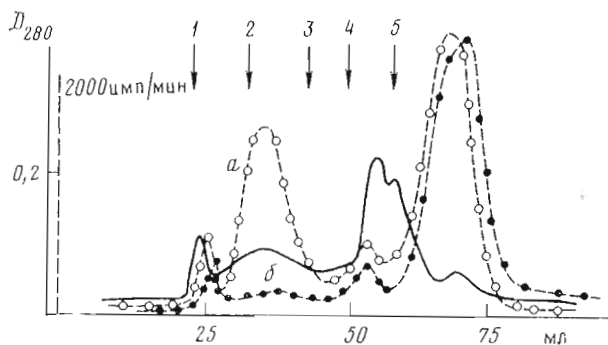


Рис. 6. Гель-фильтрация на сефарозе CL-6В (колонка 1,6×37 см) компонентов мембран, модифицированных в отсутствие (а) и в присутствии (б) никотина. Сплошная линия — профиль поглощения, штриховые — профиль радиоактивности. Стрелками обозначены положения белков-маркеров (М): 1 — тиреоглобулин (669 000), 2 — ферритин (440 000), 3 — каталаза (232 000), 4 — лактатдегидрогеназа (140 000), 5 — альбумин (67 000)

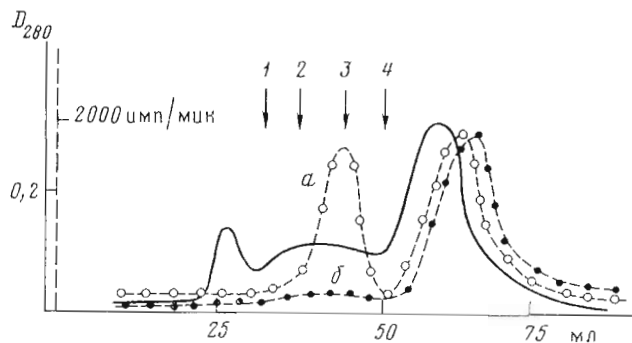


Рис. 7. Гель-фильтрация на сефакриле L-200 (колонка 1,6×35 см) компонентов мембран, модифицированных в отсутствие (а) и в присутствии (б) никотина и солибилизованных в β-хлорэтанол. Сплошная линия — поглощение, штриховые — радиоактивность. Белки-маркеры (М): 1 — альдолаза (147 000), 2 — бычий сывороточный альбумин (67 000), 4 — яичный альбумин (45 000), 4 — химотрипсиноген (25 000)

Следует отметить, что минимальная субъединица, образующая центр связывания медиатора в nAХР электрических органов рыб, имеет молекулярную массу  $(42 \pm 1) \cdot 1000$ , а в nAХР нейромюшечных синапсов млекопитающих —  $(40 \pm 2) \cdot 1000$  [22]. Определенная нами молекулярная масса субъединицы nAХР из зрительных ганглиев кальмара, связывающей холинергические лиганды, примерно такая же. Однако фармакологические характеристики рецепторов моллюсков и позвоночных сильно отличаются друг от друга [16]. Эти различия, в частности по чувствительности к α-токсинам кобр, должны определяться структурными факторами. Аффинная модификация nAХР из зрительных ганглиев кальмара открывает возможность для сравнительного анализа структур различных ацетилхолиновых рецепторов никотинового типа.

### Экспериментальная часть

В работе использованы [ $^{14}\text{C}$ ]диметил-*d*-тубокурарин (90 Ки/моль, Amersham, Великобритания), иодистый [ $^3\text{H}$ ]метил (600–800 Ки/моль, Институт изотопов АН ВНР), иодистый [ $^3\text{H}$ ]метил (5 Ки/ммоль, Amersham, Великобритания), *n*-азидофенацилбромид (Pierce, США), никотин, белковые стандарты для гель-хроматографии (Serva, ФРГ); биорекс-70 (Bio-Rad, США), сефароза CL-6В, сефакрил S-200, набор белковых стандартов для электрофореза (Pharmacia, Швеция); цитизин был предоставлен Институтом биоорганической химии УзССР. Остальные реактивы отечественного производства имели квалификацию х. ч. Все растворители

