



УДК 577.354.3:591.145.3-812

ВЗАИМНОЕ РАСПОЛОЖЕНИЕ СУБЪЕДИНИЦ
АЦЕТИЛХОЛИНОВОГО РЕЦЕПТОРА И СВЯЗАННОГО
С НИМ НЕЙРОТОКСИНА *Цетлин В. И., Плужников К. А., Карелин А. А.,
Карлссон Е.,** Иванов В. Т.

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

Получена серия производных нейротоксина II *Naja naja oxiana*, содержащих по одной *n*-азидо-[¹⁴C]бензоильной группировке. Соединения, меченные по остаткам Leu¹, Lys¹⁵, Lys²⁵, Lys²⁶ и Lys⁴⁶, специфически связываются с ацетилхолиновым рецептором из электрического органа ската *Torpedo marmorata*, а при облучении образуют с ним ковалентную связь. С использованием электрофореза в полиакриламидном геле и гель-хроматографии показаны контакты нейротоксина с α-, β-, γ- и δ-субъединицами рецептора, при этом избирательность модификации субъединиц зависит от положения *n*-азидо-[¹⁴C]бензоильной группы в молекуле токсина. Различия между двумя токсинсвязывающими участками ацетилхолинового рецептора продемонстрированы с помощью анализа фотоиндуцированных сшивок, образующихся в условиях блокирования одного из участков гекса(трифторацетил)нейротоксином II. Установлено взаимное расположение двух молекул нейротоксина, связанных с ацетилхолиновым рецептором. На основании полученных данных предложены модели взаимного расположения субъединиц ацетилхолинового рецептора.

Нейротоксины змей традиционно используются как инструменты исследования ацетилхолинового рецептора (см. обзоры [1, 2]). Несмотря на успешные исследования нейротоксинов и рецептора в отдельности, до недавнего времени пространственная структура образуемого ими комплекса оставалась неясной. С помощью различных методов было показано, что в связывании с рецептором принимает участие значительная часть поверхности нейротоксина [3—5]. Фотоиндуцированные сшивки были обнаружены между нейротоксинами и всеми субъединицами рецептора [6—9], однако ни в одном из случаев не было установлено, с какими субъединицами рецептора связываются определенные участки нейротоксина. Выяснение этого вопроса должно дать информацию об ориентации в связывающем участке рецептора двух взаимодействующих с ним молекул нейротоксина, а также может помочь установить взаимное расположение субъединиц ацетилхолинового рецептора.

С этой целью в настоящей работе идентифицированы субъединицы соллобилизированного в тритоне X-100 ацетилхолинового рецептора из электрического органа ската *Torpedo marmorata*, с которыми образуют фотоиндуцированные сшивки производные нейротоксина II *Naja naja oxiana*, содержащие по одной радиоактивной *n*-азидобензоильной группе в различных участках молекулы.

Эти производные получены реакцией нейротоксина II с *N*-оксисукцинимидным эфиром *n*-азидо-[¹⁴C]бензойной кислоты. Для проведения реакции и разделения продуктов (рис. 1) использованы те же условия, что и при получении соответствующих нерадиоактивных производных [5]. Для нерадиоактивных моно-N₃Bz-производных ранее была установлена локализация азидобензоильных групп, которая справедлива и для ¹⁴C-меченых производных, что следует из идентичности условий модификации и подобия приведенных на рис. 1 профилей разделения.

* Использованы стандартные сокращения, а также N₃Bz, N₃Bz* — *n*-азидобензоильной *n*-азидо-[¹⁴C]бензоил-.

** Институт биохимии (Упсала, Швеция).

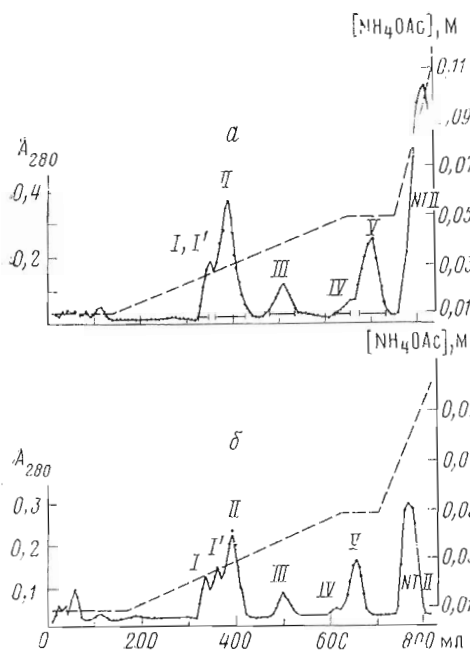


Рис. 1

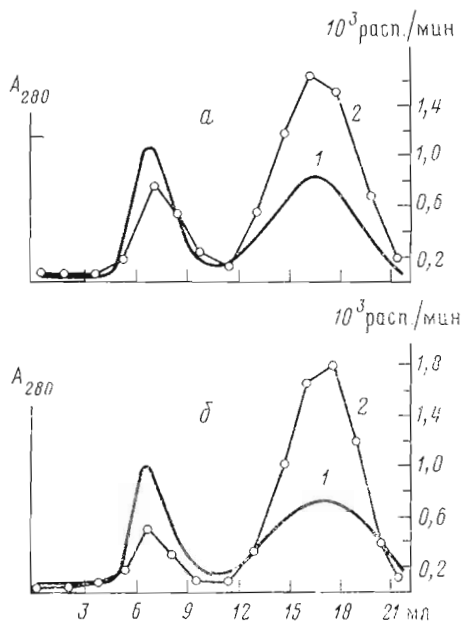


Рис. 2

Рис. 1. Хроматография продуктов модификации нейротоксина II N-оксисукцинимидным эфиром *n*-азидо- ^{14}C бензойной кислоты на колонке (1×12 см) с биорексом-70 (а) и продуктов модификации при использовании соответствующего нерадиоактивного реагента на колонке 1×13 см (б). Отмечены пики, содержащие N_3Bz -метку по $\epsilon\text{-NH}_2$ -группе Lys 44 (I), Lys 46 (I'), Lys 26 (II), Lys 15 (III), Lys 25 (V) и по $\alpha\text{-NH}_2$ -группе Leu 1 (IV). На рис. а указаны границы объединения фракций. Пунктир – градиент концентрации NH_4OAc , pH 7,5

