



УДК 577.175.822'16: 577.112.6

ФОТОАКТИВИРУЕМЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ α -КОНОТОКСИНОВ GI И MI И ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С НИКОТИНОВЫМ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫМ РЕЦЕПТОРОМ

© 2002 г. И. Е. Кашевров[#], А. М. Рожкова, М. Н. Жмак, Ю. Н. Уткин, В. И. Цетлин

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

117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 24.05.2001 г. Принята к печати 28.05.2001 г.

Методом твердофазного пептидного синтеза получено два фотоактивируемых аналога α -конотоксина GI (GI), содержащие остаток бензоилфенилаланина (Bra) вместо His10 или Tyr11. Химической модификацией получены производные α -конотоксина MI (MI), несущие азидбензоильную (Ba) или бензоилбензоильную (Bb) фотометку, либо на N^α-аминогруппе Gly1, либо на N^ε-аминогруппе Lys10. Очистка всех полученных фотоактивируемых соединений проводилась методами ВЭЖХ, структура подтверждена MALDI-масс-спектрометрией, а локализация меток в производных α -конотоксина MI осуществлена трипсинолизом с выделением и масс-спектрометрическим анализом триптических фрагментов. Все фотоактивируемые производные не отличались от природных α -конотоксинов по эффективности взаимодействия с никотиновым ацетилхолиновым рецептором (АХР) *Torpedo californica* – различия соответствующих констант ингибирования, полученных в одинаковых условиях, не превышали одного порядка. Из всех фотоаналогов получены [¹²⁵I]иодированные производные, которые сохранили способность связываться с АХР и были использованы для фотоиндуцированного мечения рецептора. Эффективность мечения субъединиц рецептора полученными соединениями зависит как от химической природы фотометки, так и от расположения ее в молекуле α -конотоксина.

Ключевые слова: α -конотоксины; фотоактивируемые производные; фотомечение; никотиновый ацетилхолиновый рецептор.

ВВЕДЕНИЕ

α -Конотоксины – группа пептидов, выделенных из яда морских улиток *Conus*. Большая часть известных к настоящему времени α -конотоксинов включает 12–18 а. о., две дисульфидные связи и укладывается в структуру $X_{1-3}C^1C^2X_{3-4}C^3X_{3,5-7}C^4$ (где С – цистеин, а верхний индекс при его символе – номер остатка в ряду четырех цистеинов молекулы; X – любые аминокислотные остатки, в подстрочном индексе указано их возможное число) [1]. Все они являются конкурентными антагонистами никотиновых ацетилхолиновых рецепторов, взаимодействуя в них с двумя участками связывания агонистов/конкурентных антагонистов. В отличие от α -нейротоксинов змей, α -конотоксины проявляют более высокую селективность как к различным типам АХР (нейрональным или мышечным), так и к рецепторам одного

типа разных видов животных [2]. При этом имеет место и заметное различие в сродстве к двум участкам связывания в молекуле АХР [2–5]. Это обстоятельство делает α -конотоксины эффективным инструментом изучения холинорецепторов. Они уже нашли широкое применение в исследовании пространственной организации лигандсвязывающих участков различных АХР, пока, в основном, с использованием генно-инженерных методов. Так, введением точечных мутаций в АХР мышечного типа были выявлены аминокислотные остатки α -субъединицы, участвующие во взаимодействии с α -конотоксином MI [6, 7], а также аминокислотные остатки γ - и δ -субъединиц, отвечающие за образование высоко- и низкоаффинного участков связывания на рецепторе (α/γ и α/δ) этого же конотоксина [7–10]. Положительными моментами для использования этой группы лигандов в изучении холинорецепторов также являются наличие данных ЯМР и рентгеноструктурного анализа о пространственной структуре α -конотоксинов (см., например, [11–14]) и относительная простота их химического синтеза [15, 16]. Последнее обстоятельство позволяет достаточно просто получать и различные аналоги α -коноток-

Сокращения: АХР – ацетилхолиновый рецептор; GI – α -конотоксин GI из *Conus geographus*; MI – α -конотоксин MI из *Conus magus*; Bra – бензоилфенилаланин; Ba – азидбензоил; Bb – бензоилбензоил; TFA – трифторуксусная кислота.

[#]Автор для переписки (тел./факс: (095) 330-73-74; эл. почта: iekash@ibch.ru).

синов [7, 17–20]. Удивительно, но в литературе описаны лишь единичные случаи синтеза фотоактивируемых производных α -конотоксинов [21], в отличие от синтеза низкомолекулярных лигандов АХР [10, 22–26] или α -нейротоксинов [27–29].