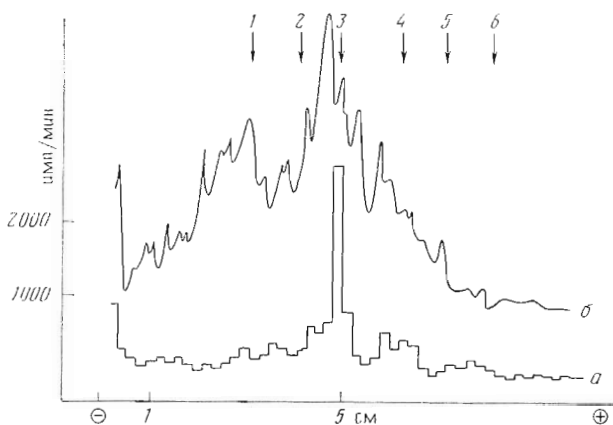


Рис. 8. Электрофорез в ПААГ [24] белков после модификации мембран [ $^3\text{H}$ ]метилазидоцитизином: *a* — радиоактивность, *b* — поглощение после окрашивания кумасси R-250. Белки-маркеры (*M*): 1 — фосфоорилаза (94 000), 2 — альбумин (67 000), 3 — овалбумин (43 000), 4 — карбоангидраза (30 000), 5 — ингибитор трипсина (20 100), 6 — лактальбумин (14 400)

очищали перегонкой. Для ТСХ использовали пластинки с силикагелем (Eastman, Kodak, США). Измерения радиоактивности проводили в диоксановом сцинтилляторе или в сцинтилляторе «Unisolve» (Koch-Light, США). Эффективность счета определяли методом отношения каналов.

**Синтез фотиаффинных аналогов цитизина.** Цитизин (2 г) постепенно, при охлаждении и перемешивании растворяли в смеси 2 мл конц.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  и 2,4 мл конц.  $\text{HNO}_3$  и оставляли на 48 ч при  $20^\circ\text{C}$ , после чего реакционную массу разбавляли водой и нейтрализовали  $\text{KOH}$ . При этом выпадали желтые нерастворимые в воде и метаноле кристаллы нитронитрозоцитизина. После удаления солей с помощью этанола в растворе, по данным ТСХ на силикагеле (хлороформ — метанол, 9 : 1), оставались нитроцитизин и нитронитрозоцитизин ( $R_f$  0,6 и 0,85). Оба соединения имеют желтую окраску, однако нитрозопроизводное в отличие от нитроцитизина не дает цветной реакции с реактивом Драгендорфа. По данным ПМР, нитронитрозопроизводное является смесью равных количеств 3- и 5-нитро- $\text{N}_{(1,2)}$ -нитрозоцитизинов (в дальнейшем производные цитизина именуется без указания цифровых индексов). 10-минутным кипячением в конц.  $\text{HCl}$ -нитронитрозоцитизин количественно превращается в нитроцитизин, который далее восстанавливали до аминцитизина полисульфидом натрия. Для этого 1,3 г  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  и 0,8 г серы растворяли в 25 мл кипящей воды. Полученный раствор приливали к 500 мг нитроцитизина и кипятили с обратным холодильником в течение 1 ч, а затем нейтрализовали, обессоливали этанолом и упаривали. Продукт реакции идентифицировали ТСХ на силикагеле (хлороформ — метанол, 9 : 1); проявление реактивом Драгендорфа, нингидрином или раствором глюкозы в серной кислоте;  $R_f$  0,3. К раствору полученного вещества в 5 мл воды, охлажденному смесью снега с солью, приливали 1 мл конц.  $\text{HCl}$ , а затем при перемешивании по каплям — раствор 120 мг  $\text{NaN}_3$  в 2 мл воды. Избыток азотистой кислоты в реакционной среде разлагали, добавляя 100 мг мочевины и выдерживая несколько минут до прекращения выделения газа. Далее к реакционной массе добавляли раствор 100 мг  $\text{NaN}_3$  в 2 мл воды, после чего ее нейтрализовали. В качестве основного продукта образовывалось вещество, дающее цветную реакцию с реактивом Драгендорфа, которое на свету приобретало серо-голубую окраску ( $R_f$  0,5; ТСХ на силикагеле; хлороформ — метанол, 15 : 1). Очистку азидоцитизина проводили хроматографией на смоле биорекс-70 (колонка  $1 \times 8$  см), используя линейный градиент аммоний-ацетатного буфера (0,01–0,1 М) общим объемом 160 мл при скорости элюции 30 мл/ч на  $1 \text{ см}^2$ . Ацетат аммония удаляли, многократно растворяя выделенное вещество в этаноле и упаривая досуха. Выход азидоцитизина составил 15% от исходного.