Рис. 2. Хроматография токсин-рецепторного комплекса на колонке (1×40 см) с сефадексом G-75, уравновешенным 0,3 M Na-фосфатным буфером (pH 7,5), содержащим 0,025% тритон X-100 и 0,02% азид натрия. Скорость элюции 25 мл/ч. Представлены профили разделения комплексов рецептора с [Lys 26 (N_3Bz)]нейротоксином II без облучения (а) и после облучения и вытеснения ковалентно не связавшегося производного нейротоксина II нативным токсином (б). Контроль по поглощению (1) и по радиоактивности (2)

На рис. 1а отмечены фракции, которые использовались для изучения взаимодействия токсинов с ацетилхолиновым рецептором. Разделение мономодифицированных по остаткам Lys 44 и Lys 46 производных не всегда удается осуществить за одну хроматографическую стадию. Мы сочли возможным воспользоваться фракцией, содержащей оба этих производных, для идентификации субъединицы, образующей ковалентные связи с Lys 46 , поскольку известно, что Lys 44 (N_3Bz)-производное при облучении не образовывало ковалентного комплекса с рецептором [5].

Выделение ацетилхолинового рецептора из электрических органов ската *T. marmorata* проводилось в основном как в работе [10] и включало в себя аффинную хроматографию на нейротоксин-II-сефарозе 4В. В результате получены препараты, имеющие 7–8 нмоль α -токсинсвязывающих участков на 1 мг рецепторного белка, т. е. обладающие 87–100% активности в расчете на связывание двух молекул нейротоксина одной молекулой рецептора с $M_r \sim 250\,000$ (см. [1, 2]).

Ранее анализ связывания фотоактивируемых производных токсинов основывался на их конкуренции с [^3H]ацетилированным нейротоксином II или токсином *3 N. n. siamensis* [11]. Наличие радиоактивности в N_3Bz -производных позволило непосредственно оценить степень ковалентного связывания. Для этого использовалась гель-хроматография на сефадексе G-75 (рис. 2). При анализе степени фотоиндуцированных сшивок после облучения ковалентно не связавшийся токсин вытеснялся из комплекса с рецептором избытком нативного нейротоксина II. Ранее в опытах

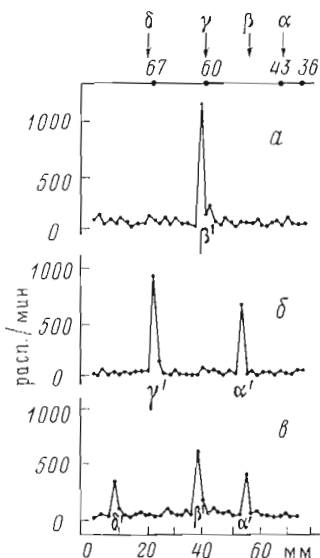


Рис. 3. Распределение радиоактивности при электрофоретическом разделении токсин-рецепторных комплексов в случае производных, содержащих фотоактивируемую группу в положении Lys⁴⁶, Leu¹ и Lys²⁵ (а, б и в соответственно). На нижней оси указан размер геля, на верхней стрелками — положение окрашиваемых кумаски полос, соответствующих α -, β -, γ - и δ -субъединицам ацетилхолинового рецептора, кружками — положение стандартов и их молекулярная масса в килодальтонах; α' , β' , γ' и δ' — соответствующие субъединицы, содержащие связанный N₃Bz⁺-нейротоксин II

с нерадиоактивными монопроизводными нейротоксина II было доказано, что шивки образуются лишь с участками специфического связывания нейротоксинов [5].

Мы показали, что все полученные *n*-азидобензоильные производные обладали способностью связываться с рецептором и, за исключением Lys⁴⁴-производного, при облучении образовывали с ним ковалентные связи. Степень ковалентного связывания моно-N₃Bz⁺-производных составляла ~60%.

Полученные результаты по фотоиндуцированным шивкам в целом согласуются с данными для спин-меченых и дансильированных нейротоксинов [3, 4] и еще раз доказывают участие в связывании с рецептором фрагментов нейротоксина II, принадлежащих трем из четырех имеющихся в молекуле нейротоксина петель, ограниченных дисульфидными связями.

Этот вывод касается взаимодействия нейротоксинов с ацетилхолиновым рецептором как комплексом субъединиц, т. е. когда не конкретизируется роль в связывании той или иной субъединицы. Радиоактивность фотоактивируемых производных позволила охарактеризовать их связывание на уровне определенных субъединиц ацетилхолинового рецептора. Ранее в исследованиях рецептора наиболее часто использовались радиоактивные йодированные производные α -бунгаротоксина [6, 8, 9], нейротоксина длинного типа, имеющего в своем составе два остатка тирозина. Йодирование нейротоксина II было нежелательным, поскольку имеющийся в нем единственный остаток тирозина окрашивается [12] и его модификация могла бы привести к существенному падению эффективности связывания с рецептором. Снижение эффективности связывания при дополнительной модификации может быть не столь важным, если цель исследования состоит в мечении рецепторного компонента для его выделения и биохимической характеристики, тогда как при выяснении пространственных аспектов связывания нейротоксинов с рецептором необходимо, чтобы молекула токсина была модифицирована в наименьшей степени. Поэтому мы использовали собственную радиоактивность фотоактивируемой группировки, несмотря на то что она не столь высока, как в образце с ¹²⁵I.