Чтобы восполнить этот пробел и оценить перспективность использования фотоактивируемых α -конотоксинов для изучения холинорецепторов, мы предприняли синтез аналогов двух гомологичных α -конотоксинов GI (GI) и MI (MI), блокирующих АХР из электрического органа *Torpedo* и мышц млекопитающих. Учитывая возможность влияния модификаций сравнительно небольшой молекулы α -конотоксина на ее активность, нами опробовались два типа фотометок (арилазидная в виде азидобензоильной группы (Ba) и бензофеноновая либо в виде бензоилбензоильной группы (Bb), либо в виде остатка бензоилфенилаланина (Bra)), введенных в разные положения молекулы GI или MI.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Природные α -конотоксины GI и MI были получены в препаративных количествах твердофазным пептидным синтезом с использованием Fmoc-схемы с одновременным замыканием двух дисульфидных связей [20]. В качестве контрольных соединений служили препараты, предоставленные проф. С. Сакакибара, Peptide Institute Inc., Осака. Подробный синтез аналога GI, содержащего Bra вместо Tyr11 ([Bra¹¹]GI), описан в рабо-

те [30]. По такому же протоколу получен и другой аналог GI с Bra вместо His10 ([Bra¹⁰]GI). Структуры всех синтезированных конотоксинов подтверждены данными MALDI-масс-спектрометрии (табл. 1), а чистота – с помощью ВЭЖХ (рис. 1a).

Азидобензоильные и бензоилбензоильные производные α -конотоксина MI получали реакцией с *N*-гидроксисукцинимидными эфирами азидобензойной или бензоилбензойной кислоты соответственно. При этом для достижения оптимального выхода мономодифицированных производных бра-лось эквимолярное отношение α -конотоксина и соответствующего реагента.

Бензоилбензоильные производные удалось получить в индивидуальном виде одной стадией обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке Yudac C₁₈ (рис. 1б). Пики В и С на представленной хроматограмме по данным MALDI-масс-спектрометрии (MH^+ 1702.1 \pm 0.3) соответствовали моно-Bb-производным MI (пик А – немодифицированный пептид; два последних пика – продукты превращения модифицирующего реагента).

Для получения Ba-продуктов, перед нанесением на Yudac C₁₈ (из-за совместного элюирования ацилированных пептидов и продуктов превращения реагента) реакционную смесь пришлось предварительно обессолить на колонке с сефадексом G15 (данные не представлены). В этом случае также было выделено два индивидуальных пика с MH^+ 1612.6 \pm 0.2, что соответствует массе моно-Ba-производных (см. табл. 1).

Таблица 1. Структуры α -конотоксинов GI, MI и их фотоактивируемых аналогов

α -Конотоксин	Аминокислотная последовательность*	Молекулярная масса, MH^+	
		вычисленная	по данным MALDI
GI	E C C N P A C G R H Y S C	1438.6	1438.4
[Bra ¹⁰]GI	E C C N P A C G R B Y S C	1551.6	1551.6
[Bra ¹¹]GI	E C C N P A C G R H B S C	1525.6	1525.0
MI	G R C C H P A C G K N Y S C	1494.7	1494.4
Ba-MI	Ba-G R C C H P A C G K N Y S C	1639.8	
	Ba	1613.8**	1612.4
[K ¹⁰ (Ba)]MI	G R C C H P A C G K N Y S C	1639.8	
	Ba	1613.8**	1612.8
Bb-MI	Bb-G R C C H P A C G K N Y S C	1702.9	1702.4
	Bb		
[K ¹⁰ (Bb)]MI	G R C C H P A C G K N Y S C	1702.9	1701.8

* Все α -конотоксины имеют амидированный C-конец и дисульфидные связи Cys¹-Cys³ и Cys²-Cys⁴ (верхний индекс здесь – порядковый номер остатка цистеина в ряду четырех цистеинов молекулы); модифицированные или замененные аминокислотные остатки в аналогах, а также соответствующие им остатки в природных пептидах выделены жирным шрифтом; B – Bra.

** Рассчитано с учетом превращения азидобензоильной в аминокислотную группу во время MALDI-анализа [29].

Для определения положения фотоактивируемых групп в мономодифицированных соединениях их подвергали расщеплению трипсином. Реакцию проводили в присутствии достаточно больших количеств фермента (соотношение фермент-субстрат 1 : 5) при использовании производных с невосстановленными дисульфидными связями. При таких условиях должно было образовываться два фрагмента MI – Gly1–Arg2 и Cys3–Cys14 (с расщепленной пептидной связью Lys10–Asn11, в том случае, если Lys10 не модифицирован) (см. табл. 1). Триптические фрагменты разделялись обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке Vydac C₁₈. На рис. 2 представлены профили разделения продуктов трипсинолиза производных, соответствующих пикам С и В (см. рис. 1б). В качестве контроля использовался нативный MI (пик А на рис. 1б). MALDI-масс-спектрометрический анализ показал, что пик 1 (MH^+ 1298.2) соответствует немодифицированному фрагменту Cys3–Cys14; пик 3 (MH^+ 1488.4) – этому же фрагменту, содержащему Vb-группу; пик 2 (MH^+ 440.0) – Vb-глицил-аргину. Таким образом, пики В и С нами идентифицированы как Vb-аналоги MI с меткой на N^α-аминогруппе Gly1 (Vb-MI) и N^ε-аминогруппе Lys10 ([K¹⁰(Vb)]MI) соответственно.

