



УДК 577.175.82

**ФРАГМЕНТЫ 183 - 198 И 125 - 145  $\alpha$ -СУБЪЕДИНИЦЫ  
НИКОТИНОВОГО АЦЕТИЛХОЛИНОВОГО РЕЦЕПТОРА  
*Torpedo californica* СВЯЗЫВАЮТ  $\alpha$ -БУНГАРОТОКСИН  
И НЕЙРОТОКСИН II *Naja naja oxiana***© 1995 г. О. Клукас, И. А. Пешенко\*, И. Л. Родионов\*, О. В. Телякова,  
Ю. Н. Уткин, В. И. Цетлин

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

\*Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино

Поступило в редакцию 08.07.94 г.

Ключевые слова: ацетилхолиновый рецептор, фрагменты  $\alpha$ -субъединицы, нейротоксины, связывание.

Никотиновый ацетилхолиновый рецептор в настоящее время – один из наиболее исследованных рецепторных белков, чему в немалой степени способствовало наличие таких высокоспецифичных и эффективных лигандов, как нейротоксины змей. Однако, несмотря на широкое использование нейротоксинов для исследования рецептора, механизм их взаимодействия с этим белком до сих пор не совсем ясен. Так, известно, что изолированная  $\alpha$ -субъединица ацетилхолинового рецептора обладает способностью связывать нейротоксины, хотя и с меньшим сродством, чем природный рецептор [1]. Токсинсвязывающие свойства обнаружены также у синтетических пептидов, отвечающих различным участкам  $\alpha$ -субъединицы. В зависимости от природы использованного нейротоксина и метода тестирования обнаружено связывание со следующими фрагментами  $\alpha$ -субъединицы ацетилхолинового рецептора: 1 - 16 [2, 3], 23 - 60 [2, 3], 55 - 74 [4, 5], 122 - 150 [2, 3] и 180 - 200 [2 - 4, 6 - 7].

Большинство исследователей сходится во мнении, что основной участок связывания токсинов расположен в области 180 - 200, а наиболее противоречивая информация получена об участке 122 - 150. Так, Атасси и сотр. [3] считают, что именно область  $\alpha$ 122 - 138 образует главный токсинсвязывающий домен, однако другие авторы не смогли обнаружить взаимодействия  $\alpha$ -бунгаротоксина с этой областью  $\alpha$ -субъединицы [8 - 10]. Следует отметить, что в большинстве перечисленных работ использовали именно  $\alpha$ -бунгаротоксин, принадлежащий к группе постсинаптических нейротоксинов так называемого длинного типа (см. классификацию нейротоксинов в [11]).

Адрес для корреспонденции: 117871, ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ИБХ РАН, Ю.Н. Уткину.

Поскольку в проводимых в нашем институте исследованиях пространственной структуры нейротоксинов [12, 13] и топографии их взаимодействия с нативным ацетилхолиновым рецептором (совместная работа с проф. Ф. Хухо, Свободный университет Берлина) [14] основным объектом является нейротоксин II *Naja naja oxiana*, т.е. нейротоксин короткого типа, целью данной работы стала проверка его способности связываться с фрагментами  $\alpha$ -субъединицы рецептора. В этой же серии опытов параллельно проводился анализ связывания  $\alpha$ -бунгаротоксина.

Для исследования использовали синтетические пептиды, соответствующие фрагментам 186 - 198 и 183 - 198, из области  $\alpha$ 180 - 200, а также фрагмент 125 - 145 из области  $\alpha$ 122 - 150. Пептиды синтезировали твердофазным методом (Fmoc/tBu-стратегия) на смоле Ванга (0.54 мг-экв. гидроксильных групп/г смолы, 1% сшивки, Vega, USA), все конденсации осуществляли методом активированных (пентафторфениловых) эфиров в присутствии гидроксibenзотриазола [15] в проточном реакторе с использованием свеллографического мониторинга [16, 17]. После отщепления от смолы и одновременного деблокирования [15] продукты хроматографировали на сефадексе G-10. По данным аминокислотного анализа и обращенно-фазовой хроматографии, содержание целевых пептидов в образцах составляло 80 - 98%. Все пептиды содержали ацетамидометильную группу на остатках Cys. Такой выбор связан с противоречивостью данных о роли дисульфидной связи между остатками Cys192 и Cys193 в связывании нейротоксинов [3, 8 - 9, 18] и с тем, что при использовании соответствующих пептидов со свободными SH-группами состояние их окисления не контролировалось.