На рис. 3 показано распределение радиоактивности в субъединицах при образовании шивок с некоторыми производными, обнаруживаемое с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. В использованных условиях кажущиеся молекулярные массы α -, β -, γ - и δ -субъединиц составляют соответственно 43, 50, 60 и 68 кДа. Исходя из того, что с одной субъединицей связывается одна молекула токсина, имеющая $M \sim 7$ кДа, радиоактивно меченые субъединицы с

Анализ фотоиндуцированных сшивок между фотоактивируемыми производными нейротоксина II и субъединицами ацетилхолинового рецептора

Остаток нейротоксина II, несущий фотоактивируемую группу	Радиоактивность (расп/мин) субъединиц			
	α'	β'	γ'	δ'
По данным электрофореза				
Lys ⁴⁶	120	1300	110	100
Lys ²⁶	50	50	40	2400
Lys ²⁵	200	540	40	150
Leu ¹	700	30	900	30
Lys ¹⁵	2500	40	210	3600
Lys ¹⁵ *	4200	50	60	70
По данным хроматографии **				
Lys ²⁶	200	120	110	300
Lys ²⁵	1500	300	100	1000
Lys ¹⁵ *	800	100	120	100

* Связывание в присутствии гекса(трифторацетил)нейротоксина II.
 ** Хроматография на сефакиле S-300 (см. рис. 4).

M 49, 57, 67, 74 кДа обозначены соответственно как α' , β' , γ' и δ' . Справедливость идентификации меченых субъединиц подтверждается тем фактом, что, например, при наличии радиоактивности в α' - или δ' -субъединицах окрашивание гелей кумасси голубым обнаруживает соответственно уменьшение интенсивности полос α - или δ -субъединиц. Этот эффект менее выражен для β - и γ -субъединиц, которые в использованных нами препаратах рецептора окрашиваются менее четко, а при их модификации полосы β' - и γ' -субъединиц располагаются соответственно вблизи полос γ - и δ -субъединиц, что приводит к уширению полосы последних.

В целом полученные для серии *n*-азидо-[¹⁴C]бензоильных производных нейротоксина II данные (табл. 1) показывают, что все четыре типа субъединиц (α , β , γ и δ) солибилизованного ацетилхолинового рецептора имеют контакты со связанными нейротоксинами. Этот вывод следовал и из работы [8], однако авторы использовали смесь фотоактивируемых производных α -бунгаротоксина с неизвестной степенью модификации, что могло бы привести к неоднозначности в интерпретации результатов. В работе [9] было использовано фотоактивируемое производное α -бунгаротоксина, модифицированное преимущественно по остаткам Cys²⁹ и Cys³³, при этом было обнаружено мечение α - и δ -субъединиц. Мечение по крайней мере двух субъединиц описано в работе [6], где, по-видимому, были получены мономодифицированные фотоактивируемые производные α -бунгаротоксина, в которых, однако, не было установлено положение меток.

Следует отметить, что во всех упомянутых работах [6, 8, 9] использовались мембранные препараты рецептора и фотоактивируемые производные нейротоксинов «длинного» типа. Сопоставление с результатами настоящей работы показывает, что независимо от того, находится рецептор в своем естественном мембранном состоянии или же в солибилизованном виде, в формировании центра связывания «коротких» и «длинных» нейротоксинов участвуют фрагменты субъединиц всех типов.

Степень ковалентного связывания с рецептором полученных в настоящей работе производных нейротоксина II примерно одинакова, поэтому различия приведенных в табл. 1 суммарных радиоактивностей вырезанных из одного геля полос в опытах с различными N₃Bz'-производными нейротоксина II обусловлены различиями в количестве вещества, использованного при электрофорезе, а также несовершенством метода анализа радиоактивности в геле; использование в методике перекиси водорода может привести к заниженной оценке радиоактивности. Однако обнаружение в

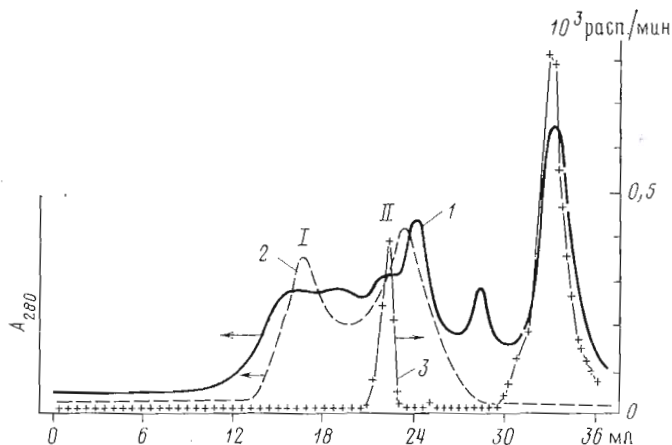


Рис. 4. Гель-фильтрация субъединиц ацетилхолинового рецептора на колонке (0,4×125 см) с сефакрилом S-300, уравновешенным 0,05 М Na-фосфатным буфером, рН 7,5, содержащим 1% додецилсульфат натрия и 0,01 М дитиозиритрит (1). Представлены также профили разделения стандартов: бычьего сывороточного альбумина (I, M 67 кДа) и овальбумина (II, M 43 кДа) (2) и профиль радиоактивности при разделении ковалентного комплекса ацетилхолинового рецептора с $[Lys^{15}(N_3Bz)]$ нейротоксином II в опыте с вытеснением текса (трифторацетил) нейротоксином II (3)

полосе радиоактивности, с достоверностью превышающей уровень фона, убедительно свидетельствует о модификации соответствующей субъединицы рецептора.