В случае триптического гидролиза двух моно-Va-производных MI нами были выделены фрагменты с массами MH^+ 351.4 и 1400.0 (данные не представлены). Они в точности соответствуют расчетным массам аминокислот глицил-аргинина и фрагмента Cys3–Cys14 с аминокислотной группой, образующихся из начальных азидбензоильных соединений в процессе MALDI-анализа [29]. Это позволило идентифицировать Va-MI и [K¹⁰(Va)]MI.

Биологическая активность всех полученных фотоактивируемых производных проверялась по сохранению способности взаимодействовать с мембраносвязанным никотиновым ацетилхолиновым рецептором *Torpedo californica*. Такую проверку, не вводя дополнительных модификаций в фотоактивируемые соединения, можно было осуществить методом конкурентного радиолигандного анализа по способности модифицированных производных подавлять связывание радиоактивно меченных GI или MI с препаратами АХР. С этой целью были синтезированы радиоактивные GI и MI. Наличие в аминокислотных последовательностях GI и MI остатков тирозина и гистидина позволило достаточно просто получить хлораминовым методом соответствующие [¹²⁵I]иодированные производные. Как было показано ранее, подобная модификация нерадиоактивным изотопом йода не оказывала существенного влияния на активность α -конотоксинов GI и MI в электрофизиологических и биологических тестах [19, 31]. Это подтверждается и полученными нами данными об эффективном взаимодействии [¹²⁵I]GI с мембран-

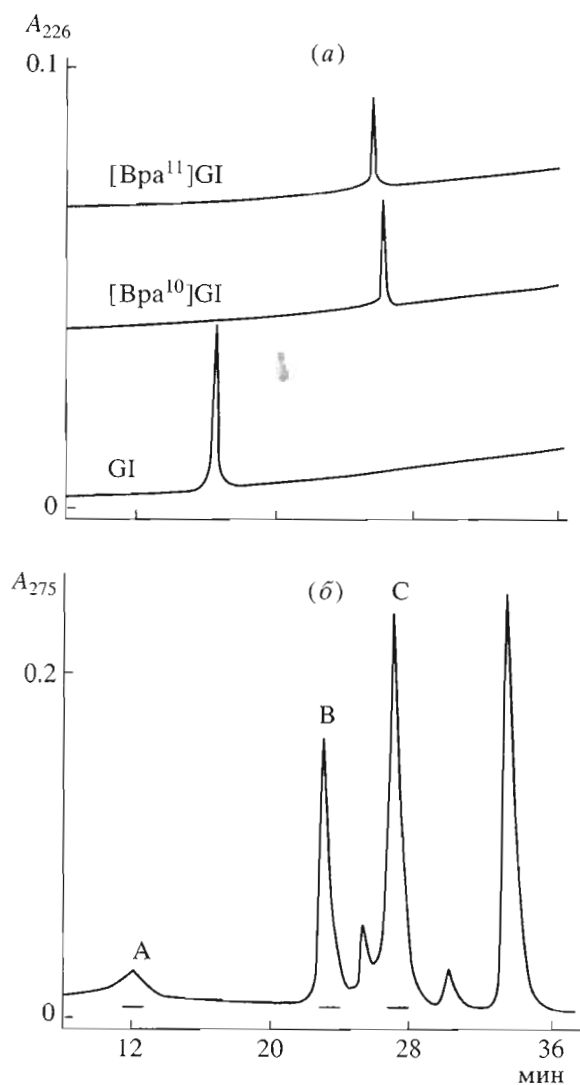


Рис. 1. ВЭЖХ фотоактивируемых производных конотоксинов. (а) Аналитическая рехроматография синтетического α -конотоксина GI и его Vra-аналогов на колонке Vydac C₁₈ (4.6 × 250 мм). (б) Разделение продуктов реакции α -конотоксина MI с N-гидроксисукцинимидным эфиром бензоилбензойной кислоты на колонке Vydac C₁₈ (4.6 × 250 мм). А – исходный конотоксин MI; В, С – мономодифицированные производные.

ным АХР *Torpedo* (K_d 50 нМ) в радиолигандном тесте [30].

