



УДК 577.112.012:543.422

## ВТОРИЧНАЯ СТРУКТУРА ФРАГМЕНТОВ $\alpha$ -СУБЪЕДИНИЦЫ АЦЕТИЛХОЛИНОВОГО РЕЦЕПТОРА *Torpedo californica*

© 1998 г. А. В. Кривошеин, И. А. Куделина, Т. А. Алексеев,  
А. Ф. Шевалье, Ю. Н. Уткин, В. И. Цетлин<sup>#</sup>

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступило в редакцию 29.07.98 г. Принято к печати 21.08.98 г.

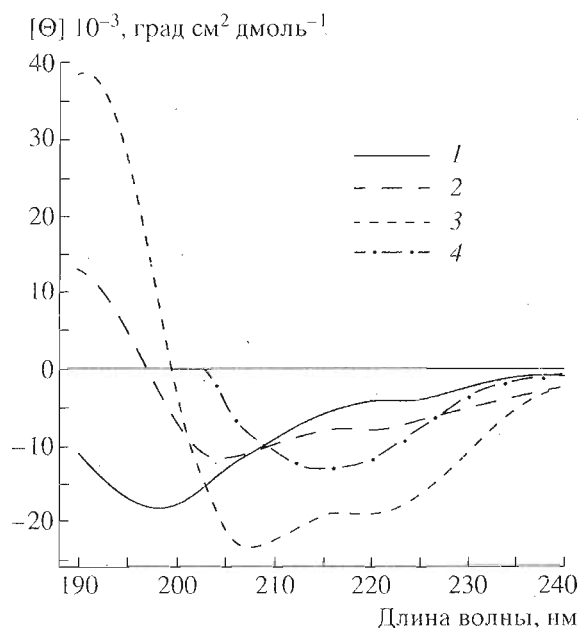
Получены спектры КД в водной среде и в присутствии трифторэтанола для полипептидов, соответствующих *N*-концевому домену, а также трансмембранным фрагментам М2 и М3  $\alpha$ -субъединицы никотинового ацетилхолинового рецептора *Torpedo californica*. Обнаруженное преобладание  $\beta$ -структуры для *N*-концевого домена и  $\alpha$ -спиралей в М2 и М3 подтверждает представления о вторичной структуре, основанные на предсказательных алгоритмах и косвенных методах.

*Ключевые слова:* никотиновый ацетилхолиновый рецептор; фрагменты; круговой дихроизм; вторичная структура.

Никотиновый ацетилхолиновый рецептор (нАХР) является наиболее подробно охарактеризованным типом рецепторов нейромедиаторов [1]. Вторичная структура нАХР *Torpedo* изучалась спектральными методами (см. обзоры [1, 2]), однако данные о конформации функциональных доменов рецептора немногочисленны. В данной работе методом КД мы исследовали вторичную структуру: 1) рекомбинантного *N*-концевого домена  $\alpha$ -субъединицы нАХР *T. californica* (остатки 1-209), продуцированного в *E. coli*; 2) его синтетического фрагмента  $\alpha$ 125-145; 3) пептидов  $\alpha$ 236-267 и  $\alpha$ 277-301, включающих трансмембранные фрагменты М2 и М3, соответственно. Ранее аналогичные пептиды изучали методами КД- и ИК-спектроскопии [3–5], однако, например, в отличие от нашего пептида  $\alpha$ 125-145, в котором остатки Cys защищены Асм-группами, в работе [3] исследовали более короткий пептид 127-143 с замкнутой дисульфидной связью. Необходимость изучения структуры каналобразующих трансмембранных фрагментов диктуется тем, что до сих пор продолжают дебату о наличии в них, наряду с  $\alpha$ -спиралями, также и участков  $\beta$ -структуры.