Для связывания использованы моно[ $^{125}\text{I}$ ]йодированные производные  $\alpha$ -бунгаротоксина и нейротоксина II, полученные хлораминовым методом. Йодирование  $\alpha$ -бунгаротоксина проводили в модифицированных условиях работы [19], используя двукратный молярный избыток  $\text{K}[^{125}\text{I}]$  и хлорамина Т и увеличив время реакции до 5 мин. Нейротоксин II йодировали в условиях работы [14] с последующей очисткой производных методом ионообменной ВЭЖХ (колонка НЕМА ВЮ 1000СМ, Tessek Ltd., Чехия). Следует отметить, что при разделении производных, полученных в результате йодирования препаратов  $\alpha$ -бунгаротоксина, приобретенных у различных фирм (Serva и Sigma), мы обнаружили существенные различия в хроматографических профилях. Хроматография немодифицированных токсинов (рис. 1) показала, что  $\alpha$ -бунгаротоксин фирмы Sigma содержит два компонента почти в равных количествах, а в  $\alpha$ -бунгаротоксине фирмы Serva один из компонентов является преобладающим (наличие нескольких полипептидных компонентов в коммерческих препаратах токсина наблюдалось нами ранее [20]). Анализ полученных фракций методом масс-спектрологии показал, что выделенные нами две фракции различаются по массе на 28 единиц, что соответствует двум метиленовым группам. Полученная разница может быть объяснена наличием в препарате двух изоформ с заменой  $\text{Ala} \rightarrow \text{Val}$ . Вариант  $\alpha$ -бунгаротоксина, содержащий в положении 31 Val вместо Ala, был ранее отделен от препарата с помощью ионообменной хроматографии на Mono-S (Pharmacia) [21], при этом обе формы токсина с одинаковым сродством связывались с ацетилхолиновым рецептором. Учитывая эти данные, мы использовали для связывания с пептидами обе изоформы  $\alpha$ -бунгаротоксина.

Пептиды иммобилизовали на гибких титровальных планшетах (96-well P.E.T.G. assay plates фирмы Costar). Раствор пептида в 50% водном ацетонитриле вносили в лунку планшета (3 нмоль в лунку) и высушивали в термостате при  $45^\circ\text{C}$ . После этого для блокирования неспецифических мест связывания инкубировали с 2% бычьим сывороточным альбумином и затем добавляли радиоактивный токсин. После 2 ч инкубации при комнатной температуре токсин удаляли, промывали лунки фосфатно-солевым буфером, разрезали планшет и определяли количество связанного радиоактивного токсина, используя  $\gamma$ -счетчик Compugamma 1282 (LKB, Швеция). Для учета неспецифического связывания пептиды инкубировали с радиоактивными производными токсинов в присутствии избытка немодифицированных токсинов. На рис. 2 в качестве примера представлены кривые связывания  $\alpha$ -бунгаротоксина и нейротоксина II с пептидом  $\alpha 186 - 198$ . Аналогичные кривые получены и для двух других исследо-

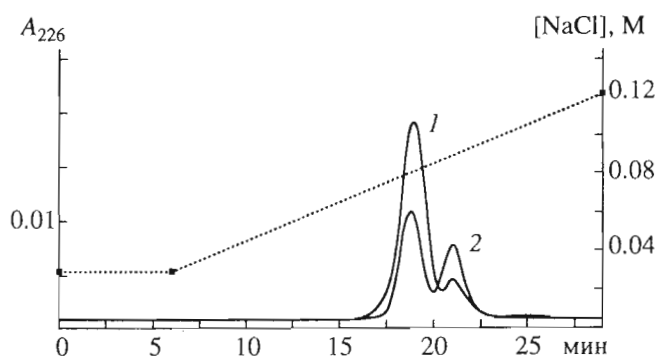


Рис. 1. Ионообменная хроматография  $\alpha$ -бунгаротоксина фирм Serva (1) и Sigma (2) на колонке НЕМА-ВЮ 1000 СМ ( $4 \times 250$  мм) в градиенте концентрации  $\text{NaCl}$  в 5 мМ натрий-фосфатном буфере (pH 7.4). Скорость элюции 0.5 мл/мин.