На рис. 3а, б представлены кривые ингибирования бензофеноновыми производными GI и MI связывания с АХР *T. californica* [¹²⁵I]GI и [¹²⁵I]MI соответственно. Все фотоактивируемые аналоги с эффективностью, близкой таковой нативных лигандов, полностью подавляли это связывание в диапазоне значений $IC_{50} \sim 1.8-7.0$ мкМ (табл. 2). Однако только для одного из них ([Vra¹¹]GI) ингибирование носило явно выраженный двухсайтовый характер. Расчет экспериментальных дан-

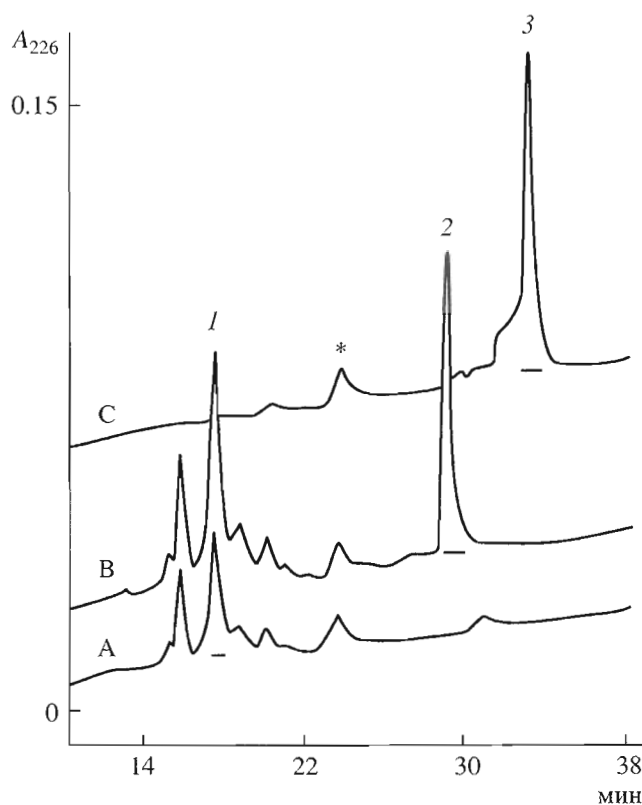


Рис. 2. Разделение продуктов триптического гидролиза конотоксина MI (A) и его монобензоилбензольных производных (B и C; рис.1б) на колонке μ ydac C₁₈ (4.6 × 250 мм). Звездочкой указан пик трипсина. 1 – немодифицированный фрагмент Cys3–Cys14; 2 – Bb-GlyArg; 3 – фрагмент Cys3–Cys14, содержащий Bb-группу.

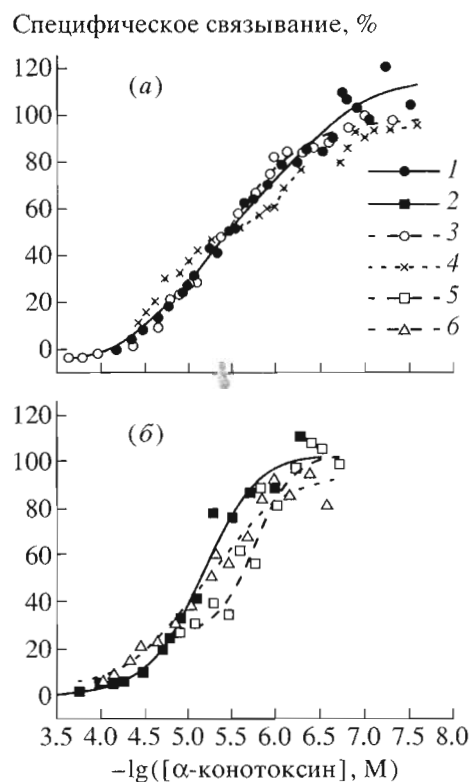


Рис. 3. Ингибирование связывания [¹²⁵I]GI (a) и [¹²⁵I]MI (б) с мембранными препаратами АХР *T. californica* нативными GI (1), MI (2) или их бензофеноновыми аналогами – [Bra¹⁰]GI (3), [Bra¹¹]GI (4), Bb-MI (5), [K¹⁰(Bb)]MI (6). Соответствующие значения IC₅₀, рассчитанные в рамках как одно-, так и двухсайтовой модели по программе Origin 5.0 (MicroCal Software Inc.), приведены в табл. 2.

ных проводился нами по программе Origin 5.0 (MicroCal Software Inc.) как в рамках односайтовой, так и в рамках двухсайтовой модели. В последнем случае соотношение значений IC₅₀ для

двух участков связывания не превышало 10–20 для всех фотопроизводных, за исключением [Bra¹¹]GI, для которого это соотношение составило 41 (см. табл. 2). По литературным данным, раз-

Таблица 2. Связывание α-конотоксинов GI и MI и их бензофеноновых производных с мембранным АХР*

α-Конотоксин	IC ₅₀ , мкМ			
	односайтовая модель	двухсайтовая модель		
		IC ₅₀ ¹	IC ₅₀ ²	IC ₅₀ ² /IC ₅₀ ¹
GI	2.8	0.38	8.2	21
[Bra ¹⁰]GI	4.5	0.70	5.7	8
[Bra ¹¹]GI	3.4	0.47	19.4	41
MI	7.0	(1.8)	(5.5)**	3
Bb-MI	1.8	(1.9)	(3.8)**	2
[K ¹⁰ (Bb)]MI	6.3	2.8	33.8	12

* Расчеты IC₅₀ проведены в рамках одно- и двухсайтовой модели по программе Origin 5.0 (MicroCal Software Inc.).