Синтез пептидов  $\alpha$ 125-145 и  $\alpha$ 277-301 описан в работах [6] и [7], соответственно. Пептид  $\alpha$ 236-267, в котором остаток метионина-243 за-

менен на норлейцин, синтезирован Л.Д. Чикиным (ИБХ). Структура пептидов подтверждена MALDI-MS и аминокислотным анализом. Рекомбинантный белок, содержащий последовательность 1-209 всего *N*-концевого домена (MRS<sub>6</sub>PH<sub>6</sub>TDP-( $\alpha$ 1-209)-KLN), продуцировался в



Спектры КД в дальнем ультрафиолете фрагментов  $\alpha$ -субъединицы нАХР *T. californica*: 1 –  $\alpha$ 125-145 в 10 мМ фосфате Na, pH 8.0; 2 –  $\alpha$ 125-145 в 5 мМ фосфате Na, pH 8.0, с 50% TFE; 3 –  $\alpha$ 236-267 в TFE; 4 –  $\alpha$ 1-209 в 10 мМ фосфате Na, pH 7.3, с 1% CHAPS. Спектры регистрировались на спектрополяриметре Jasco J-500С.

Сокращения: нАХР – никотиновый ацетилхолиновый рецептор; Асм – ацетамидометил; CHAPS – диметил-3-(холамидопропил)аммоний-1-пропансульфонат; MALDI-MS – matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry; TFE – трифторэтанол.

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел./факс: (095) 335-57-33; e-mail: vits@ibch.siobc.ras.ru).

Вторичная структура фрагментов  $\alpha$ -субъединицы нАХР *T. californica* по данным спектроскопии КД

Фрагмент	Содержание вторичных структур, %*					
	по методу [8]			по методу [9]		
	$\alpha$	$\beta$	R	$\alpha$	$\beta$	R
$\alpha$ 125-145 в 10 мМ фосфате Na, pH 8.0	0	35	65	н. о.	н. о.	н. о.
$\alpha$ 125-145 в 5 мМ фосфате Na, pH 8.0, с 50% TFE	36	9	55	н. о.	н. о.	н. о.
$\alpha$ 236-267 в TFE	56	9	35	69	16	15
$\alpha$ 277-301 в TFE	44	18	38	57	24	19
$\alpha$ 1-209 в 10 мМ фосфате Na, pH 7.3, с 1% CHAPS	20	53	27	30	65	5
$\alpha$ 1-209 в 50% TFE/50% H <sub>2</sub> O	80	3	17	51	30	19

\* Расчеты содержания вторичных структур проводили по программе Dicroprot 2.4 с использованием базисных спектров Янга и др. [8] и по программе CONTIN [9]; н. о. – не определяли.

*E. coli* с помощью вектора pQE31 (Qiagen) (будет опубликовано отдельно). Индивидуальность белка была подтверждена электрофорезом в SDS-ПААГ и MALDI-MS; 20–26% молекул белка в препаратах связывали [<sup>125</sup>I]монойод- $\alpha$ -бунгаротоксин с  $K_d \sim 130$  нМ.

В спектре КД пептида  $\alpha$ 125-145 в водной среде (рисунок, кривая 1) дихроичная полоса в области 195–205 нм имеет отрицательный знак, что свидетельствует о преобладании в нем неупорядоченной структуры; низкая интенсивность этой полосы говорит также о наличии  $\beta$ -структуры (аналогичный вывод был сделан в работе [3] для пептида  $\alpha$ 127-143 с замкнутой дисульфидной связью). Добавление к раствору пептида нейротоксина II *Naja naja oxiana*, связывающегося с ним [6], не вызывает значимого возмущения спектра КД (спектры не приведены).

В 50% TFE у пептида  $\alpha$ 125-145 наблюдается заметная спирализация (кривая 2), однако в существенно меньшей степени, чем для  $\alpha$ 236-267 (кривая 3) и  $\alpha$ 277-301 в TFE или же для всего N-концевого домена в 50% TFE (для двух последних случаев кривые не приведены).

Пептид  $\alpha$ 236-267 в TFE содержит 56–69%  $\alpha$ -спирали (таблица), что соответствует  $\sim 18$  остаткам и согласуется с представлением о полностью  $\alpha$ -спиральной конформации внутримембранного сегмента M2 (остатки 243-261) (см. обзор [1]). В пептиде  $\alpha$ 277-301 (M3) в TFE также преобладает  $\alpha$ -спираль, хотя и в меньшей степени. По данным ЯМР [7] в смеси хлороформ–метанол, моделирующей мембранное окружение, 76% остатков пептида  $\alpha$ 277-301 включены в  $\alpha$ -спираль.

