



УДК 547.993.04:591.185.3

ПОЛУЧЕНИЕ ФОТОАКТИВИРУЕМЫХ МОНОПРОИЗВОДНЫХ НЕЙРОТОКСИНА II НАЈА НАЈА ОХТАНА И ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С АЦЕТИЛХОЛИНОВЫМ РЕЦЕПТОРОМ

Плужников К. А., Карелин А. А., Уткин Ю. Н.,
Цетлин В. И., Иванов В. Т.

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

Получено шесть производных нейротоксина II из яда кобры *Naja naja oxiana*, содержащих по одной *n*-азидобензойной группировке в локализованном положении (α -аминогруппа Leu¹, ϵ -аминогруппа Lys¹⁵, Lys²⁵, Lys²⁶, Lys⁴⁴, Lys⁴⁶). Все соединения специфически связываются с очищенным ацетилхолиновым рецептором из электрического органа *Torpedo marmorata*, а при облучении с эффективностью 70–80% образуют с ним ковалентные комплексы, за исключением Lys⁴⁴-производного. Полученные результаты подтверждают многоточечный характер связывания нейротоксина с рецептором, установленный ранее с помощью спектральных методов.

В настоящее время для исследования пространственной структуры белков и их комплексов с низкомолекулярными лигандами или рецепторами используются различные физические методы: рентгеноструктурный анализ, ЯМР, ЭПР, флуоресцентная спектроскопия и др. Селективная химическая модификация белка значительно расширяет возможности этих методов. С другой стороны, информация о пространственной организации белков и их комплексов может быть получена и чисто химическими подходами, например с помощью бифункциональных реагентов. Одним из примеров комплексного использования физических и химических методов являются исследования взаимодействия цитохрома с и его модифицированных производных с соответствующими оксидазами и редуктазами [1].

Ранее в нашем институте с помощью исследования методами ЭПР и флуоресценции взаимодействия ацетилхолинового рецептора с рядом производных нейротоксина II из яда кобры *Naja naja oxiana* (НТ-II, рис. 1), содержащих в определенном участке молекулы по одной спиновой или флуоресцентной метке [4, 5], был охарактеризован участок связывания нейротоксинов короткого типа.

В настоящей работе вопросы топографии нейротоксин-рецепторного взаимодействия исследованы с помощью фотоиндуцированных сшивок. Для этой цели получены шесть производных нейротоксина II, содержащих

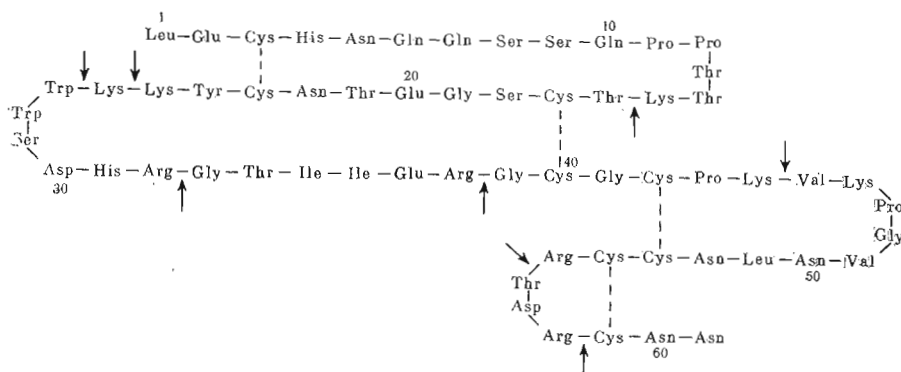


Рис. 1. Аминокислотная последовательность НТ-II [2, 3]. Стрелками указаны места гидролиза трипсином в немодифицированном токсине