Из табл. 1 видно, что направленность мечения субъединиц зависит от того, в каком положении молекулы нейротоксина находится фотоактивируемая группировка. Для ряда производных наблюдается предпочтительная модификация одной субъединицы, например β -субъединицы в случае фотоактивируемой группировки в остатке Lys^{16} . Для производного, модифицированного по остатку Leu^1 , сопоставимая по величине радиоактивность обнаружена в двух субъединицах — α и γ . Мечение одной или двух субъединиц вполне объяснимо, поскольку с одной молекулой рецептора взаимодействуют две молекулы токсина и связанные с ними метки могут оказаться в контакте с одной или двумя субъединицами. С другой стороны, на первый взгляд кажется трудно объяснимой одновременная модификация трех субъединиц, которая наблюдается, например, для нейротоксина с фотоактивной меткой в остатке Lys^{15} . Дансильная группа в этом положении в комплексе токсина с рецептором не испытывает непосредственно влияния рецептора, а спиновая метка на этом остатке сохраняет сравнительно высокую собственную подвижность и лишь слабо экранируется группировками рецептора от внешней среды [4]. В свете этих данных мечение трех субъединиц рецептора можно объяснить тем, что n -азидобензоильная группа на Lys^{15} также обладает высокой подвижностью и на одном или обоих токсинсвязывающих участках имеет возможность контактировать по крайней мере с двумя субъединицами.

Нами проведены предварительные опыты по разделению меченых субъединиц ацетилхолинового рецептора с помощью хроматографии на сефакриле S-300 (рис. 4 и табл. 1). При этом упрощается по сравнению с электрофоретическим разделением анализ радиоактивности, однако пока не удалось добиться разделения всех субъединиц. Для производных, модифицированных по остаткам Lys^{25} или Lys^{15} , результаты хроматографии согласуются с данными электрофореза. В случае Lys^{26} -меченого производного радиоактивность была обнаружена не только в δ -субъединице, как при электрофорезе, но и в α -субъединице; поскольку в этом случае при хроматографии радиоактивность в большей или меньшей степени была обнаружена и в остальных фракциях, для выяснения роли α -субъединицы в связывании метки в положении Lys^{26} необходимы дополнительные эксперименты.

**Контакты модифицированных остатков нейротоксина II
с субъединицами ацетилхолинового рецептора**

Модифицированный остаток	Субъединицы	Модифицированный остаток	Субъединицы
Leu ¹ Lys ²⁵ Lys ²⁶	α, γ α, β, δ $\delta, (\alpha)^*$	Lys ⁴⁶ Lys ¹⁵ Lys ^{15**}	β α, γ, δ α

* Низкая степень мечения (см. табл. 1).

** Связывание в присутствии гекса(трифторацетил)нейротоксина II.

В табл. 2 суммированы обнаруженные в данной работе наиболее предпочтительные контакты между субъединицами ацетилхолинового рецептора и фотоактивируемыми группировками в определенных положениях в молекуле нейротоксина II.

Как уже отмечалось выше, независимо от того, используются ли мембранные или солюбилизованные препараты рецептора, фотоактивируемые производные «длинных» и «коротких» токсинов связываются с несколькими субъединицами. При этом можно ожидать, что в зависимости от состояния рецептора, конкретного токсина и длины спейсера в фотоактивируемой группировке будут наблюдаться различия в модификации той или иной субъединицы меткой, находящейся в определенном положении токсина. Например, производное α -бунгаротоксина, меченное, вероятно, по N-концевому остатку, не образовывало сшивок с мембранным ацетилхолиновым рецептором [8].

Поскольку молекула ацетилхолинового рецептора, взаимодействующая с двумя молекулами нейротоксина, несимметрична (как следует, например, из соотношения субъединиц $\alpha_2\beta\gamma\delta$), токсинсвязывающие участки должны быть неэквивалентны. Различия в микроокружении определенных фрагментов молекул нейротоксина, находящихся в двух связывающих участках рецептора, показаны нами для [Lys¹⁵(N₃Bz*)]нейротоксина II. Для этой цели использован гекса(трифторацетил)нейротоксин II, для которого ранее была обнаружена способность вытеснять природный нейротоксин II, его моноспин-меченые или дансильированные производные лишь с половины связывающих участков [3]. В присутствии этого соединения степень образования фотондуцируемых сшивок снижается приблизительно вдвое, при этом Lys¹⁵(N₃Bz*)-производное связывается только с α -субъединицей (табл. 1) (опыты с Lys¹⁵-производным проводились на одной и той же порции рецептора; облучение, электрофорез и анализ радиоактивности проводились для них параллельно). Полученный результат подтверждается разделением субъединиц с помощью гель-хроматографии (рис. 4). Таким образом, отсутствие мечения γ - и δ -субъединиц в присутствии гекса(трифторацетил)нейротоксина II действительно обусловлено блокированием последним одного из двух токсинсвязывающих участков.

Для трех из исследованных нами производных в большей или меньшей степени наблюдается модификация α -субъединиц (табл. 2), что согласуется с той ролью, которая отводится в литературе α -субъединицам в связывании токсинов [13]. При этом наибольшее включение радиоактивности в α -субъединицу наблюдается для фотоактивируемой метки в положении Lys¹⁵, т. е. остатка, который не является инвариантным и по данным ЭПР и флуоресценции [4] должен располагаться на периферии токсинсвязывающих участков рецептора. С другой стороны, связывание с α -субъединицей не является предпочтительным для производных с *n*-азидобензопольной группой в положениях Lys²⁶ и Lys⁴⁶, хотя эти остатки консервативны и их модификация приводит к наибольшему по сравнению с модификацией других аминокислот падению токсичности и эффективности связывания с рецептором [3, 4].

Поскольку остаток Lys²⁶ входит во фрагмент центральной петли нейротоксина, в которой находится большая часть инвариантных остатков и ко-

торой отводится важная роль в связывании с рецептором (см., например, [13]), взаимодействие этого остатка с δ -субъединицей представляет особый интерес. В ряде работ показано, что преимущественно с δ -субъединицей связываются различные блокаторы канала [14, 15]. Поскольку, как следует из настоящей работы, с этой субъединицей связывается фрагмент «активного центра» нейротоксина, легче можно представить себе, каким образом нейротоксины змей, не являющиеся конкурентными ингибиторами по отношению к блокаторам канала, вызывают такие перестройки рецептора, которые приводят к закрытию канала.

