



УДК 577.112.088.3 : 595.44-114.52

© 1991 г.

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

ХАРАКТЕРИСТИКА МЕМБРАНОСВЯЗАННОГО РЕЦЕПТОРА
 α -ЛАТРОКРУСТОТОКСИНА ИЗ НЕРВНОЙ ТКАНИ КРАБА
PARALITHODES CAMTSHATICA

Филиал Института биоорганической химии
им. М. М. Шемякина АН СССР, Пушкино Московской обл.;
*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
АН СССР, Москва

Меченый изотопом ^{125}I α -латрокрустотоксин, активный по отношению к ракообразным пресинаптический нейротоксин из яда паука каракурта *Latrodectus mactans tredecimguttatus*, специфично связывается с плазматическими мембранами из нервной ткани ганглиев крабов *Paralithodes camtshatica* с константой диссоциации K_d $3 \cdot 10^{-10}$ М. Плотность участков связывания составляет 60 фмоль связанного токсина на 1 мг мембранного белка. Для связывания токсина с рецептором оптимальным является pH 6,4. Связывание возрастает на 20% в присутствии ионов кальция (2–5 мМ). NaCl в концентрации выше 0,075 М ингибирует специфическое связывание. Лектины из зародышей пшеницы и семян течевицы не влияют на рецепцию токсина. Токсинсвязывающая активность подавляется при повышенных температурах (20–65° С).

Яд паука каракурта содержит специфичный в отношении ракообразных пресинаптический нейротоксин — α -латрокрустотоксин, который может служить ценным инструментом для изучения функциональной и структурной организации аппарата секреции нейромедиаторов из пресинаптических окончаний нервных клеток ракообразных. В предыдущей работе [1] нами было показано присутствие рецептора этого нейротоксина в нервной ткани речного рака *Astacus astacus*. Для проведения исследования рецептора было получено радиоактивно меченное производное токсина, сохраняющее исходную биологическую активность.

Предполагается, что исследования рецептора из нервной ткани ракообразных должны включать не только характеристику мембраносвязанной формы, но и выделение его в индивидуальном виде, проведение сравнительного структурно-функционального анализа с выделенным ранее рецептором α -латротоксина из мозга быка [2]. Поскольку для выполнения этих работ требуется значительное количество рецептора, а возможности получения больших количеств нервной ткани речных раков ограничены, вопрос об источнике нервной ткани ракообразных приобретает важное значение.

Одним из наиболее крупных представителей класса ракообразных является камчатский краб *Paralithodes camtshatica*. Настоящая работа посвящена изучению мембраносвязанного рецептора α -латрокрустотоксина из нервной ткани этого краба.

Источником нервной ткани служили подглоточные ганглии краба. С помощью дифференциального центрифугирования из гомогената ганглиев была выделена фракция плазматических мембран нервных клеток. Выход составил 25 мг мембранного белка из 1 г исходной нервной ткани.

Изучение рецепции α -латрокрустотоксина мембранами проводили в интервале значений pH 4,5–9,0. Буферы, имеющие значения pH 4,5–5,0, были получены на основе 20 мМ трис-ацетата, буферы с pH 5,5–6,5 — на основе 20 мМ трис-L-гистидина и буферы с pH 7,0–9,0 — на основе 20 мМ трис-HCl. Все буферы содержали 100 мМ NaCl.

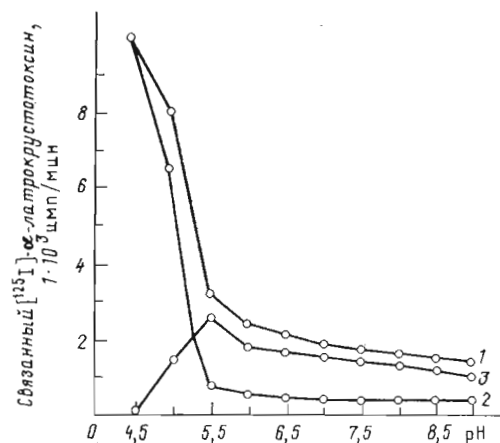


Рис. 1. Зависимость общего (1), неспецифического (2) и специфического связывания (3) $[^{125}\text{I}]$ - α -латрокрустотоксина мембранами нервной ткани краба от величины pH среды. Связывание осуществляли по стандартной методике (см. «Экспер. часть»), используя 300 мкг мембранного белка и 1 нМ меченый токсин; концентрация NaCl здесь 100 мМ