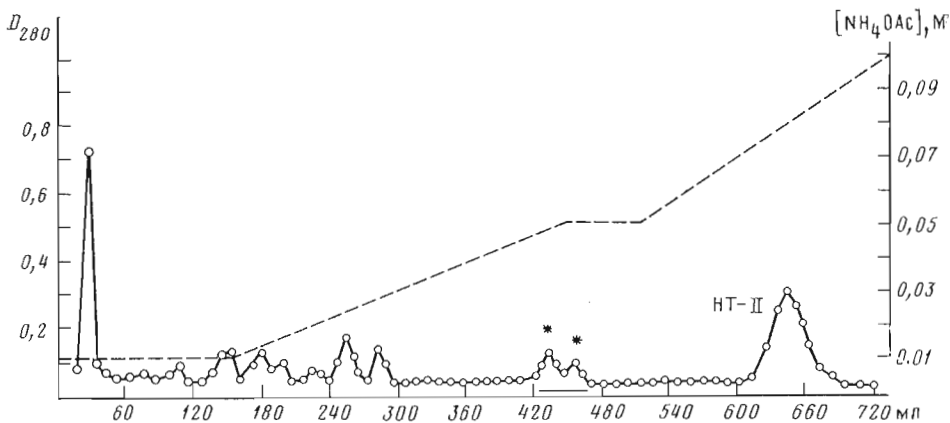


Рис. 2. Хроматография продуктов модификации HT-II 4-фтор-3-нитрофенилазидом на колонке (1×15 см) с биорексом-70, уравновешенным 1 мМ аммоний-ацетатным буфером (рН 7,5), в градиенте концентрации NH_4OAc . Скорость элюирования 48 мл/ч. Отмечены фракции, соответствующие монометенимым производным

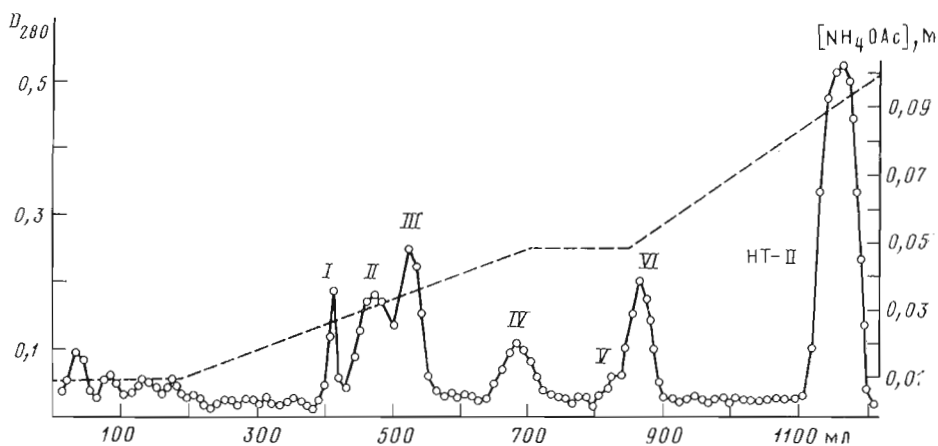


Рис. 3. Хроматография продуктов модификации HT-II N-оксисукцинимидным эфиром *n*-азидобензойной кислоты на колонке (1×13 см) с биорексом-70, уравновешенным 0,01 М аммоний-ацетатным буфером (рН 7,5), в градиенте концентрации NH_4OAc . Скорость элюирования 32 мл/ч

по одной фотоактивируемой метке, осуществлена локализация этих меток и исследовано связывание соответствующих фотоактивируемых производных HT-II с ацетилхолиновым рецептором из электрического органа ската *Torpedo marmorata*.

В литературе описано несколько фотоактивируемых производных нейротоксинов постсинаптического действия из ядов змей [6–8], но, по-видимому, только в работе [6] было выделено монопроизводное, однако локализация метки и в этом случае не проводилась.

Первоначально мы пытались получить необходимые производные HT-II в тех условиях, которые были описаны в работе [6] для α -бунгаротоксина и токсина 3 *Naja naja siamensis*, нейротоксинов длинного типа, т. е. реакцией с 4-фтор-3-нитрофенилазидом в диметилсульфоксиде. Широкое применение этого реагента обусловлено его доступностью, разработанными условиями модификации белков [9–11] и удобством идентификации введенной группировки благодаря специфическому поглощению при 480 нм. Однако получить монопроизводные HT-II не удалось, несмотря на варьирование в широких пределах количества реагента и времени реакции: во всех случаях получался набор поли- и динпроизводных.