В ИК-спектре этого вещества присутствует полоса поглощения при  $2100 \text{ см}^{-1}$ , характерная для ароматических азидов.

Для получения метильных производных (I) и (VI) цитизин и азидоцитизин метилпроваляли избытком подистого метила в безводном нитрометане; реакционную смесь упаривали. Соответствующие [ $^3\text{H}$ ]метильные производные выделяли ТСХ на силикагеле (для (I)  $R_f$  0,8, хлороформ — метанол, 9:1; для (VI)  $R_f$  0,75; хлороформ — метанол, 33:1).

*n*-Азидофенацетильные производные (III) и (IV) получали алкилированием цитизина и метилцитизина (I) в безводном нитрометане *n*-азидофенацетилбромидом. Продукты реакции, очищенные перекристаллизацией, были индивидуальны по данным ТСХ ( $R_f$  в системе хлороформ — метанол, 9:1, для (III) 0,8, для (IV) 0,3), давали цветную реакцию с реактивом Драгендорфа и при освещении окрашивались в желтый цвет.

*Фотоаффинная модификация nАХР.* Мембранные препараты, обогащенные постсинаптическими мембранами, получали согласно [23]. Связывание холинэргических лигандов с nАХР в равновесных условиях определяли методом центрифугирования, как описано в работе [16]. Перед фотоаффинной модификацией суспензию мембран (7 мг белка/мл) в растворе Рингера [16] инкубировали 30 мин в присутствии различных концентраций фотоаффинных лигандов. В контрольные пробы добавляли никотин до концентрации  $10^{-4}$  М. Освещение суспензии проводили порциями по 10 мл в блоках диаметром 4 см при перемешивании и охлаждении. Для освещения использовали ультрафиолетовый осветитель ОИ-18 с фокусирующей кварцевой линзой и светофильтром с областью пропускания выше 300 нм. После 5-минутного освещения центрифугировали на центрифуге «Beckman J-21В» в роторе JA-20 со скоростью 18 000 об/мин. В радиоактивном варианте определяли связывание соединения (VI) с мембранами по разности в радиоактивности супернатанта в присутствии и в отсутствие никотина. После промывания осадка на фильтре смесью хлороформ — метанол, 1:1, и ацетоном определяли количество радиоактивной метки, необратимо связавшейся с белковыми компонентами мембран. Для определения остаточного рецепторного связывания после модификации перадиоактивным соединением (VI) осадок мембран трижды промывали раствором Рингера (по 50 мл) с последующим центрифугированием.

*Идентификация модифицированных компонентов nАХР.* 1) 1,75 г осадка мембран солибилизировали в 10 мл 2% холата натрия, содержащего 25 мМ трис-НСI, рН 7,5 (раствор А). После 30 мин центрифугирования при 50 000g 1 мл супернатанта наносили на колодку с сефарозой СL-6В (1,6×37 см), уравновешенную раствором А, скорость элюции при гель-фильтрации 7,5 мл/ч.

2) 1,75 г осадка мембран солибилизировали в 10 мл смеси β-хлорэтанол — водный 2 М LiCl, 9:1. Центрифугировали 10 мин при 5000g и 1 мл супернатанта наносили на колонку с сефакрилом S-200 (1,6×35 см), уравновешенную той же смесью. Скорость элюции при гель-фильтрации 10 мл/ч. Поглощение при 280 нм измеряли в проточной кювете «Uvicord» (LKB, Швеция), радиоактивность во фракциях — на счетчике «Mark III» (Nuclear Chicago, США).

3) Электрофорез в градиенте полиакриламидного геля (5—25%) в присутствии додецилсульфата натрия проводили как в работе [24], используя прибор GE-4 (Pharmacia, Швеция) и пластинки длиной 80 мм. Метиленисакриламид при приготовлении пластинок геля заменяли эквивалентным количеством диаллилдиамида винной кислоты. После проведения электрофореза и окрашивания пластин гель разрезали на полосы шириной 2 мм, солибилизировали в 1,5 мл 2% HIO<sub>4</sub> и определяли радиоактивность в сцинтилляторе «Unisolve».

Авторы выражают глубокую благодарность акад. Ю. А. Овчинникову за обсуждение результатов и зав. лабораторией биохимии ТИПРО Л. М. Эпштейну за предоставление ганглиев кальмара.