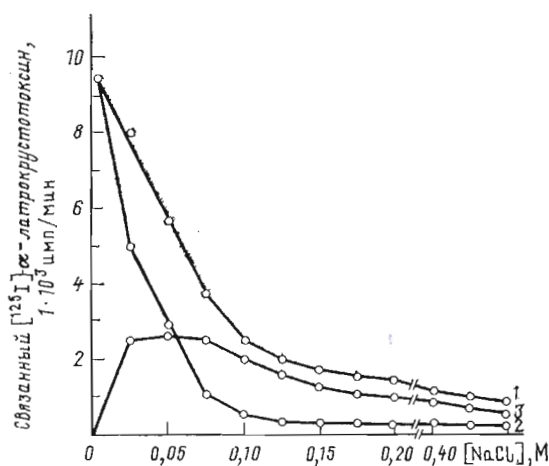


Рис. 2. Зависимость общего (1), неспецифического (2) и специфического связывания (3) $[^{125}\text{I}]$ - α -латрокрустотоксина мембранами нервной ткани краба от концентрации NaCl. В эксперименте использовали 25 мМ MES — NaOH-буфер, pH 6,4. Остальные условия см. подпись к рис. 1

Специфическая рецепция $[^{125}\text{I}]$ - α -латрокрустотоксина мембранами нервных клеток краба происходит в широком диапазоне значений pH (рис. 1) и имеет ту же зависимость от pH, что и в случае мембран нервных клеток рака [1]. При изменении величины pH с 9,0 до 5,5 наблюдается существенный рост общего и незначительный рост неспецифического связывания токсина. При pH < 5,5 резко возрастает как общее, так и неспецифическое связывание. Хотя при значениях pH 5,5—6,0 специфическое связывание токсина было наибольшим, все последующие эксперименты проводили при pH 6,4, поскольку в диапазоне значений pH 5,5—6,2 как общее, так и неспецифическое связывание $[^{125}\text{I}]$ - α -латрокрустотоксина мембранами характеризовалось меньшей стабильностью результатов, особенно при пониженных концентрациях NaCl в образце.

Следует отметить, что выбранное значение pH для рецепции α -латрокрустотоксина намного меньше оптимального значения pH 8,2, определенного для рецепции α -латротоксина (нейротоксина из того же яда каракурта, специфичного в отношении позвоночных) мембранами из мозга крыс и быка [3, 4].

Таблица 1

Влияние природы буфера на связывание ^{125}I - α -латрокрустотоксина мембранами нервной ткани краба

Буфер, мМ	Специфическое связывание токсина, % *	Отношение общего связывания к неспецифическому связыванию токсина
PIPES, 25	80	3,2
L-Гистидин, 25	90	2,8
MES, 25	100	3,3
Фосфат натрия, 10	95	2,3

* Связывание ^{125}I - α -латрокрустотоксина проводили в буфере (рН 6,4), содержащем 140 мМ NaCl и 1,5% бычий сывороточный альбумин.

Таблица 2

Влияние различных веществ на специфическое связывание ^{125}I - α -латрокрустотоксина мембранами нервной ткани краба

Вещество	Концентрация	Специфическое связывание токсина, % *
—	—	100
EDTA	2—5 мМ	100
CaCl ₂	2—5 »	120
ZnCl ₂	2—5 »	60
CoCl ₂	2—5 »	95
CdCl ₂	2—5 »	95
Лектин из зародышей пшеницы	0,5 мкМ	100
Лектин из семян чечевицы	0,5 »	100
α -Латроинсектотоксин	100 нМ	80
α -Латротоксин	100 »	80

* Связывание ^{125}I - α -латрокрустотоксина проводили в 25 мМ MES—NaOH-буфере, рН 6,4, содержащем 140 мМ NaCl и 1,5% бычий сывороточный альбумин.

Было также изучено влияние природы буфера на величину как общего, так и неспецифического связывания токсина при выбранном значении рН 6,4. С этой целью использовали MES, PIPES, L-гистидин в концентрации 25 мМ и фосфат натрия в концентрации 10 мМ (табл. 1). Исходя из полученных результатов, в дальнейших опытах в качестве буфера использовали 25 мМ MES—NaOH, рН 6,4.

Связывание ^{125}I - α -латрокрустотоксина значительно зависело от ионной силы среды (рис. 2). При концентрации соли $>0,15$ М специфическое связывание снижалось, а при <75 мМ резко увеличивалось неспецифическое связывание, особенно в диапазоне значений рН 5,5—6,2. Поэтому в последующих экспериментах связывание меченого токсина проводили при концентрации NaCl 0,14 М.