При проведении реакции в диметилформамиде в присутствии триэтиламина и использовании 1,6-кратного избытка реагента удалось получить после обессоливания и деления на биорексе-70 (рис. 2) две фракции, соот-

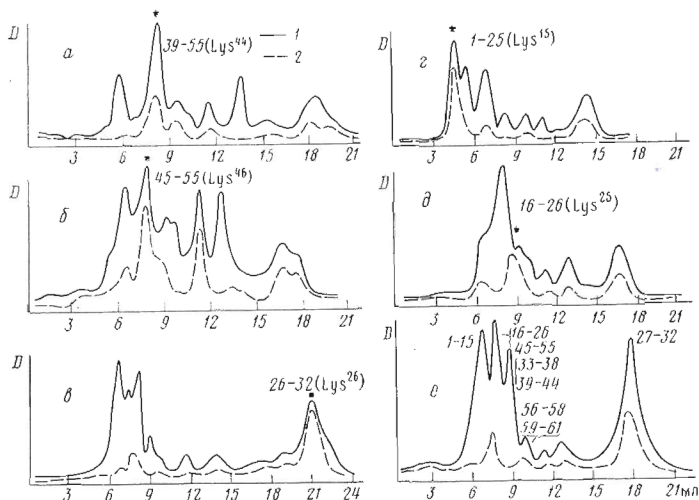


Рис. 4. Гель-фильтрация триптических гидролизатов монопептидных производных НТ-II на колонке (0,4×125 см) с сефадексом G-25sf, уравновешенным 0,1 М аммоний-ацетатным буфером (рН 4,5). Детекция при 206 (1) и 280 нм (2). а-е — гидролизаты фракций I–IV и VI (рис. 3) и нативного токсина [3] соответственно. Отмечены пептиды, содержащие модифицированный остаток, указанный в скобках

ветствующие по месту выхода (ср. [5]) монопроизводным НТ-II (отмечены на рис. 2), но суммарный их выход составил лишь ~0,7% от взятого в реакцию белка. Так как целью данной работы являлось получение полной серии фотоаффинных производных по аминок группам, то от использования этого реагента пришлось отказаться.

Ранее были найдены условия получения и разделения монопроизводных НТ-II при его модификации по аминок группам N-оксисукцинимидными эфирами иминоксильных радикалов липеридинового и пирролинового рядов [3, 12]. Мы решили воспользоваться этими условиями для модификации НТ-II N-оксисукцинимидным эфиром *n*-азидобензойной кислоты.

Модификацию НТ-II проводили в Na-ацетатном буфере в присутствии 6 н.хлоргидрата гуанидина (рН 8,0; 20 ч, 24°С) при соотношении реагент — белок 1,1 : 1. После обессоливания и последующей ионообменной хроматографии на биорексе-70 (рис. 3) было получено шесть фракций, соответствующих по месту выхода монопроизводным НТ-II, а также фракция, содержащая непрореагировавший токсин. Суммарный выход монопроизводных достигал 12% от взятого в реакцию токсина. Хроматографию и лиофилизацию фотоактивных производных проводили в темноте. Фотоактивность производных показана по изменению в УФ-области их спектра поглощения в зависимости от времени облучения аналогично работе [6].

Несмотря на большое число описанных в литературе фотоактивируемых производных белков, локализация модифицированных остатков была проведена лишь в немногих случаях, при этом она, как правило, была непрямой [1] или основывалась на данных модификации фотонеактивными реагентами [13].

В данной работе локализация меченых аминокислотных остатков была осложнена тем, что используемую метку трудно идентифицировать, так как поглощение ее хромофора $\lambda_{\text{макс}}$ 280 нм перекрывается с областью поглощения самого белка. Другая проблема состоит в том, что при рН 8,5 и выше, при которых идут восстановление и карбоксиметилирование НТ-II, необходимые для ферментативного гидролиза, происходит активация азидной группировки, что может приводить к внутримолекулярным сшивкам. В работе [14] на примере различных арилзидов была показана возможность восстановления азидной группировки до аминок группы. Модифицировав эти условия (понижение рН буферной системы до 7,5, более высокая концентрация дитиозенитрита и увеличение времени восстановления), удалось добиться восстановления азидной группировки и дисульфидных

связей и при этом полностью избежать внутримолекулярных перешивок, о чем свидетельствует анализ пептидов триптического гидролиза.