В последние годы в различных лабораториях с помощью токсинов предпринимались попытки установить взаимное расположение субъединиц ацетилхолинового рецептора [16, 17]. В работе [16] о локализации двух связанных молекул нейротоксина судили на основании электронной микроскопии комплексов рецептор — биотинилированный нейротоксин — авидин. Авторы работы [17] полагают, что на разностных картах электронной плотности рецептора и его комплекса с α -бунгаротоксином непосредственно детектируются две связанные молекулы токсина.

Идентификация субъединиц, образующих сшивки с определенными участками нейротоксина, открывает дополнительные возможности для выяснения топографии субъединиц ацетилхолинового рецептора. Такой подход основан на следующих соображениях. Подобие пространственной структуры нейротоксина II и его мономодифицированных производных [11, 18], высокая конформационная стабильность этих белков по отношению к изменениям pH, температуры, полярности среды или денатурирующим агентам [11, 19] позволяют считать, что в комплексе с рецептором они в основном сохраняют ту конформацию, которая присуща нейротоксину в растворе. Поэтому экспериментально определенные расстояния между спиновыми метками или трифторацетильными группами на α - и ϵ -аминогруппах для свободных нейротоксинов [20, 21], вероятно, близки к расстояниям между *n*-азидобензоильными группировками в соответствующих положениях и не претерпевают значительных изменений при образовании комплексов между нейротоксинами и рецептором. Многоочечный характер связывания нейротоксина с рецептором означает, что способ посадки нейротоксина на рецептор принципиально не меняется при модификации какой-либо одной из аминогрупп (например, ϵ -аминогруппа остатка Lys⁴⁶ занимает приблизительно один и тот же участок рецептора при введении метки по любой из остальных аминогрупп).

Таким образом, на основании образования фотоиндуцированных сшивок *n*-азидобензоильными производными нейротоксина II можно судить о расстояниях между участками отдельных субъединиц, входящих в токсинсвязывающий центр. В свою очередь это накладывает ограничения на возможные варианты взаимного расположения субъединиц.

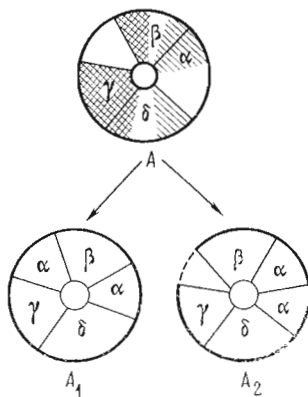
При построении модели взаимного расположения связанных нейротоксинов и субъединиц ацетилхолинового рецептора мы учитывали размеры молекулы нейротоксинов по данным рентгеноструктурного анализа [22], а также литературные данные о том, что нейротоксины не проникают в мембрану, а связываются с той частью рецептора, которая выступает над внешней стороной мембраны на 55 Å и имеет средний диаметр ~80 Å [23]. Поскольку все субъединицы являются трансмембранными, часть поверхности каждой из них может быть доступна для связывания с нейротоксинами. Мы также учитывали данные работ [2, 23, 24], в которых на основе математической обработки электронно-микроскопических изображений проекции каждой субъединицы была приписана поверхность, пропорциональная ее молекулярному весу. (Недавно опубликованные данные [25—27] показывают, что различия в длине аминокислотных последовательностей субъединиц меньше, чем следовало ожидать на основании электрофоретически определенных молекулярных масс, однако это обстоятельство не играет существенной роли при тех приближениях, с которыми строилась наша модель.)

На основании изложенных выше данных в контакте с субъединицами рецептора должны находиться одновременно следующие остатки: Leu¹,

Lys¹⁵, Lys²⁵, Lys²⁶ и Lys⁴⁶. Поскольку степень ковалентного связывания производных нейротоксина (оцепиваемая для рецептора, не диссоциированного на субъединицы) во всех случаях составляла не менее 60% [5], в связывающем центре должны быть одновременно размещены две молекулы нейротоксина.

Построение модели начинали с Lys²⁶- и Lys⁴⁶-производных, модифицирующих одну субъединицу (табл. 2). Две молекулы нейротоксина размещали таким образом, чтобы боковые цепи остатков Lys⁴⁶ контактировали с β -субъединицей. При этом, чтобы сохранить контакты остальных остатков токсина с рецептором, полипептидные цепи нейротоксинов располагали в пределах круга диаметром 80 Å, так что на каждый токсин приходился определенный сектор указанной поверхности. При размещении остатков Lys²⁶ обеих молекул токсинов на δ -субъединице метки в положении Lys⁴⁶ должны остаться в пределах β -субъединицы, откуда следует, что β - и δ -субъединицы не могут быть соседними. Их наиболее сближенные части могут быть противоположащими и разделенными центральной полостью рецептора (диаметр не менее 6 Å [23]). Следующим этапом было фиксирование взаимного расположения нейротоксина и субъединиц рецептора таким образом, чтобы аминокетильная группа Lys¹⁵ одного из токсинов могла контактировать с α -субъединицей, а другая — с γ - или δ -субъединицами, которые могут быть соседними (см. табл. 2, данные по связыванию в присутствии и в отсутствие гекса(трифторацетил)нейротоксина II).

В результате удается в первом приближении очертить границы двух токсинсвязывающих участков, обозначенных различной штриховкой на схеме, и составить представление о взаимном расположении четырех из пяти субъединиц. При этом остается неясным расположение одной из двух α -субъединиц, что делает равновероятными структуры A₁ и A₂ (схема). Кроме того, каждая из этих структур может быть представлена в зеркальном отображении.



Схемы моделей расположения субъединиц ацетилхолинового рецептора, предложенные на основании контактов с фотоактивируемыми производными нейротоксина II

Фиксирование положения нейротоксинов в обоих связывающих участках по остаткам Lys¹⁵, Lys²⁶ и Lys⁴⁶ в значительной степени предопределяет возможные контакты других остатков. α -Аминокетильная группа Leu¹ одной из молекул токсина контактирует с той же α -субъединицей, что и ϵ -аминокетильная группа Lys¹⁵ этой молекулы; для другой молекулы токсина, в которой остаток Lys¹⁵ сближен с γ - и δ -субъединицами, возможен контакт остатка Leu¹ с γ -субъединицей. Этот вывод согласуется с экспериментальными данными о близкой эффективности мечения α - и γ -субъединиц при использовании фотоактивируемого производного с *n*-азидобензойной группировкой в положении Leu¹.