** Расчет IC₅₀ для MI и Bb-MI по двухсайтовой модели дал высокую среднеквадратичную ошибку, что вместе с незначительной разницей в значениях IC₅₀¹ и IC₅₀² свидетельствует о предпочтительности в данных случаях односайтовой модели обсчета.

личие в аффинности α -конотоксинов GI или MI к двум участкам связывания на АХР *T. californica* варьирует от одного до трех порядков в зависимости от источника рецептора и условий проведения теста [3–5, 10, 17, 18]. Однако все эти данные получены в опытах по конкуренции с α -бунгаротоксином на солибилизированных препаратах АХР. α -Нейротоксины, как известно, не обладают заметным различием в сродстве к двум сайтам и в этом смысле лучше подходят для выявления такого различия у других лигандов, действующих на те же участки рецептора. В целом, конкурентный радиолигандный анализ показал, что синтезированные фотоактивируемые аналоги являются столь же эффективными лигандами мышечного холинорецептора, как и нативные α -конотоксины.

Для дальнейшего использования фотоактивируемых конотоксинов в качестве инструментов для изучения АХР мы получили их радиоактивные аналоги хлораминовым методом. Моно- и диодированные продукты разделяли обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке Vydac C₁₈ (для [Вра¹¹]GI лучшее разделение пиков получили на колонке Nucleosil C₁₈) (данные не приведены). Подтверждением структуры служил MALDI-масс-спектрометрический анализ аналогичных продуктов, полученных в тех же условиях с использованием нерадиоактивного изотопа йода.

Все радиоактивные фотоактивируемые производные α -конотоксинов GI и MI сохранили способность специфически взаимодействовать с мембранными препаратами АХР, но в зависимости от вида фотометки обладали разным уровнем неспецифического связывания (связывания, которое не подавлялось в присутствии 200-кратного молярного избытка нативных GI или MI). Так, для иодированных природных α -конотоксинов этот уровень составлял $10 \pm 5\%$ от общего связывания; у азидобензоильных и Вра-аналогов он возрос примерно в 2 раза ($20 \pm 5\%$). Наиболее высоким уровнем неспецифического связывания (более 30%) обладали бензоилбензоильные производные MI. Второй атом йода также несколько увеличивал этот уровень. Такое увеличение неспецифического связывания можно объяснить, по-видимому, увеличением гидрофобности молекулы конотоксина при введении метки.

Нами были проведены опыты по фотомечению АХР *T. californica* всеми полученными радиоактивными фотоактивируемыми конотоксинами. На рис. 4 представлены профили радиоактивности меченных моноиодированными соединениями субъединиц рецептора после их разделения в полиакриламидном геле. Как оказалось, в той или иной степени происходит мечение всеми фотопроизводными всех субъединиц АХР. При этом картина мечения существенно зависит от типа фотометки. Так, азидобензоильные аналоги MI с