Восстановленные карбоксиметилированные производные подвергали триптическому гидролизу с последующим разделением гидролизатов хроматографией на сефадексе G-25 *sf* (рис. 4). Детектирование пептидов проводили при 206 и 280 нм. Увеличение отношения D_{280}/D_{206} по сравнению с этой величиной для соответствующих пептидов гидролизата немодифицированного токсина указывало на наличие в пептиде дополнительного хромофора с $\lambda_{\text{макс}}$ 280 нм. Структуру меченого пептида определяли с помощью аминокислотного анализа, а в ряде случаев дополнительно проводили N-концевой анализ.

При делении продуктов триптического гидролиза фракции I (рис. 4а) метка обнаруживалась в пике, отвечающем смеси двух пептидов. Определение первых четырех аминокислот в этих пептидах позволило установить их структуру и положение в белковой молекуле (рис. 1). Это пептиды 16–25 и 39–55. Наличие в гидролизате пептида 26–32 говорит об отсутствии модификации по остатку лизина в положении 25. Таким образом, производное, принадлежащее фракции I, содержит фотоактивную группировку в остатке лизина в положении 44.

При хроматографии фракции II (рис. 4б) было показано увеличение относительного поглощения при длине волны 280 нм в пике, соответствующем пептиду 45–55 (ср. рис. 4е) (структура этого пептида была доказана аминокислотным и N-концевым анализом), что и позволило сделать вывод о модификации остатка лизина в положении 46.

Деление триптического гидролизата фракции III (рис. 4в) позволило получить меченый пептид 26–32, для которого наблюдалось увеличение соотношения D_{280}/D_{206} до 0,93 (для аналогичного пептида, полученного из нативного токсина, это соотношение составляет 0,45). Так как этот пептид содержит только одну функциональную группу лизина в положении 26, можно сделать вывод о ее модификации.

Наличие пептида с последовательностью 1–25 в триптическом гидролизате фракции IV (рис. 4г) свидетельствует о модификации лизина в положении 15, так как модификация лизина в этом положении блокирует ферментативное расщепление и дает возможность образования указанного пептида.

В триптическом гидролизате фракции V были обнаружены два пептида, содержащие модифицированные аминокислотные остатки: 1–15 и 16–26. Наличие двух меченых пептидов объясняется тем, что хроматографией на биорексе-70 (рис. 3) сразу не удалось достичь полного разделения фракций V и VI. Фракция VI, после того как с помощью рехроматографии от нее была отделена примесь фракции V (на биорексе-70 в линейном градиенте 0,045–0,050 M аммоний-ацетатного буфера, pH 7,5), была подвергнута триптическому гидролизу (рис. 4д). В этом случае метка была найдена только в пептиде 16–26, соответствующее этой фракции производное имеет модифицированный остаток лизина в положении 25. В таком случае очевидно, что производное, принадлежащее фракции V, содержит метку на N-концевом остатке лейцина.

Исследование взаимодействия фотоаффинных производных нейротоксина II с ацетилхолиновым рецептором проводили на сольубилизованном в тритоне X-100 рецепторе, выделенном с помощью аффинной хроматографии на нейротоксин-сефарозе из электрического органа *Torpedo marmorata* [15].

Активность рецептора определяли по связыванию с ^3H -ацетилированным НТ-II или ^3H -ацетилированным токсином 3 (*Naja naja siamensis*). При расчетах активности молекулярную массу ацетилхолинового рецептора принимали равной 250 000 [16], а стехиометрию связывания токсина с рецептором — 2:1 моль/моль [2, 17]. Все эксперименты проводили на рецепторе с активностью 90% (1 мг рецепторного белка связывал 7,3 нмоль токсина).

Специфичность связывания фотоаффинных производных НТ-II с ацетилхолиновым рецептором доказывалась следующими экспериментами.

**Анализ ковалентного связывания фотоаффинных производных НТ-II
с ацетилхолиновым рецептором**

Номер фракций (рис. 3)	Модифицированный остаток	Ковалентное связыва- ние, %
I	Лизин-44	0*
II	» -46	77*
III	» -26	76*; 72**
IV	» -15	81*; 82**
V	Лейцин-1	82**
VI	Лизин-25	88**

* Вытеснение ³H-ацетилированным НТ-II.