Данные по влиянию EDTA и ионов двухвалентных металлов на рецепцию ^{125}I - α -латрокрустотоксина (табл. 2) свидетельствуют, что EDTA в концентрации 5 мМ практически не изменяет величину специфического связывания, т. е. влияние EDTA на связывание α -латрокрустотоксина выражено менее значительно, чем на связывание α -латротоксина [4]. Ионы кальция в концентрации 2—5 мМ вызвали увеличение специфического связывания ^{125}I - α -латрокрустотоксина приблизительно на 15—20% по сравнению с контролем. Влияние кальция на связывание ^{125}I - α -латрокрустотоксина, как и в случае EDTA, менее выражено, чем на связывание α -латротоксина [4]. Ионы цинка в концентрации 2—5 мМ подавляли связывание, в то время как ионы кобальта и кадмия существенно не влияли на него.

Лектины из зародышей пшеницы и семян чечевицы в концентрации 0,5 мкМ не оказывали заметного воздействия на рецепцию ^{125}I - α -латрокрустотоксина. Эта особенность плазматических мембран нервных клеток краба принципиально отличается от случая ингибирующего действия лектинов на рецепцию α -латротоксина мембранами из мозга позвоночных [3—5].

Максимальное связывание ^{125}I - α -латрокрустотоксина полностью достигалось через 12—13 мин после начала инкубации (рис. 3). Для всех случаев связывания в равновесных условиях использовали инкубацию в течение 15 мин.

Зависимость связывания меченого токсина от его концентрации имеет вид кривой насыщения (рис. 4). Анализ полученной кривой в координатах

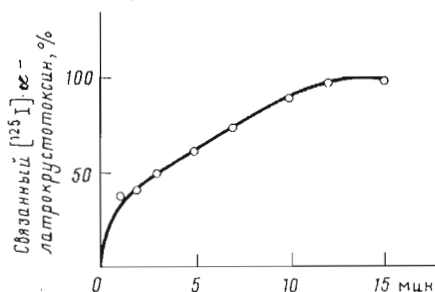


Рис. 3

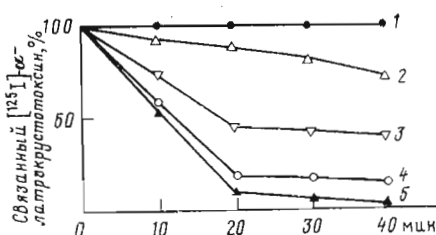


Рис. 5

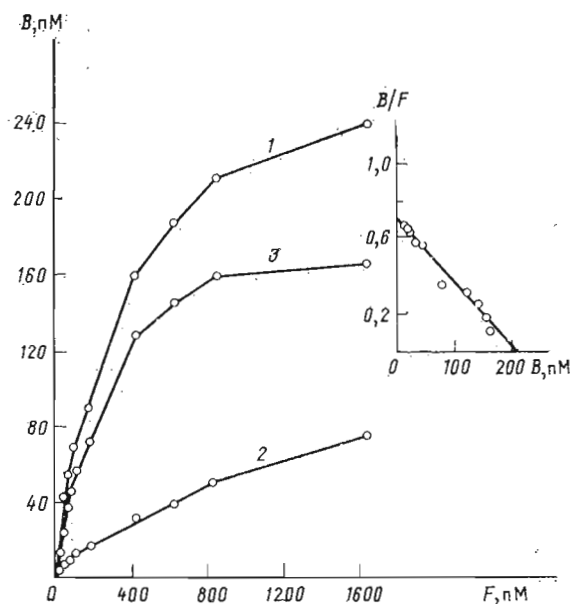


Рис. 4

Рис. 3. Зависимость специфического связывания $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-латрокрустотоксина}$ мембранами нервной ткани краба от времени инкубации. Связывание проводили в 25 мМ MES — NaOH-буфере, pH 6,4, содержащем 140 мМ NaCl, по стандартной методике (см. подпись к рис. 1)

Рис. 4. Зависимость общего (1), неспецифического (2) и специфического связывания (3) $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-латрокрустотоксина}$ мембранами нервной ткани краба от концентрации токсина. В эксперименте использовали по 800 мкг мембранного белка. Связывание проводили при 5° С в 25 мМ MES — NaOH-буфере, pH 6,4, содержащем 140 мМ NaCl и 1,5% бычий сывороточный альбумин. На врезке анализ связывания в координатах Скэтчарда. F — свободный $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-латрокрустотоксин}$, B — связанный