В рамках моделей A₁ и A₂ может быть реализовано мечение α - и β -субъединиц фотоактивируемой группировкой в положении Lys²⁵. При этом по мо-

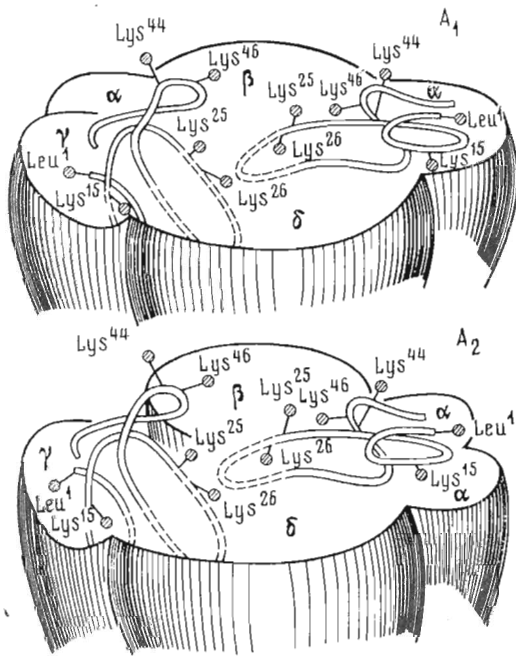


Рис. 5. Модель взаимного расположения нейротоксинов в связывающем участке ацетилхолинового рецептора (варианты А₁ и А₂)

положения нейротоксинов на поверхности мембраны не удалось реализовать обнаруженные контакты ни при одном из способов взаимного расположения пяти субъединиц. Следует обратить внимание на то, что одна из связавшихся молекул токсинов образует с плоскостью мембраны больший угол, чем другая. Такое расположение позволяет понять, почему в работе [17] проекция одного из токсинов имела значительно меньшие размеры. При размещении токсинов в связывающем участке (в рамках выбранного расположения субъединиц) учитывалось экспонированное положение остатка Lys⁴⁴, о котором свидетельствуют данные ЭПР и отсутствие ковалентных сшивок в случае соответствующего производного. С другой стороны, учитывались данные ЭПР, свидетельствующие о том, что с рецептором контактируют не только остатки Leu¹, Lys¹⁵, Lys²⁵, Lys²⁶ и Lys⁴⁶, но и остаток Glu² и His³¹. Кроме того, принималось во внимание, что, по данным ЭПР, остаток Lys²⁶ должен быть достаточно глубоко погружен в рецептор, тогда как α -аминогруппа остатка Leu¹ и ϵ -аминогруппа Lys¹⁵ не могут быть сильно экранированы, поскольку вводимые по ним дансильные группировки оказываются вне области контакта с рецептором [4].

Вопрос о взаимном расположении α -субъединиц имеет принципиальное значение, поскольку именно с α -субъединицами взаимодействуют две молекулы ацетилхолина, связывание которых приводит к открыванию ионного канала (см. [1]).

В литературе можно встретить несколько моделей взаимного расположения субъединиц ацетилхолинового рецептора [1, 2, 17, 23, 24, 28], основанных главным образом на данных электронной микроскопии и сшивок с помощью бифункциональных реагентов. В последнее время предпочтение отдается тем моделям, в которых две α -субъединицы не являются соседними. Обе предложенные нами модели А₁ и А₂ (рис. 5) согласуются с электронно-микроскопическими данными о взаимном расположении β - и δ -субъединиц [28]. Они также не противоречат электронно-микроскопическим данным, если в отличие от авторов работ [16, 17, 28] не отождествлять идентификацию связанных нейротоксинов с идентификацией двух α -субъединиц. Результаты настоящей работы вполне определенно показывают, что связывание нейротоксинов не ограничивается только α -субъ-

дели А₂ модифицируется α -субъединица, соседняя с β -субъединицей. Ни в одной из моделей не удается реализовать контакт остатка Lys²⁵ с δ -субъединицей. Наблюдаемое в эксперименте мечение δ -субъединицы может быть связано с тем, что для этого производного стехиометрия токсин-рецепторного комплекса превышала 2:1.

При построении модели мы исходили из того, что остаток Lys²⁶ в обоих связанных токсинах располагался на δ -субъединице; близость в обеих моделях α - и δ -субъединиц может объяснить модификацию последней Lys²⁶-производным, наблюдавшуюся в некоторых опытах (табл. 1 и 2).

На рис. 5 представлены модели расположения нейротоксинов на связывающей площадке ацетилхолинового рецептора. Нейротоксины имеют сравнительно плоскую структуру [22], однако в рамках плоского рас-

единицами. Модель A_1 согласуется с данными о сшивках между различными субъединицами (см. [2]), тогда как отсутствие сшивок между двумя α -субъединицами делает модель A_2 менее предпочтительной. При этом, однако, следует учитывать, что образование сшивок зависит от бифункционального реагента и наличия в субъединицах соответствующим образом расположенных реакционных группировок.

Из модели A_1 (рис. 5) следует, что одна из α -субъединиц не имеет контактов ни с одной из фотоактивируемых группировок связанных пептидоксинов. Возможно, эта субъединица экранируется какими-то другими участками нейротоксина, не имеющими меток. С другой стороны, в рамках модели A_2 две α -субъединицы являются соседними и их роль в связывании пептидоксинов менее дискриминирована. Для того чтобы сделать выбор между предложенными моделями, необходимы дополнительные эксперименты. Можно надеяться, что исследование связывания серии фотоактивных монопроизводных нейротоксина II в условиях блокирования одного из двух участков гекса(трифторацетил)нейротоксином II позволит более однозначно установить топографию взаимодействующих поверхностей нейротоксинов и ацетилхолинового рецептора.