** Вытеснение ³H-ацетилированным токсином 3 (*N. n. siamensis*).

После часовой инкубации в темноте рецептора с фотоаффинными производными к комплексу добавляли радиоактивный токсин в пятикратном избытке по отношению к фотомеченому токсину. Последующая гель-фильтрация показала, что вытеснение фотомеченого токсина радиоактивным из комплекса с рецептором происходит на 96%. Вместе с тем большие избытки фотоактивных производных в свою очередь полностью вытесняют радиоактивный токсин из комплекса с ацетилхолиновым рецептором. В совокупности эти контрольные эксперименты доказывают высокую специфичность взаимодействия всех полученных производных НТ-II с ацетилхолиновым рецептором.

Для фотоллиза использовали галогенную лампу мощностью 250 Вт, вырезая коротковолновую часть спектра. Из опытов с модельными соединениями известно, что при длительном действии жесткого УФ-облучения может произойти разрушение остатков триптофана, тирозина, метионина, цистеина и некоторых других [18]. Контрольные эксперименты показали, что при облучении в течение 20 мин на расстоянии 12 см от лампы ни токсин, ни рецептор не изменили свои спектральные характеристики, а активность рецептора упала лишь на 10%. Время облучения в наших опытах составило 6 мин, и за это время падения активности рецептора практически не наблюдалось. Полностью сохранялась активность рецептора и при облучении токсин-рецепторного комплекса.

Степень ковалентного связывания фотоаффинных производных с ацетилхолиновым рецептором определяли после облучения по вытеснению непрореагировавшего фотоактивируемого производного радиоактивным токсином. В каждом эксперименте параллельно определяли активность ацетилхолинового рецептора с таким же избытком радиоактивного токсина, инкубируя и облучая его в тех же условиях. Данные по ковалентному связыванию фотоаффинных производных НТ-II с ацетилхолиновым рецептором приведены в таблице.

Как видно из таблицы, все фотоактивируемые производные, за исключением модифицированного по остатку лизина в положении 44, при облучении образуют ковалентные сшивки с ацетилхолиновым рецептором. Обращает на себя внимание высокая степень ковалентного связывания. Можно было опасаться, что значительный вклад в него дает неспецифическое связывание (например, с детергентом), однако это не так. Во-первых, в контрольных опытах было показано, что ковалентное связывание возрастает не более чем на 6%, когда соотношение фотоактивируемое производное — ацетилхолиновый рецептор увеличивают от 2:1 до 30:1. Во-вторых, об отсутствии неспецифического связывания свидетельствует тот факт, что для одного из фотоактивируемых производных данной серии, образующих в темноте с рецептором нековалентные комплексы с близкой эффективностью, образования ковалентных комплексов вообще не происходит. Это соединение — фракция I — может рассматриваться в качестве «внутреннего стандарта» при оценке специфичности сшивок.

По-видимому, высокая степень ковалентного связывания объясняется большой прочностью комплексов нейротоксинов с рецептором, которая в

значительной степени сохраняется и при введении в нейротоксин по одной фотоактивируемой группировке. Другой причиной может быть то, что облучение проводили широким спектром, не вырезая коротковолновую часть, в отличие от многих работ [19, 20].

Полученные в настоящей работе результаты показывают, что фотоактивируемые метки, падающие в различных частях молекулы нейротоксина, при облучении соответствующих комплексов ковалентно связываются с ацетилхолиновым рецептором. Таким образом, с помощью химического подхода подтвержден вывод о многоточечности связывания нейротоксинов с рецептором, сделанный ранее на основании спектральных исследований взаимодействий ацетилхолинового рецептора со спин- и флуоресцентно-мечеными производными НТ-II [4, 5]. В целом можно отметить хорошую корреляцию между результатами спектрального и химического подходов. Так, было показано, что спиновые метки на всех аминоклуппах, кроме аминоклуппы лизина-44, находятся в контакте с рецептором. С другой стороны, обращает на себя внимание ббольшая чувствительность спектральных подходов. Данные ЭПР и флуоресценции указывают на то, что спиновая метка или дансильная группа в положении лизин-26 находится в области плотного контакта с рецептором, а аминоклуппы лейцина-1 и лизина-15 располагаются в области менее плотного контакта. Введенные по ним спиновые метки испытывают влияние рецептора, тогда как параметры флуоресценции дансильных групп в этих положениях не меняются при образовании комплекса с рецептором. В то же время, как видно из таблицы, фотоактивируемые группировки во всех трех сравниваемых участках нейротоксина образуют ковалентные сшивки с близкой эффективностью. Очевидно, опасность выделения не собственно интересующих рецепторов, а пространственно сближенных с ними компонентов мембран следует учитывать при использовании белковых лигандов для выделения рецепторов из неочищенных мембранных фракций.