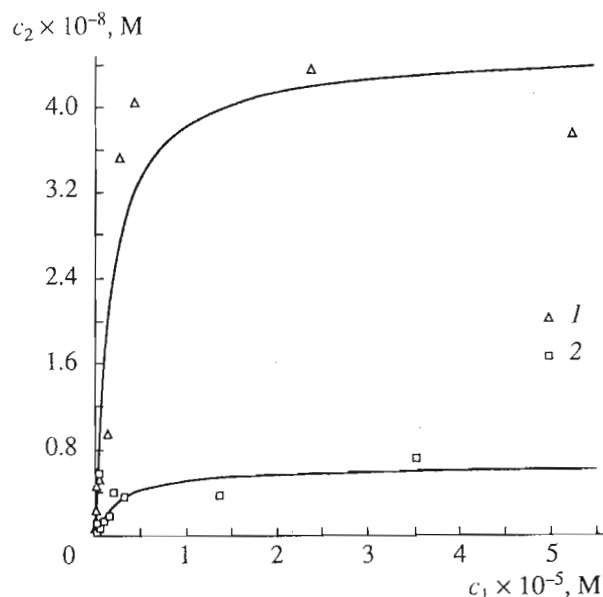


Рис. 2. Кривые связывания  $\alpha$ -бунгаротоксина (1) и нейротоксина II (2) с пептидом  $\alpha 186 - 198$ .  $c_1, c_2$  — концентрации добавленного и связанного токсинов соответственно.

ванных пептидов. Параметры связывания (таблица) определены с помощью анализа полученных кривых по программе Enzfitter (Biosoft).

Как видно из таблицы, оба токсина имеют довольно близкие константы диссоциации при взаимодействии с пептидами  $\alpha 186 - 198$  и  $\alpha 183 - 198$ , в то же время эффективность взаимодействия с пептидом  $\alpha 125 - 145$  для нейротоксина II примерно на порядок выше, чем для  $\alpha$ -бунгаротоксина. Таким образом, вывод, сделанный в работе [3] на основании использования других коротких нейротоксинов (эрабутоксин *b* и кобротоксин), о том, что короткие нейротоксины связываются исключительно с фрагментом 122 - 138, не является справедливым для всей подгруппы коротких

Связывание  $\alpha$ -бунгаротоксина (БТ) и нейротоксина II (НТ) с фрагментами  $\alpha$ -субъединицы ацетилхолинового рецептора (приведена  $K_d$ , мкМ)

Пептид	БТ	НТ
GWKHNWVYUCCPDTPY (183 - 198)	$1.8 \pm 0.8$	$2.7 \pm 1.3$
HWVYUCCPDTPY (186 - 198)	$1.3 \pm 0.6$	$0.5 \pm 0.4$
KSYCEPVTHFPFDQQNCTMK (125 - 145)	$60.3 \pm 6.1$	$4.9 \pm 1.2$

нейротоксинов. Возможно, так же как и при взаимодействии с интактным мембранным рецептором, эффективность взаимодействия с фрагментами  $\alpha$ -субъединицы зависит не только от принадлежности токсина к той или иной подгруппе, но и от индивидуальных свойств данного нейротоксина.

Следует отметить, что наличие ацетамидомильной группы на остатках Cys не приводит к потере токсинсвязывающей активности в исследованных пептидах и, следовательно, дисульфидная связь в пептидах не является абсолютно необходимой для связывания.

Таким образом, полученные нами данные указывают на наличие различных участков связывания нейротоксинов на  $\alpha$ -субъединице ацетилхолинового рецептора и подтверждают принятую в настоящее время модель многоточечного взаимодействия токсинов с рецептором.

Данная работа\* – часть Международного проекта, выполняемого совместно с Институтом биохимии Свободного университета Берлина при поддержке Министерства науки, высшей школы и технической политики Российской Федерации и Федерального министерства научных исследований и технологий (ВМФТ) Германии. Авторы выражают благодарность П. Франке (Свободный университет Берлина) за съемку масс-спектров.