Рис. 5. Зависимость инактивации $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-латрокрустотоксинсвязывающей}$ активности мембран нервной ткани краба от температуры. В эксперименте использовали по 500 мкг мембранного белка. Предварительную инкубацию проводили при 5 (1), 20 (2), 36 (3), 50 (4) и 65° С (5). Связывание осуществляли при 5° С в 25 мМ MES — NaOH-буфере, pH 6,4, содержащем 140 мМ NaCl и 1,5% бычий сывороточный альбумин

Скэтчарда свидетельствует о существовании одного типа независимых участков связывания с константой диссоциации K_d , равной $3 \cdot 10^{-10}$ М. Плотность рецептора в мембранах нервных клеток краба составляет ~60 фмоль/мг мембранного белка. Уровень ингибирования специфического связывания немечеными $\alpha\text{-латроинсектотоксином}$ и $\alpha\text{-латротоксином}$ в концентрации 100 нМ составил не более 15—20% (табл. 2).

Предварительная инкубация мембран нервной ткани краба при повышенных температурах существенно подавляла рецепцию токсина (рис. 5). Даже предварительная инкубация мембран при 36° С в течение 20 мин заметно снижала рецепцию токсина. В свою очередь, предварительная

Рецепция [125 I]- α -латрокрустотоксина плазматическими мембранами из разных тканей краба

Источник мембран	Рецепция токсина, фмоль/мг белка *
Ганглии	60
Аксоны	7,2
Сердечная мышца	6,0
Мышцы ходильных ног	6,0

* Связывание [125 I]- α -латрокрустотоксина проводили в 25 мМ MES-NaOH-буфере, pH 6,4, содержащем 140 мМ NaCl и 1,5% бычий сывороточный альбумин.

инкубация мембран в течение 24 ч при 5° С снижала рецептирующую активность не более чем на 10—15%. Следовательно, рецептирующая активность мембран нервных клеток краба более чувствительна к повышению температуры, чем рецептирующая активность мембран мозга позвоночных [4]. Отчасти это объясняется тем, что крабы постоянно обитают в среде, где максимум температур не превышает 5—8° С.

[125 I]- α -Латрокрустотоксин образует с мембранным рецептором прочный, медленно диссоциирующий комплекс. При измерении кинетики диссоциации комплекса было найдено, что в течение 20 ч диссоциирует не более 35% связанного токсина.

Плотность рецепторов α -латрокрустотоксина максимальна в случае мембран из нервной ткани ганглиев (табл. 3). Плазматические мембраны других электровозбудимых тканей содержат гораздо меньшее количество рецепторов токсина, что может быть связано с меньшим количеством синаптических контактов, расположенных на клетках этих тканей.

Полученные нами результаты свидетельствуют о высокой специфичности рецепции α -латрокрустотоксина белковым рецептором плазматических мембран нервных клеток краба. Они являются необходимой основой для проведения дальнейших исследований по солюбилизации рецептора и выделения его в индивидуальном виде.

Экспериментальная часть

Лиофилизированный яд паука *Latrodectus mactans tredecimguttatus* поставлялся Ашхабадским зоокомбинатом. В работе использовали MES, PIPES (Sigma, США), EDTA, *L*-гистидин (Serva, ФРГ), неорганические соли производства СССР квалификации ос.ч., х.ч., ч.д.а.

Выделение α -латрокрустотоксина из яда паука каракурта проводили как описано ранее [6].

Радиоактивное мечение токсина осуществляли с помощью реактива Болтона — Хантера, содержащего изотоп 125 I (Amersham, Англия) согласно методике [7]. Для очистки меченого токсина использовали гель-хроматографию на колонках PD-2 (Pharmacia, Швеция) с 2 мл Bio-Gel P-6 (Bio-Rad, США). Используемый для хроматографии 100 мМ натрий-боратный буфер, pH 8,2, содержал 0,5% желатина для уменьшения неспецифической сорбции токсина на матриксе геля. Радиохимическая чистота полученного образца токсина, определенная с помощью осаждения белка 7,2% трихлоруксусной кислотой, составила ~98%. Доля активно меченого токсина, извлекаемая из раствора избытком плазматических мембран, составляет ~20%. Удельная радиоактивность препарата достигала 200 Ки/моль.