Экспериментальная часть

Вся работа с фотоактивируемыми препаратами, до триптического гидролиза производных НТ-II, проводилась в темноте.

N-оксисукцинимидный эфир *n*-азидобензойной кислоты синтезирован как описано в работе [19]. Его индивидуальность проверяли ТСХ на силикагеле в системе бензол — этилацетат, 4:3 (*R_f* 0,93), и подтверждали данными масс-спектра (*M_e* 260).

Выделение НТ-II описано в работе [21]; ацетилхолиновый рецептор выделяли по методике [15] из электрического органа ската *Torpedo marmorata*. В работе использовали кристаллический трипсин (Worthington, Biochemical), сефадексы G-25sf и G-75 (Pharmacia) и биорекс-70 (Bio Rad Laboratories).

Модификация НТ-II 4-фтор-3-нитрофенилазидом. 62,4 мг (9,3 мкмоль) токسينа растворяли в 2,5 мл диметилформамида, добавляли 0,67 мл (55 мкмоль) триэтиламина и вносили 15 мг (90 мкмоль) 4-фтор-3-нитрофенилазида (Pierce) в 1 мл диметилформамида, перемешивали 24 ч в темноте при 24° С. Реакционную смесь, разбавленную до 7 мл буфером, обессоливали на колонке с сефадексом G-25f (2,5×50 см), уравновешенным 0,1 М аммоний-ацетатным буфером (рН 7,5). Белковую фракцию лиофилизировали и хроматографировали на биорексе-70 (рис. 2). Для контроля за ходом хроматографии отбирали аликвоты и определяли их поглощение на спектрофотометре при 280 нм.

Модификация НТ-II N-оксисукцинимидным эфиром n-азидобензойной кислоты. К раствору 69,3 мг (10,3 мкмоль) НТ-II в 7 мл 0,2 М Na-ацетатного буфера (рН 8,1), содержащего 6 н. хлоргидрат гуанидина, добавляли 2,87 мг (11 мкмоль) N-оксисукцинимидного эфира *n*-азидобензойной кислоты в 0,38 мл диоксана и перемешивали 20 ч при 24° С. Реакционную смесь обессоливали на колонке с сефадексом G-25f (3,5×60 см), уравновешенным 0,05 М уксусной кислотой, при 4° С и после лиофилизации хро-

матографировали на колонке с биорексом-70. Полученные фракции (рис. 3) лиофилизировали и хранили при -10°C .

Локализация положения модифицированного остатка. а) Восстановление и карбоксиметилирование производных НТ-II, 0,4 мг (0,06 мкмоль) производного НТ-II и 40 мг (260 мкмоль) дитиоэритрита растворяли в 1,0 мл буфера (0,2 М трис-НСI, рН 7,5; 8 М мочевины, 1 мМ EDTA) и выдерживали в атмосфере инертного газа 48 ч в темноте. Затем добавляли раствор 310 мг (1,68 ммоль) иодуксусной кислоты в 0,2 мл 1,5 н. NaOH порциями по 30–40 мкл в течение 7–10 мин, поддерживая рН 7,5 добавлением 1,5 н. NaOH. Через 30 мин смесь обессоливали на колонке с сефадексом G-25 (2,5×80 см), уравновешенным 0,05 М уксусной кислотой, и белковую фракцию лиофилизировали.

б) Гидролиз трипсином. Лиофилизат растворяли в 0,1 мл 0,1 М N-этилморфолин-ацетатного буфера, рН 7,5, содержащего 0,02 мг трипсина, и инкубировали 3 ч при 37°C . Гидролиз останавливали замораживанием с последующей лиофилизацией. Разделение гидролизатов проводили на колонке с сефадексом G-25sf (0,4×125 см), уравновешенным 0,1 М аммоний-ацетатным буфером, рН 4,5 (см. рис. 3). Детекцию осуществляли с помощью точного спектрофотометра «Uvicord-III» при длинах волн 206 и 280 нм.