\* Когда статья находилась в печати, появилась работа [22], в которой исследовано взаимодействие различных нейротоксинов с пептидами из двух вышеуказанных областей  $\alpha$ -субъединицы. Наши результаты для нейротоксина II согласуются с результатами, полученными в [22] для гомологичного короткого  $\alpha$ -нейротоксина *Naja nigricollis*.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gershoni J.M., Hawrot E., Lenz T.L. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. № 16. P. 4973 - 4977.
2. Mulac-Jericevic B., Atassi M.Z. // Biochem. J. 1987. V. 248. № 2. P. 847 - 852.
3. Ruan K.-H., Bradley G.S., Atassi M.Z. // Biochem. J. 1991. V. 274. № 2. P. 849 - 854.
4. Conti-Tronconi B.M., Tang F., Diethelm B.M., Spenor S.R., Maelicke S., Maelicke A. // Biochemistry. 1990. V. 29. № 26. P. 6221 - 6230.
5. Wahlsten I.L., Lindstrom J.M., Conti-Tronconi B.M. // J. Rec. Res. 1993. V. 13. № 6. P. 989 - 1008.
6. Schlyer B.D., Maki A.H., Hawrot E. // FEBS Lett. 1992. V. 297. № 1 - 2. P. 87 - 90.
7. Takamori M., Okumura S., Nagata M., Yoshikawa H. // J. Neurol. Sci. 1988. V. 85. № 1. P. 121 - 129.
8. Griesmann G.E., McCormick D.J., De Aizpurua H.J., Lennon V.A. // J. Neurochem. 1990. V. 54. № 5. P. 1541 - 1547.
9. Ralston S., Sarin V., Thanh H.L., Rivier J., Fox L., Lindstrom J. // Biochemistry. 1987. V. 26. № 12. P. 3261 - 3266.
10. Wilson P.T., Hawrot E., Lenz T.L. // Mol. Pharmacol. 1988. V. 34. № 5. P. 643 - 645.
11. Endo T., Tanya N. // Snake Toxins / Ed. Harvey A.L. N.Y.: Pergamon Press, 1991. P. 165 - 222.
12. Tsetlin V.I. // Peptides: Structure and Function; Proceedings of the Ninth American Peptide Symposium / Eds Deber C.M., Hruby V.J., Kopple K.D. Rockford: Pierce Chemical Company, 1985. P. 833 - 842.
13. Golovanov A.P., Lomize A.L., Arseniev A.S., Utkin Yu.N., Tsetlin V.I. // Eur. J. Biochem. 1993. V. 213. № 3. P. 1213 - 1223.
14. Kreienkamp H.-J., Utkin Yu.N., Weise C., Machold J., Tsetlin V.I., Hucho F. // Biochemistry. 1992. V. 31. № 35. P. 8239 - 8244.
15. Atherton E., Sheppard R.C. Solid Phase Peptide Synthesis. A Practical Approach. Oxford: IRL Press, 1989.
16. Rodionov I.L., Baru M.B., Ivanov V.T. // Peptide Res. 1992. V. 5. № 2. P. 119 - 125.
17. Baru M.B., Peshenko I.A., Rodionova L.N., Rodionov I.L. // Peptide Chemistry 1992; Proceedings of the 2nd Japan Symposium on Peptide Chemistry / Ed. Yanaihara N. Leiden: ESCOM, 1993. P. 116 - 118.
18. Tzartos S.J., Remoundos M.S. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. № 35. P. 21462 - 21467.
19. Wang G.K., Schmidt J. // J. Biol. Chem. 1980. V. 255. № 23. P. 11156 - 11162.
20. Уткин Ю.Н., Кашеверов И.Е., Цетлин В.И. // Биоорг. химия. 1992. Т. 18. № 5. С. 635 - 639.
21. Kosen P.A., Finer-Moore J., McCarthy M.P., Basus V.J. // Biochemistry. 1988. V. 27. № 8. P. 2775 - 2781.
22. Fulachier M.-H., Mourier G., Cotton J., Servent D., Menez A. // FEBS Lett. 1994. V. 338. № 3. P. 331 - 338.

# Fragments 183 - 196 and 125 - 145 of the $\alpha$ -Subunit of the Nicotinic Acetylcholine Receptor from *Torpedo californica* Bind $\alpha$ -Bungarotoxin and Neurotoxin in *Naja naja oxiana*

O. Klukas, I. A. Peshenko\*, I. L. Rodionov\*, O. V. Telyakova, Yu. N. Utkin, and V. I. Tsetlin

*Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow;*

*\*Branch of the Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Pushchino*

**Abstract** – Interaction of the mono[<sup>125</sup>I]iodinated  $\alpha$ -bungarotoxin and neurotoxin II *Naja naja oxiana* with the synthetic peptides corresponding to the fragments of the  $\alpha$ -subunit of nicotinic acetylcholine receptor from *Torpedo californica* was studied. It was found that both toxins bind to the fragments  $\alpha$ 186 - 198,  $\alpha$ 183 - 198 and  $\alpha$ 125 - 145 adsorbed to the 96-well P.E.T.G. assay plates (COSTAR). Acm-groups on Cys residues did not prevent toxin binding by the peptides studied. Determination of the binding parameters showed that  $\alpha$ -bungarotoxin interacts with fragment  $\alpha$ 125 - 145 less effectively than neurotoxin II. The data obtained demonstrate the presence of different toxin-binding sites on  $\alpha$ -subunit and confirm the model of multipoint neurotoxin-receptor interaction.

*Key words: acetylcholine receptor,  $\alpha$ -subunit fragments, neurotoxin, binding.*

Address for correspondence: Dr. Yu. Utkin, Institute of Bioorganic Chemistry Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya, 16/10, 117871 GSP Moscow V-437, Russia.