В белке  $\alpha$ 1-209 в водном буфере с цвиттер-ионным детергентом CHAPS преобладает  $\beta$ -структура (кривая 4 и таблица). Это неплохо согласуется с предсказаниями вторичной структуры для этого

участка нАХР *T. californica* [2, 10]. При переходе к 50% TFE заметно увеличивается содержание  $\alpha$ -спиральных участков. После нашего сообщения о получении белка  $\alpha$ 1-209 *T. californica* в культуре *E. coli* [11] были опубликованы данные КД в водном буфере [12] для аналогичного рекомбинантного домена  $\alpha$ -субъединицы нАХР мыши, полученного в клетках млекопитающих и содержащего 51%  $\beta$ -структуры, 12%  $\alpha$ -спирали и 37% остальных структур, что весьма близко к приведенным в таблице значениям. Таким образом, фрагмент  $\alpha$ 1-209, полученный в *E. coli*, обладает упорядоченной структурой и может служить в качестве удобной модели лигандсвязывающего домена нАХР.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 96-04-50375).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hucho F., Tsetlin V.I., Machold J. // Eur. J. Biochem. 1996. V. 239. P. 539–557.
2. Ortells M.O. // Proteins Struct. Funct. Genet. 1997. V. 29. P. 391–398.
3. Rickert K.W., Imperiali B. // Chemistry & Biology. 1995. V. 2. P. 751–759.
4. Donnelly-Roberts D.L., Lentz T.L. // Mol. Brain Res. 1993. V. 19. P. 55–61.
5. Corbin J., Methot N., Wang H.H., Buenziger J.E., Blanton M.P. // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. P. 771–777.
6. Клаукас О., Пешенко И.А., Родионов И.Л., Телякова О.В., Уткин Ю.Н., Цетлин В.И. // Биооргани. химия. 1995. Т. 21. С. 152–155.
7. Lugovskoy A.A., Maslennikov I.V., Utkin Yu.N., Tsetlin V.I., Cohen J.B., Arseniev A.S. // Eur. J. Biochem. 1998. V. 255. P. 455–461.

8. Yang J.T., Wu C.-S.C., Martinez H.M. // *Methods Enzymol.* 1986. V. 130. P. 208–269.
9. Provencher S.W., Glöckner J. // *Biochemistry.* 1981. V. 20. P. 33–37.
10. Finer-Moore J., Stroud R.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1984. V. 81. P. 155–159.
11. Tsetlin V., Shevalier A., Alexeev T., Telyakova O., Krivoshein A., Utkin Yu., Vincent A., Beeson D., Methfessel C. // *J. Neurochem.* 1997. V. 69. Suppl. S121A.
12. West A.P., Jr., Bjorkman P.J., Dougherty D.A., Lester H.A. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 25468–25473.

## The Secondary Structure of Some $\alpha$ -Subunit Fragments of *Torpedo californica* Acetylcholine Receptor

A. V. Krivoshein, I. A. Kudelina, T. A. Alexeev, A. F. Shevalier, Yu. N. Utkin, and V. I. Tsetlin<sup>#</sup>

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

The circular dichroism spectra of polypeptides that correspond to the *N*-terminal domain and transmembrane M2 and M3 fragments of the  $\alpha$ -subunit of nicotine acetylcholine receptor of *Torpedo californica* were measured in aqueous medium and in the presence of trifluoroethanol. The  $\beta$ -sheet for the *N*-terminal domain and the  $\alpha$ -helices for the M2 and M3 fragments were found to be their major structural elements. These results confirmed earlier ideas regarding the secondary structure of the domains based on predicting algorithms and indirect methods.

*Key words: nicotine acetylcholine receptor, fragments, circular dichroism, secondary structure*

---

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed; phone/fax: +7 (095) 335-5733; e-mail: vits@ibch.siobc.ras.ru.