N-Концевые аминокислоты определяли дансильным методом. Аминокислотный анализ кислотных гидролизатов (6 н. HCl, 110°C , 24 ч) пептидов проводили на аминокислотном анализаторе «Durrum D-500».

Связывание модифицированных нейротоксинов с ацетилхолиновым рецептором. Для определения активности ацетилхолинового рецептора к 0,4 мл (0,15 нмоль) солибилизированного белка с концентрацией 0,1 мг/мл (0,3 М Na-фосфатный буфер (рН 7,5), 0,025% тритон X-100, 0,02% азид натрия — буфер А) добавляли 2–2,5 мг бычьего сывороточного альбумина, а затем 0,05 мл (2 нмоль) радиоактивного токсина [22] (концентрация 0,268 мг/мл, уд. акт. 5300 расп./мкг) и инкубировали 1 ч при 20°C . Смесь наносили на колонку (1,5×40 см) с сефадексом G-75, уравновешенным буфером А, и отделяли комплекс токсина с рецептором (выходящий со свободным объемом) от избытка токсина. Скорость элюирования 24 мл/ч, объем фракций 2 мл. Для определения радиоактивности фракций, содержащих токсин-рецепторный комплекс, отбирали аликвоты по 0,4 мл и измерения проводили в сцинтиляторе Брэя на счетчике «Intertechnique SL-30». Активность использовавшихся в работе препаратов рецептора составляла в среднем 90%.

Для определения процента ковалентного связывания в две кварцевые кюветы вносили по 0,4 мл (0,15 нмоль) солибилизированного рецептора с концентрацией 0,1 мг/мл. В одну кювету добавляли 0,05 мл (2 нмоль) раствора радиоактивного токсина, что служило контролем активности рецептора, а в другую — 0,03 мл (0,6 нмоль) раствора фоточувствительного производного НТ-II. 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-минутными перерывами. После облучения ацетилхолиновый рецептор из контрольной кюветы отделяли от несвязавшегося токсина на колонке с сефадексом G-75, как и при определении активности рецептора, а в кювету, содержащую фоточувствительное производное, вносили 0,05 мл радиоактивного токсина, инкубировали 1 ч и на колонке с сефадексом G-75 отделяли комплекс от несвязавшегося токсина. Для определения радиоактивности отбирали аликвоты по 0,4 мл.

Для определения процента ковалентного связывания в зависимости от концентрации производного одновременно ставили три опыта: в три кюветы помещали по 0,4 мл (0,15 нмоль) раствора рецептора (0,1 мг/мл), к одной добавляли 0,05 мл (2 нмоль) радиоактивного токсина, а ко второй и третьей — по 0,03 мл фотоактивируемого производного соответственно в 1,3-кратном (0,4 нмоль) и 5-кратном (1,5 нмоль) избытке по отношению к количеству активных центров в рецепторе. Все кюветы инкубировали 1 ч в темноте, а затем облучали. После облучения содержимое первой кю-

веты хроматографировали на колонке с сефадексом G-75, а в две другие кюветы добавляли по 0,05 мл (2 нмоль) радиоактивного токсина, инкубировали 1 ч и несвязавшийся токсин отделяли в описанных выше условиях.

Контроль вытеснения ковалентно не связанных фоточувствительных производных НТ-II проводили следующим образом: к 0,4 мл (0,15 нмоль) раствора ацетилхолинового рецептора (0,1 мг/мл) добавляли 0,03 мл раствора, содержащего 9,3 мкг (1,5 нмоль) фоточувствительного производного, инкубировали 1 ч в темноте, затем вносили 0,05 мл (2 нмоль) радиоактивного токсина (1,5-кратный избыток по отношению к фоточувствительному производному), инкубировали еще 1 ч в темноте и гель-фильтрацией отделяли от несвязавшегося токсина. Параллельно определялась активность используемых препаратов рецептора.

