



УДК 577.175.82.088

**ЭФФЕКТИВНОЕ СВЯЗЫВАНИЕ α -БУНГАРОТОКСИНА
СОЛЮБИЛИЗИРОВАННОЙ α -СУБЪЕДИНИЦЕЙ
АЦЕТИЛХОЛИНОВОГО РЕЦЕПТОРА *Torpedo californica***© 1996 г. Ю. Н. Уткин[#], М. Мунд*, Ф. Хухо*, В. И. ЦетлинИнститут биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

* Институт биохимии Свободного университета Берлина

Поступило в редакцию 21.12.95 г.

С использованием препаративного электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия и последующей обращенно-фазовой ВЭЖХ на С4-колонке в градиенте смеси изопропанол – ацетонитрил в воде выделена α -субъединица никотинового ацетилхолинового рецептора *Torpedo californica*. После удаления органических растворителей и солюбилизации в 1% β -октилглюкозиде выделенная субъединица с высоким сродством (K_d 28 нМ) связывает α -бунгаротоксин.

Ключевые слова: ацетилхолиновый рецептор, α -субъединица, выделение, связывание α -бунгаротоксина.

Никотиновый ацетилхолиновый рецептор (АХР) из электрического органа ската *Torpedo californica* является наиболее всесторонне исследованным нейрорецептором (см. обзоры [1–3]). Этот рецептор принадлежит к семейству лиганд-управляемых ионных каналов. Кроме АХР *Torpedo* и мышц млекопитающих, имеющих субъединичный состав $\alpha_2\beta\gamma\delta$ (или $\alpha_2\beta\epsilon\delta$ у взрослых млекопитающих), к этому семейству относятся также нейрональные АХР, построенные из различных комбинаций α_2 – α_9 - и β_2 – β_4 -субъединиц [4].

Для многих биохимических и физико-химических исследований необходимо иметь в солюбилизированном виде отдельные субъединицы АХР. При использовании для этих целей электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) всегда встает проблема максимального удаления SDS с помощью диализа без потери субъединиц в виде осадка. В настоящей работе мы после электрофореза применяли для выделения и очистки субъединиц АХР *Torpedo* офВЭЖХ на колонке С4, использованную ранее Фаренгольцем и сотр. [5] для мономерного рецептора, а именно вазопрессинового V_2 -рецептора. В качестве контроля за регенерацией функциональных свойств выделенных бел-

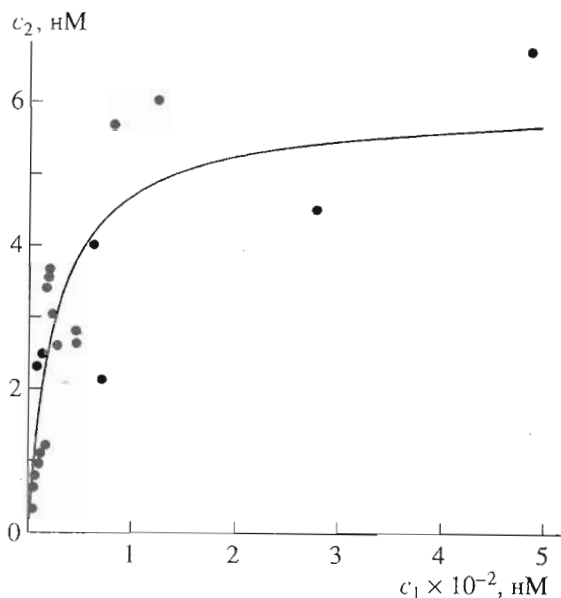
ков мы анализировали их способность связывать α -бунгаротоксин (с использованием [¹²⁵I]иодированного токсина).

Мембраны, обогащенные АХР, выделяли из электрического органа ската *Torpedo californica*, как описано в работе [6], а затем подвергали препаративному SDS-PAGE по методике [7] с использованием прибора Bio-Rad (США) для непрерывного элюирования фракций. Фракции, соответствующие α -субъединице, непосредственно в элюирующем буфере (0.025 M Tris; 0.192 M Gly; 0.1% SDS) наносили на колонку Deltapak C4 (3.9 × 150 мм) (Waters), а затем проводили элюцию белка в линейном градиенте от 2 до 90% смеси ацетонитрил – изопропанол (2 : 1) в воде (в присутствии 0.1% трифторуксусной кислоты). Фракции, отвечающие очищенной α -субъединице (контроль с помощью аналитического SDS-PAGE), объединяли, нейтрализовали, добавляли β -октилглюкозид до его конечной концентрации 1% и удаляли органические растворители в вакууме.

Рисунок показывает, что выделяемая таким образом α -субъединица, солюбилизированная в 1% β -октилглюкозиде, с высокой эффективностью связывает [¹²⁵I]иодированный бунгаротоксин: K_d 28 ± 8 нМ, B_{max} 0.5 ± 0.06 нмоль/мг белка. Полученная величина K_d (метод DEAE-фильтров [8]) всего лишь на порядок превышает соответствующую характеристику для олигомерного АХР

Использованные сокращения: АХР – никотиновый ацетилхолиновый рецептор, PAGE – электрофорез в полиакриламидном геле.

[#] Автор для переписки.



Связывание ^{125}I -меченого α -бунгаротоксина с солюбилизированной в 1% β -октилглюкозиде α -субъединицей *Torpedo californica*. Приведены данные трех независимых опытов, каждая точка отвечает двум параллельным измерениям в каждом опыте. c_1 , c_2 – концентрации добавленного и связанного токсина соответственно. Кривая построена с использованием программы Enzfitter (Biosoft).