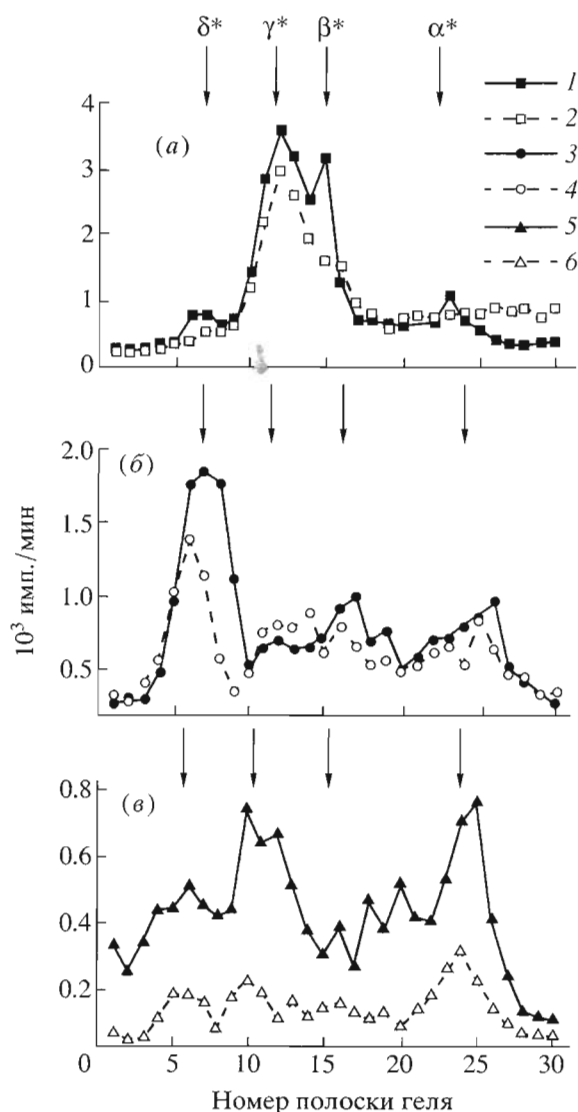


Рис. 4. Включение радиоактивности по данным электрофореза в 10% ПААГ в присутствии 0.1% SDS в субъединицы АХР в результате фотомечения моно-[¹²⁵I]иодированными производными Ва-MI (1), [K¹⁰(Ва)]MI (2) – (а); Вb-MI (3), [K¹⁰(Вb)]MI (4) – (б); [Вра¹⁰]GI (5), [Вра¹¹]GI (6) – (в). Стрелками указано расположение меченых субъединиц рецептора. Определение включения радиоактивности см. “Эксперимент. часть”.

высокой эффективностью метили γ - и β -субъединицы (рис. 4а), в то время как бензоилбензоильные – δ -субъединицу (рис. 4б). Расположение фотогруппы на N-конце или Lys10 не вносило заметных изменений в картину мечения. В то же время наблюдалось различное мечение субъединиц при использовании двух фотоаналогов GI с остатком бензоилфенилаланина в соседних положениях пептидной последовательности (10-м и 11-м): в то время как [¹²⁵I]([Вра¹¹]GI) метил с примерно равной эффективностью все субъединицы, [¹²⁵I]([Вра¹⁰]GI) – преимущественно γ - и α - (рис. 4в). Природа фото-

метки оказалась весьма существенной для эффективности мечения. Высокие выходы кросс-сшитых продуктов были получены для Ва-производных – 6.2% радиоактивности от общего связанного с АХР [^{125}I](К 10 (Ва)]МІ) специфически ковалентно встраивалось в γ -субъединицу (специфическое мечение нами определялось как разность кросс-сшитой с субъединицей радиоактивности в отсутствие и в присутствии 200-кратного молярного избытка соответствующего нативного α -конотоксина). В то же время максимальный выход специфической кросс-сшивки при использовании Вb-аналогов составил 1.9% для [^{125}I](Вb-МІ) и δ -субъединицы; для Вra-соединений – менее 1% для любой субъединицы. Использование в экспериментах диодированных производных не изменяло картины мечения, но несколько снижало выходы кросс-сшитых продуктов.

Тот факт, что небольшие по размерам конотоксины метят все субъединицы холинорецептора, может служить дополнительным доказательством их связывания на участках контактов между субъединицами. Этот вывод хорошо согласуется с полученными ранее данными о локализации двух участков связывания α -конотоксинов (как и α -нейротоксинов змей) на границах контакта α/γ - и α/δ -субъединиц [5–8, 10]. По данным ЯМР, в α -конотоксине G1 наиболее подвижными являются боковая часть Arg9 и незафиксированный дисульфидными связями N-концевой остаток Glu1 [12]. Расположенные на остатках Lys10 и Gly1 α -конотоксина M1 (которые пространственно соответствуют Arg9 и Glu1 α -конотоксина G1 [13]) азидобензоильная или бензоилбензоильная группы также должны быть весьма подвижны и могут контактировать со всеми субъединицами. Этим также может объясняться и независимость картины мечения субъединиц от положения одной и той же метки в этих двух позициях молекулы M1. При этом основную роль в характере мечения начинает играть природа фотогруппы. Аналогичное влияние химической природы фотоактивируемой группы на картину и эффективность мечения ранее было показано нами для фотоактивируемых производных α -нейротоксинов змей [27–30]. Любопытно, что максимальные выходы кросс-сшитых субъединиц были получены тогда также при использовании азидобензоильных аналогов. Стоит отметить, что в целом ряде работ, в которых использовались бензофеноновые аналоги различных пептидов, сообщалось о высоких (вплоть до 70%) уровнях фотомечения соответствующих рецепторов (см., например, обзор [32]). Однако в случае АХР *Torpedo* и бензофеноновых производных некоторых его пептидных лигандов цифры пришивок значительно ниже. Так, эффективность мечения рецептора различными фотоактивируемыми аналогами полипептидных α -нейротоксинов не превышала 6% [30], α -конотоксинов – 2%

(данная работа); еще ниже эти значения были для аналогов вещества P [33, 34].

В целом, представленные в данной работе результаты по взаимодействию фотоактивируемых производных α -конотоксинов G1 и M1 с АХР указывают на принципиальную возможность использования этого класса лигандов в качестве инструментов для исследования мышечных холинорецепторов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали трипсин (Calbiochem), хлорамин T (Serva), [^{125}I]Na (Изотоп). N-Оксисукцинимидные эфиры 4-азидобензойной и 4-бензоилбензойной кислот (Fluka) были синтезированы как описано в работах [35, 36]. Мембранные препараты АХР *T. californica* были любезно предоставлены проф. Ф. Хухо (Свободный Университет Берлина).