Авторы работы выражают благодарность И. Н. Тележинской за помощь в определении N-концевых аминокислот и Е. Карлссону (Институт биохимии, г. Упсала, Швеция) за любезно предоставленный электрический орган *Torpedo marmorata*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bisson R., Azii A., Gutweniger H., Colonna R., Montecucco C., Zanotti A. J. Biol. Chem., 1978, v. 253, № 6, p. 1875-1880.
2. Grishin E. V., Sukhikh A. P., Lukyanchuk N. N., Slobodyan L. N., Lipkin V. M., Ovchinnikov Yu. A., Sorokin V. M. FEBS Lett., 1973, v. 36, № 1, p. 77-78.
3. Arnberg H., Eaker D., Fryklund L., Karlsson E. Biochim. et biophys. acta, 1974, v. 359, № 2, p. 222-232.
4. 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.
5. Ivanov V. T., Tsetlin V. I., Karlsson E., Arseniev A. S., Utkin Yu. N., Pashkov V. S., Surin A. M., Pluzhnikov K. A., Bystrov V. F. In: Natural toxins/Eds Eaker D., Wadström T. Oxford and New York: Pergamon Press, 1980, p. 523-530.
6. Hucho F. FEBS Lett., 1979, v. 103, № 1, p. 27-32.
7. Witzemann V., Muchmore D., Raftery M. A. Biochemistry, 1979, v. 18, № 24, p. 5511-5517.
8. Lehmann N. M., Hall Z. W. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, № 4, p. 1698-1703.
9. Bregman M. D., Cheng S., Levy D. Biochim. et biophys. acta, 1978, v. 539, № 4, p. 489-496.
10. Levy D. Biochim. et biophys. acta, 1973, v. 322, № 2, p. 329-336.
11. McLean I. D., Singer S. J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1970, v. 65, № 1, p. 122-128.
12. Utkin Yu. N., Pashkov V. S., Surin A. M., Tsetlin V. I., Ivanov V. T. In: Peptides 1978. Wrocław University Press, 1979, p. 397-400.
13. Гришин Е. В., Солдатов Н. М., Овчинников Ю. А., Можеева Г. Н., Наумов А. П., Зубов А. Н., Нусман Б. Х. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 5, с. 724-730.
14. Staros I. V., Bayley H., Standring D., Knowles J. R. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1978, v. 80, № 3, p. 568-573.
15. Karlsson E., Fohlman J., Groth M. Bull. de l'institut Pasteur, 1976, v. 74, № 1, p. 11-22.
16. Reynolds J. A., Karlin A. Biochemistry, 1978, v. 17, № 11, p. 2035-2038.
17. Dantle V. N., Karlin A. Biochemistry, 1978, v. 17, № 11, p. 2039-2041.
18. Yosshioka M., Lijster J., Hew G., Converse C. A., Armstrong M. Y. K., Konigsberg W. H., Richards F. F. Biochemistry, 1973, v. 12, № 23, p. 4679-4684.
19. Millon R., Olomuski M., Le Gall J.-Y., Golinska B., Ebel J.-P., Ehresmann B. Eur. J. Biochem., 1980, v. 110, № 2, p. 485-492.
20. Witzemann V., Raftery M. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1978, v. 85, № 2, p. 623-631.
21. Arseniev A. S., Balashova T. A., Utkin Yu. N., Tsetlin V. I., Bystrov V. F., Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A. Eur. J. Biochem., 1976, v. 71, № 2, p. 595-605.
22. Tsetlin V. I., Arseniev A. S., Utkin Yu. N., Gurevitch A. Z., Sengavina L. B., Bystrov V. F., Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A. Eur. J. Biochem., 1979, v. 94, № 2, p. 337-346.

Поступила в редакцию
18.I.1982

SYNTHESIS OF SINGLY LABELED PHOTOACTIVABLE DERIVATIVES
OF NEUROTOXIN II *NAJA NAJA OXIANA* AND THEIR INTERACTION
WITH THE ACETYLCHOLINE RECEPTOR

PLUZHNIKOV K. A., KARELIN A. A., UTKIN Yu. N.,
TSETLIN V. I., IVANOV V. T.

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

A series of 6 derivatives of neurotoxin II from the *Naja naja oxiana* cobra venom have been prepared, each comprising one *p*-azidobenzoyl group at the identified position (Leu¹ α -amino group, Lys¹⁵, Lys²⁵, Lys²⁶, Lys⁴⁴ or Lys⁴⁶ ϵ -amino groups). All the compounds bind specifically to the purified acetylcholine receptor from the *Torpedo marmorata* electric organs. On illumination, they are cross-linked to the receptor with the 70-80% efficiency, the only exception being the Lys⁴⁴-derivative. The results obtained confirm a multipoint character of the neurotoxin-receptor binding established earlier by spectral means.