Экспериментальная часть

N-Оксисукцинимидный эфир *n*-азидо- ^{14}C бензойной кислоты получен по методике [29], описанной для нерадиоактивного реагента, исходя из 1,21 мг *n*-аминобензойной кислоты (57 Ки/моль, Amersham, Англия), содержащей ^{14}C -углеродный атом в карбоксильной группе, который смешивали с 15 мг нерадиоактивной *n*-аминобензойной кислоты. Выход препарата 5 мг (21%), удельная активность 5 Ки/моль. Радиоактивность измеряли в сцинтилляторе Ready-Solv (Beckman, США) на счетчике I. Inter-technique SL-40 (Франция).

Модификация нейротоксина II N-оксисукцинимидным эфиром *n*-азидо- ^{14}C бензойной кислоты. В 7,5 мл 0,2 М Na-ацетатного буфера, pH 7,8, содержащего 6 н. хлоридат гуанидина, вносили 74,1 мг (11 мкмоль) нейротоксина II, добавляли 2,9 мг (11 мкмоль) *N*-оксисукцинимидного эфира *n*-азидо- ^{14}C бензойной кислоты в 0,4 мл диоксана и перемешивали 40 ч при 24° С. Реакционную смесь обессоливали на колонке с сефадексом G-25 (2,5×60 см), уравновешенным 0,05 М уксусной кислотой, при 4° С и после лиофилизации хроматографировали на колонке с биорексом-70 (см. рис. 1). Полученные белковые фракции с удельной активностью 5 Ки/моль лиофилизовали и хранили при -10° С.

Локализацию меченого остатка в радиоактивных производных проводили на основании сопоставления профилей элюции с профилем элюции нерадиоактивных фотоактивируемых производных (рис. 1) [5].

Определение степени ковалентного связывания N_3Vz^+ -производных нейротоксина II с рецептором. В две кварцевые кюветы (l 0,2 см) вносили 0,15 нмоль ацетилхолинового рецептора в 0,3 М Na-фосфатном буфере (pH 7,5), содержащем 0,025% тритон X-100, 0,02% азид натрия. В одну кювету вносили 50 мкл (2 нмоль) радиоактивного ацетилированного токсина (уд. акт. 15 Ки/ммоль) [11], а в другую 50 мкл (2 нмоль) раствора радиоактивного фоточувствительного N_3Vz^+ -производного нейротоксина II. Оба образца инкубировали в темноте 1 ч, после чего облучали светом галогенной лампы мощностью 250 Вт с расстояния 12 см. Облучение проводили в три приема по 2 мин с двухминутными интервалами. После облучения содержимое первой кюветы хроматографировали на колонке с сефадексом G-75 в условиях рис. 2 для определения активности рецептора как в работе [5], а во вторую кювету добавляли 50 мкл (10 нмоль) раствора нативного нейротоксина II и инкубировали еще 1 ч для вытеснения ковалентно не связавшегося токсина, который отделяли затем хроматографией в условиях рис. 2. Из хроматографических фракций токсин-рецепторного комплекса отбирали аликвоты по 250 мкл и измеряли радиоактивность.

Приготовление образцов для электрофореза. В кварцевую кювету (l 0,2 см) вносили 250 мкл (1 нмоль) ацетилхолинового рецептора и 20 мкл (3 нмоль) N_3Vz^* -производного нейротоксина II и выдерживали 1 ч в темноте. Для образования сшивок только с одним участком связывания к ацетилхолиновому рецептору (1 нмоль) добавляли 40-кратный избыток гекса(трифторацетил)нейротоксина II [11], инкубировали 1 ч, затем вносили 3,6 нмоль N_3Vz^* -нейротоксина II и инкубировали в темноте 1 ч. После этого образцы облучали в вышеописанных условиях и диализовали против 5 л 0,01 М трис-HCl (pH 7,5), содержащего 0,2% додецилсульфат натрия, 10^{-3} М EDTA, 10^{-3} М EGTA, $5 \cdot 10^{-3}$ М фенилметилсульфенилфторид, в течение 24 ч. После диализа образцы лиофилизировали, растворяли в 0,2 мл буфера (0,01 М трис-HCl, pH 7,5, 2% додецилсульфат натрия, 5% β -меркаптоэтанол) и инкубировали 3 ч при 37° С. Перед загрузкой образцов в гель к ним добавляли по 20 мкл глицерина.

Электрофорез в ПААГ с додецилсульфатом натрия проводили по модифицированной методике [30] в 10% полиакриламидном геле ($22 \times 25 \times 0,3$ см) в течение 20 ч при 70 В. В качестве маркеров использовали следующие белки (в кДа): лактатдегидрогеназу (36), овалбумин (43), каталазу (60) и бычий сывороточный альбумин (68).

Идентификация субъединиц, участвующих в связывании с радиоактивными фоточувствительными производными нейротоксина II. Гель разрезали слайсером на полосы по 0,2 см, добавляли 0,3 мл 30% перекиси водорода и инкубировали в пробирках с плотно притертыми пробками в течение 48 ч при 40° С, после чего лиофилизировали. Лиофилизат растворяли в 150 мкл 50% метанола, вносили в 7 мл сцинтиллятора Ready-Solv и измеряли радиоактивность. Приведенные в табл. 1 значения определены в единичных опытах, за исключением данных электрофореза для Lys¹⁵- и Lys²⁵-производных, являющихся средними значениями двух опытов.

Гель-фильтрационное разделение субъединиц ацетилхолинового рецептора проводили на колонке с сефакрилом S-300 (Pharmacia, Швеция). Образцы готовили так же, как и для электрофореза. Условия хроматографии указаны в подписи к рис. 4. Для анализа радиоактивности из хроматографических фракций отбирали по 125 мкл.