MALDI-масс-спектры регистрировали на масс-спектрометре Vision 2000 (ThermoBio Analysis) с использованием 2,5-дигидроксibenзойной кислоты в качестве матрицы.

Чистота всех синтезированных в работе α -конотоксинов подтверждалась аналитической ВЭЖХ на колонке Vydac C $_{18}$ (4.6 × 250 мм) в градиенте концентрации ацетонитрила (10–60% за 50 мин) в 0.1% TFA при скорости потока 1 мл/мин.

Для получения азидобензоильных и бензоилбензоильных производных M1 к 600 нмоль α -конотоксина M1 в 1 мл 100 мМ натрий-боратного буфера, pH 8.1, добавляли 600 нмоль N-оксисукцинимидных эфиров 4-азидобензойной или 4-бензоилбензойной кислот в 20 мкл диоксана и инкубировали 6 ч при перемешивании (комнатная температура, затемнение). Вb-производные разделяли ВЭЖХ на колонке Vydac C $_{18}$ (4.6 × 250 мм) в градиенте концентрации ацетонитрила (10–60% за 50 мин) в 0.1% TFA при скорости потока 1 мл/мин. Ab-продукты предварительно обессоливали на колонке с сефадексом G15 (1.5 × 77 см) в 0.1 М уксусной кислоте при скорости элюции 25 мл/час. Пик, соответствующий пептидной фракции, был лиофилизирован, растворен в минимальном объеме воды и хроматографирован на колонке Vydac C $_{18}$ в тех же условиях.

Триптический гидролиз. К 4 мкг α -конотоксина M1 или его моноацилированных аналогов в 50 мкл 100 мМ аммоний-бикарбонатного буфера, pH 8.0, добавляли по 0.8 мкг трипсина и инкубировали в течение 15 ч при 37°C (перемешивание, затемнение). Триптические фрагменты разделяли ВЭЖХ на колонке Vydac C $_{18}$ (4.6 × 250 мм) в градиенте концентрации ацетонитрила (5–65% за 60 мин) в 0.1% TFA при скорости потока 1 мл/мин.

Для приготовления радиоактивных конотоксинов использовали смесь [^{125}I]Na (удельная ра-

диоактивность 2000 Ки/ммоль) и KI с конечной удельной радиоактивностью ~ 2 Ки/ммоль. Реакцию проводили с 25 нмоль конотоксина, 25 нмоль NaI/KI и 45 нмоль хлорамина T в 100 мкл 100 mM натрий-фосфатного буфера, pH 7.5. После выдерживания в течение 8 мин при комнатной температуре реакционную смесь сразу же разделяли ВЭЖХ на колонке Vydac C₁₈ (4.6 \times 250 мм) в градиенте концентрации ацетонитрила (10–60% за 50 мин) в 0.1% TFA при скорости потока 1 мл/мин. Разделение продуктов иодирования [Bra¹¹]GI осуществляли на колонке Nucleosil C₁₈ (4 \times 250 мм) в тех же условиях.

При анализе равновесного связывания 2 мкл суспензии мембран *Torpedo* (концентрация белка – 2 мг/мл; активность – 2 нмоль токсинсвязывающих участков на мг белка), разведенных в 50 мкл натрий-фосфатного буфера, pH 7.5, инкубировали с 12–15 пмоль радиоактивных конотоксинов в течение 30–40 мин при комнатной температуре. Неспецифическое связывание определяли 30–40-минутной преинкубацией мембран с 200-кратным молярным избытком нативного GI или MI. Свободный лиганд удаляли быстрой (30–40 с) фильтрацией и промывкой (3 раза по 3 мл 50 mM натрий-фосфатного буфера, pH 7.5) на фильтрах GF/F (Whatman), предварительно замоченных в 0.25% полиэтиленимине.

В варианте конкурентного радиолигандного анализа различные количества исследуемого лиганда преинкубировали 30–40 мин с АХР с последующим добавлением [¹²⁵I]GI или [¹²⁵I]MI и дополнительной инкубацией 30–40 мин.

В экспериментах по фотомечению обычно использовали 25 мкл суспензии мембран *Torpedo* (100 пмоль токсинсвязывающих участков), разведенных в 250 мкл 100 mM фосфатного буфера, pH 7.5, и 100–150 пмоль радиоактивных фотоактивируемых лигандов. Смесь инкубировали 30–40 мин при комнатной температуре. В контрольных опытах, по которым рассчитывали в дальнейшем уровень неспецифического мечения, мембраны преинкубировали в течение 30–40 мин с 200-кратным молярным избытком α -конотоксинов GI или MI. Реакционные смеси подвергали ультрафиолетовому облучению под лампой БУВ-15 (λ_{max} 254 нм, 15 Вт) в течение 9 мин на расстоянии 6 см. Далее мембраны центрифугировали (14000 об/мин на центрифуге Eppendorf 5415) и промывали 5 mM фосфатным буфером, pH 7.5. Осадок растворяли в буфере для образцов (2% SDS, 5% β -меркаптоэтанол), прогревали при 50°C в течение 30 мин и наносили на пластинку 10% ПААГ-SDS (прибор SE600 фирмы Hoeffer Scientific Instruments). Гель окрашивали кумасси, высушивали и подвергали автордиографии. Для получения профилей радиоактивности и расчета эффективности мечения субъединиц АХР высушенный гель затем разре-

зался на полоски шириной 2 мм, которые просчитывались в γ -счетчике (CompuGamma, LKB). Специфическое мечение определяли как разность кросс-шитой радиоактивности, полученной в отсутствие и в присутствии избытка нативного α -конотоксина.