1. Moore H.-P. II., Raftery M. A. *Biochemistry*, 1979, v. 18, № 10, p. 1862-1867.
2. Kiefer H., Lindström J., Lennox E. S., Singer S. J. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1973, v. 70, № 9, p. 2567-2571.
3. Singer S. J. In: *Molecular properties of drug receptors* / Eds Porter R., O'Connor M.-L. London: J. A. Churchill, 1970, p. 229-242.
4. Weiland J., Frisman D., Taylor P. *Mol. Pharmacol.*, 1979, v. 15, p. 213-226.
5. Karlin A., McNamee M. G., Cowburn D. A. *Anal. Biochem.*, 1976, v. 76, № 2, p. 442-451.
6. Karlin A., Cowburn D. A., Reiter M. J. In: *Drug receptors* / Ed. Rang H. P. London: Macmillan, 1973, p. 193-208.
7. Witzemann V., Raftery M. A. *Biochemistry*, 1977, v. 16, № 26, p. 5862-5868.
8. Witzemann V., Muchmore D., Raftery M. A. *Biochemistry*, 1979, v. 18, № 24, p. 5511-5518.
9. Chiappinelly V. A., Zigmond P. E. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1978, v. 75, № 6, p. 2999-3003.
10. Fumagally L., De Renzis G., Miani N. *J. Neurochem.*, 1976, v. 27, № 1, p. 47-52.
11. Asher P., Kchoe J. S. In: *Handbook of psychopharmacology* / Eds Iversen L. L., Iversen S. D., Snyder S. II. N. Y.: Plenum Press, 1975, v. 4, p. 265-310.
12. Gerschenfeld H. M. *Physiol. Revs.* 1973, v. 53, № 1, p. 1-119.
13. Stullcup W. B. *J. Physiol.*, 1979, v. 286, p. 525-540.
14. Dudai Y. *Trends in Biochem. Sci.*, 1979, v. 4, № 2, p. 40-44.
15. Маишовский М. Д. *Лекарственные средства*. М.: Медицина, 1978, т. 1, с. 123.
16. Демушкин В. П., Котелевцев Ю. В. *Биохимия*, 1980, т. 45, № 10, с. 1733-1738.
17. Bayley H., Knowles R. In: *Methods in enzymology* / Eds Jacoby W. B., Wilchec M. N. Y.: Acad. Press, 1977, v. 46, p. 69-115.
18. Heidmann T., Changeux J.-P. *Annual Rev. Biochem.*, 1978, v. 47, p. 315-357.
19. Wallach D. F. *Evolving strategies and tactics in membrane research*. N. Y.: Springer Verlag, 1978, p. 82.
20. Kramer R., Schlatterer C., Zahler M. P. *Biochim. et biophys. acta*, 1972, v. 282, № 1, p. 146-156.
21. Belew M., Porath J., Fohlam J. *J. Chromatogr.*, 1978, v. 147, № 1, p. 205-212.
22. Deutsch J. W., Raftery M. A. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1979, v. 197, № 2, p. 503-515.
23. Dowdall M. J., Whittaker V. P. *J. Neurochem.*, 1973, v. 20, № 4, p. 931-935.
24. Mahalik S. P. *Analyt. Biochem.*, 1976, v. 76, № 3, p. 615-633.

Поступила в редакцию  
2.XI.1981

## AZIDOCYTISINE PHOTOAFFINITY LABELING OF THE NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR FROM THE SQUID OPTIC GANGLIA

DEMUSHKIN V. P., KOTELEVTSSEV Yu. V.

*Biological Department, M. V. Lomonosov State University, Moscow*

On the basis of alkaloid cytisine, having a high affinity ( $K_d=1,2 \cdot 10^{-7}$  M) for nicotinic acetylcholine receptor from the squid optic ganglia, the photoreactive derivatives -  $N_{(12)}$ -methylazidocytisine (I) and  $N_{(12)}$ - $\beta$ -azidophenacylcytisine (II) - have been synthesized. Both derivatives preserve specificity towards the receptor. Illumination in the presence of azide derivatives (at their concentration 1  $\mu$ M or higher) results in irreversible inactivation of the membrane-bound receptor. Radioactive (I) was specifically bound to the receptor complex with the molecular weight of 400 000 as determined by gel filtration of Sepharose CL-6B in Na-cholate. The subunit of molecular weight 40 000 was labeled with (1), as estimated by PAG electrophoresis in SDS, and of 45 000 according to gel filtration in  $\beta$ -chloroethanol. Nicotin, cytisine and tubocurarine protected the subunits from modification.