ЛИТЕРАТУРА

1. Karlin A. In: The cell surface and neuronal function / Eds Cotman C. W., Poste G., Nicolson G. L. Amsterdam: North Holland Publishing Co., 1980, p. 191—260.
2. Hucho F. Trends in Biochem. Sci., 1981, v. 6, № 9, p. 242—245.
3. 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.
4. Tsetlin V. I., Karlsson E., Utkin Yu. N., Pluzhnikov K. A., Arseniev A. S., Surin A. M., Kondakov V. V., Bystrov V. F., Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A. Toxicol., 1982, v. 20, № 1, p. 83—93.
5. Плужников К. А., Карелин А. А., Уткин Ю. Н., Цетлин В. И., Иванов В. Т. Биооргани. химия, 1982, т. 8, № 7, с. 905—913.
6. Hucho F. FEBS Lett., 1979, v. 103, № 1, p. 27—32.
7. Oswald R. E., Changeux J.-P. FEBS Lett., 1982, v. 139, № 2, p. 225—229.
8. Nathanson N. M., Hall Z. W. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, № 4, p. 1698—1703.
9. Witzemann V., Muchmore D., Raftery M. A. Biochemistry, 1979, v. 18, № 24, p. 5511—5517.
10. Karlsson E., Fohlman J., Groth M. Bull. de L'institut Pasteur, 1976, v. 74, № 1, p. 11—22.
11. Tsetlin V. I., Arseniev A. S., Utkin Yu. N., Gurevich A. Z., Senyavina L. B., Ivanov V. T., Bystrov V. F., Ovchinnikov Yu. A. Eur. J. Biochem., 1979, v. 94, № 2, p. 337—346.
12. 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—606.
13. Juillerat M. A., Schwendimann B., Hauert J., Fulpius B., Bargetzi J. P. J. Biol. Chem., 1982, v. 257, № 6, p. 2901—2906.
14. Saiton T., Oswald R., Wennogle L. P., Changeux J.-P. FEBS Lett., 1980, v. 116, № 1, p. 30—36.
15. Oswald R., Changeux J.-P. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, № 6, p. 3925—3929.
16. Holtzman E., Wise D., Wall J., Karlin A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1982, v. 79, № 1, p. 310—314.

17. Zingsheim H. P., Barrantes E. T., Frank J., Hanicke W., Neugebauer D.-Ch. Nature, 1982, v. 299, p. 81-84.
18. Пашков В. С., Арсеньев А. С., Уткин Ю. Н., Цетлин В. И., Быстров В. Ф. Био-
орган. химия, 1982, т. 8, № 5, с. 588-615.
19. Tsetlin V. I., Mikhaleva I. I., Myagkova M. A., Senyavina L. B., Arseniev A. S.,
Ivanov V. T., Ovchinnikov Yu. A. In: Peptides: chemistry, structure and biology/
/Eds Walter R., Meienhofer T. Ann Arbor: Ann Arbor Science, 1976, p. 935-941.
20. Arseniev A. S., Utkin Yu. N., Pashkov V. S., Tsetlin V. I., Ivanov V. T., Byst-
rov V. F., Ovchinnikov Yu. A. FEBS Lett., 1981, v. 136, № 2, p. 269-274.
21. Уткин Ю. Н., Пашков В. С., Плужников К. А., Курятов А. Б., Арсеньев А. С.,
Быстров В. Ф., Иванов В. Т. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 4, с. 437-449.
22. Kimball M. R., Sato A., Richardson J. S., Rosen L. S., Low B. W. Biochem. and
Biophys. Res. Commun., 1979, v. 88, № 3, p. 950-959.
23. Kistler J., Stroud R. M., Klymkowsky W., Lalancette R. A., Faircloud R. H. Bio-
phys. J., 1982, v. 37, p. 371-383.
24. Barnard E. A., Lamprecht J., Lo M., Nockles E., Sumikawa K., Cavanagh J., Dol-
ly J. O. In: Synaptic constituents in health and disease/Eds Brzin M., Sket D.,
Bachelard H. Ljubljana - London: Mladinska knjiga - Pergamon Press, 1980,
p. 224-229.
25. Sumikawa K., Houghton M., Smith J. C., Bell L., Richards B. M., Barnard E. A.
Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, № 9, p. 5809-5822.
26. Noda M., Takahashi H., Tanabe T., Toyosato M., Furutani Y., Hirose T., Asai M.,
Inayama S., Miyata T., Numa S. Nature, 1982, v. 299, p. 793-797.
27. Noda M., Takahashi H., Tanabe T., Toyosato M., Kikyotani S., Hirose T., Asai M.,
Takashima H., Inayama S., Miyata T., Numa S. Nature, 1983, v. 301, p. 251-255.
28. Wise D. S., Wall J., Karlin A. J. Biol. Chem., 1981, v. 256, № 4, p. 12624-12627.
29. 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.
30. Laemmli U. K. Nature, 1970, v. 227, p. 680-685.

Поступила в редакцию
24.VIII.1983

MUTUAL DISPOSITION OF THE BOUND NEUROTOXINS AND ACETYLCHOLINE RECEPTOR SUBUNITS

TSETLIN V. I., PLUZHNIKOV K. A., KARELIN A. A.,
KARLSSON E., IVANOV V. T.

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

A series of neurotoxin II (*Naja naja oxiana*) derivatives, each containing one *p*-azido-[¹⁴C]benzoyl group, have been prepared. Those labeled at Leu¹, Lys¹⁵, Lys²⁵, Lys²⁶, or Lys⁴⁶ associate specifically with the acetylcholine receptor from the *Torpedo marmorata* electric organs and form the crosslinks with it as a result of irradiation. Eletrophoresis in polyacrylamide gel and gel chromatography revealed the contacts between the neurotoxins and α , β , γ and δ subunits of the receptor, modification of a particular subunit being governed by the photoactivable group position in the neurotoxin molecule. The differences of the two neurotoxin binding sites in the receptor were demonstrated by analysis of the photoinduced crosslinks under the conditions of one site being blocked by hexa(trifluoroacetyl)neurotoxin II. The mutual arrangement of the two bound neurotoxin molecules was established. On the basis of data obtained, two models for the acetylcholine receptor subunit topography were proposed.