Выделение плазматических мембран. Для препарирования подглоточных ганглиев использовали живых крабов. Из каждых 25—30 особей весом 2,5—3 кг в возрасте 7—10 лет выделяли 15—18 г нервной ткани. Выделенную нервную ткань сразу же замораживали с помощью сухого

льда и в таком виде транспортировали к месту использования. Замороженную нервную ткань хранили при -70°C . Для выделения плазматических мембран нервную ткань гомогенизировали с помощью ножевого гомогенизатора Уоринга (Cole Parmer, США) в 10 объемах буфера 20 mM MES — NaOH, pH 6,0. Гомогенат центрифугировали 1 мин при 2000 g для удаления волокнистых соединительно-тканых структур. Плазматические мембраны осаждали центрифугированием полученного супернатанта при 50 000 g в течение 30 мин.

Анализ связывания меченого α -латрокрустотоксина плазматическими мембранами. Опыты по равновесному связыванию токсина проводили при комнатной температуре. К суспензии мембран, содержащей 0,3—0,5 мг мембранного белка в 250 мкл буфера, добавляли меченый токсин до конечной концентрации 0,5—2 нМ. Для определения неспецифического связывания в контрольные образцы одновременно с меченым токсином вводили немеченый в 50-кратном избытке. Для уменьшения неспецифического связывания во всех образцах присутствовал бычий сывороточный альбумин в концентрации 1,5%. Образцы инкубировали 15 мин при комнатной температуре и затем центрифугировали 10 мин в центрифуге модели 5413 (Errendorf, ФРГ). Супернатант отсасывали. Радиоактивность осадка измеряли в сцинтилляционном счетчике LS-7800 (Beckman, США) с использованием вкладышей для γ -счета (Koch-Light, Англия).

Измерение концентрации белка проводили на основе метода Бредфорд [8] с использованием готового реактива (Bio-Rad, США).

Авторы выражают искреннюю признательность капитану-директору Петропавловской базы Рыбхолодфлота п/о Камчатрыбпром Р. Н. Нигматуллину за помощь в организации добычи нервной ткани крабов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Красноперов В. Г., Шамотиенко О. Г., Гришин Е. В. // Биоорг. химия. 1991. Т. 17. № 5. С. 716—718.
2. Petrenko A. G., Kovalenko V. A., Shamotienko O. G., Surkova I. N., Tarasyuk T. A., Ushkaryov Yu. A., Grishin E. V. // EMBO J. 1990. V. 9. № 6. P. 2023—2027.
3. Ушкарев Ю. А., Гришин Е. В. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 1. С. 71—80.
4. Петренко А. Г., Шамотиенко О. Г., Суркова И. Н., Коваленко В. А., Гришин Е. В. // Биоорг. химия. 1990. Т. 16. № 2. С. 149—157.
5. Rubin L. L., Gorio A., Mauro A. // Brain Res. 1978. V. 143. № 1. P. 107—124.
6. Красноперов В. Г., Шамотиенко О. Г., Гришин Е. В. // Биоорг. химия. 1990. Т. 16. № 11. С. 1567—1569.
7. Bolton A. E., Hunter W. M. // Biochem. J. 1973. V. 133. № 3. P. 529—539.
8. Bradford M. M. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. № 1. P. 248—254.

Поступила в редакцию
14.II.1991

После доработки
1.IV.1991

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

CHARACTERIZATION OF THE MEMBRANE-BOUND RECEPTOR FOR α -LATROCRUSTATOXIN FROM THE NERVE TISSUE OF THE *PARALITHODES CAMTSHATICA* CRAB

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

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

Iodine-125 labelled α -latrocrustatoxin, a crustacea-specific presynaptic neurotoxin from the venom of black widow spider *Latrodectus mactans tredecimguttatus*, binds specifically to the plasmatic membranes from the ganglia nerve tissue of the *Paralithodes camtshatica* crab with $K_d = 3 \cdot 10^{-10}$ M. Density of binding sites is 60 fmoles bound toxin/mg membrane protein. The optimal pH value for the toxin specific binding to the receptor is 6.4. The binding increases by 20% in the presence of 2—5 mM calcium ions. Sodium chloride in over 0.075 M concentration inhibits the toxin binding. Wheat germ agglutinin and lentil-lectin do not affect the toxin reception. The toxin-binding activity of the nerve cell membranes is inhibited by elevated temperatures.