(K_d 2.7 ± 0.3 нМ), определяемую нами в опытах, проводившихся параллельно.

Следует отметить, что K_d комплекса бунгаротоксина с α -субъединицей, выделенной методом SDS-PAGE и перенесенной с помощью блоттинга на нейлоновые или нитроцеллюлозные фильтры [9, 10], с α -субъединицей, экспрессированной в различных системах [11], с белковыми конструкциями, включающими фрагменты экстрацеллюлярного домена α -субъединицы [12] или с синтетическими пептидами из области, отвечающей последовательности примерно 180–200 этого домена [13, 14], на 2–3 порядка выше, чем для комплекса бунгаротоксина с интактным олигомерным АХР. Несколько лучшие результаты были получены для α -субъединицы, солюбилизированной в присутствии 0.02% SDS [15] или 0.5% холата натрия [16]. Однако, во-первых, высокоаффинное связывание в работах [15, 16] наблюдалось только для наномолярных концентраций солюбилизированной α -субъединицы (в наших опытах эта концентрация составляла около 0.1 мкМ). Во-вторых, в этих работах не удавалось получить α -субъединицу, обладающую бунгаротоксинсвязывающей активностью, если рецептор восстанавливали перед SDS-PAGE [16]. В наших же опытах для денатурации использовался буфер, содержащий 5% β -меркаптоэтанол, однако при этом была полу-

чена α -субъединица, эффективно связывающая токсин.

Следует отметить также, что до сих пор остается нерешенной проблема получения препаратов ренатурированной субъединицы, в которых бы весь белок обладал токсинсвязывающей активностью. Количество активного белка в различных препаратах колеблется от 1% [12] (или даже менее) до 20% [16]. К настоящему моменту в полученных нами препаратах лишь несколько процентов белка находится в активной форме, однако исследования в этом направлении продолжаются, и мы надеемся существенно увеличить эту цифру.

Таким образом, описанная процедура позволяет получать солюбилизованную α -субъединицу АХР в частично ренатурированном виде (о чем свидетельствует связывание бунгаротоксина) и в концентрациях, которые делают возможными физико-химические исследования.

Авторы выражают благодарность Г. Бандини и Г. Баеру за техническую помощь. Работа поддерживалась DFG (SFB 12 и совместный грант DFG и РАН), Fonds der chemischen Industrie и Министерством науки России.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Galzi J.-L., Changeaux J.-P. // *Curr. Opinions Struct. Biol.* 1994. V. 4. P. 554–565.
2. Karlin A. // *Curr. Opinions Neurobiol.* 1993. V. 3. P. 299–309.
3. Hucho F. // *Neurotransmitter Receptors* / Ed. F. Hucho. Amsterdam, London, New York, Tokyo: Elsevier, 1993. P. 113–135.
4. Sargent P.B. // *Ann. Rev. Neurosci.* 1993. V. 16. P. 403–443.
5. Kojro E., Eich P., Gimpl G., Fahrenholz F. // *Biochemistry*. 1993. V. 32. P. 13537–13544.
6. Schiebler W., Lauffer L., Hucho F. // *FEBS Lett.* 1977. V. 81. P. 39–41.
7. Machold J., Utkin Yu., Kirsch D., Kaufmann R., Tsetlin V.I., Hucho F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995. V. 92. P. 7282–7286.
8. Blanchard S.G., Quast U., Reed K., Lee T., Schimerlik M.I., Vandlen R., Claudio T., Strader C.D., Moore H.-P.H., Raftery M.A. // *Biochemistry*. 1979. V. 18. P. 1875–1883.
9. Gershoni J.M., Hawrot E., Lentz T.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1983. V. 80. P. 4973–4977.
10. Oblas B., Boyd N.D., Singer R.H. // *Anal. Biochem.* 1983. V. 130. P. 1–8.

11. Fujita N., Nelson N., Fox T.D., Claudio T., Lindstrom J., Riezman H., Hess G.P. // *Science*. 1986. V. 231. P. 1284–1287.
12. Barkas T., Mauron A., Roth B., Alloid C., Tzartos S.J., Ballivet M. // *Science*. 1987. V. 235. P. 77–80.
13. Wilson P.T., Lentz T.L. // *Biochemistry*. 1988. V. 27. P. 6667–6674.
14. Conti-Tronconi B.M., Tang F., Diethelm B.M., Spencer S.R., Reinhardt-Maelicke S., Maelicke A. // *Biochemistry*. 1990. V. 29. P. 6221–6230.
15. Tzartos S.J., Changeux J.-P. // *EMBO J.* 1983. V. 2. P. 381–387.
16. Tzartos S.J., Changeux J.-P. // *J. Biol. Chem.* 1984. V. 259. P. 11512–11519.

Efficient Binding of α -Bungarotoxin by a Solubilized α -Subunit of the *Torpedo californica* Acetylcholine Receptor

Yu. N. Utkin*,¹ M. Mund**, F. Hucho**, and V. I. Tsetlin*

* Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, GSP-7, 117871 Russia

** Institute of Biochemistry, Free University of Berlin, Berlin, Germany

Abstract— α -Subunit of the *Torpedo californica* nicotinic acetylcholine receptor was isolated by preparative SDS-PAGE followed by reversed-phase HPLC on a C4 column in an acetonitrile–isopropanol gradient in water. After removal of the organic solvents and solubilization in β -octylglucoside, the purified α -subunit binds α -bungarotoxin with high affinity (K_d 28 nM).

Key words: acetylcholine receptor, α -subunit, isolation, α -bungarotoxin binding.

¹ To whom correspondence should be addressed.