Авторы выражают благодарность академику РАН В.Т. Иванову за ценные замечания по тексту статьи.

Настоящая работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 99-04-8798).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. McIntosh J.M., Santos A.D., Olivera B.M. // Annu. Rev. Biochem. 1999. V. 68. P. 59–88.
2. Arias H.R., Blanton M.P. // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2000. V. 32. P. 1017–1028.
3. Hann R.M., Pagan O.R., Eterovic V.A. // Biochemistry. 1994. V. 33. P. 14058–14063.
4. Groebe D.R., Dumm J.M., Levitan E.S., Abramson S.N. // Mol. Pharmacol. 1995. V. 48. P. 105–111.
5. Utkin Yu.N., Kobayashi Y., Hucho F., Tsetlin V.I. // Toxicon. 1994. V. 32. P. 1153–1157.
6. Sugiyama N., Marchot P., Kawanishi C., Osaka H., Molles B., Sine S.M., Taylor P. // Mol. Pharmacol. 1998. V. 53. P. 787–794.
7. Bren N., Sine S.M. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 12692–12700.
8. Sine S.M., Kreienkamp H.-J., Bren N., Maeda R., Taylor P. // Neuron. 1995. V. 15. P. 205–211.
9. Sine S.M. // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 23521–23527.
10. Chiara D.C., Xie Y., Cohen J.B. // Biochemistry. 1999. V. 38. P. 6689–6698.
11. Guddat L.W., Martin J.A., Shan L., Edmundson A.B., Gray W.R. // Biochemistry. 1996. V. 35. P. 11329–11335.
12. Maslennikov I.V., Sobol A.G., Gladky K.V., Lugovskoy A.A., Ostrovsky A.G., Tsetlin V.I., Ivanov V.T., Arseniev A.S. // Eur. J. Biochem. 1998. V. 254. P. 238–247.
13. Gouda H., Yamazaki K., Hasegawa J., Kobayashi Y., Nishiuchi Y., Sakakibara S., Hirono S. // Biochim. Biophys. Acta. 1997. V. 1343. P. 327–334.
14. Maslennikov I.V., Shenkarev Z.O., Zhmak M.N., Ivanov V.T., Methfessel C., Tsetlin V.I., Arseniev A.S. // FEBS Lett. 1999. V. 444. P. 275–280.
15. Ramilo C.A., Zafaralla G.C., Nadasdi L., Hammerland L.G., Yoshikami D., Gray W.R., Kristipati R., Ramachandran J., Miljanich G., Olivera B.M., Cruz L.J. // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 9919–9926.
16. McIntosh J.M., Yoshikami D., Mahe E., Nielsen D.B., Rivier J.E., Gray W.R., Olivera B.M. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 16733–16739.
17. Groebe D.R., Gray W.R., Abramson S.N. // Biochemistry. 1997. V. 36. P. 6469–6474.
18. Hann R.M., Pagan O.R., Gregory L.M., Jacome T., Eterovic V.A. // Biochemistry. 1997. V. 36. P. 9051–9056.

19. Jacobsen R.B., Delacruz R.G., Grose J.H., McIntosh J.M., Yoshikami D., Olivera B.M. // *Biochemistry*. 1999. V. 38. P. 13310–13315.
20. Жмак М.Н., Кашеверов И.Е., Уткин Ю.Н., Цетлин В.И., Вольпина О.М., Иванов В.Т. // *Биоорганическая химия*. 2001. Т. 27. С. 83–88.
21. Myers R.A., Zafaralla G.C., Gray W.R., Abbott J., Cruz L.J., Olivera B.M. // *Biochemistry*. 1991. V. 30. P. 9370–9377.
22. Muhn P., Hucho F. // *Biochemistry*. 1983. V. 22. P. 421–425.
23. Schrattenholz A., Godovac-Zimmermann J., Schaefer H.-J., Albuquerque E.X., Maelicke A. // *Eur. J. Biochem.* 1993. V. 216. P. 671–677.
24. Blanton M.P., McCardy E.A., Gallagher M.J. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 3469–3478.
25. Wang D., Chiara D.C., Xie Y., Cohen J.B. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 28666–28674.
26. Pratt M.B., Pedersen S.E., Cohen J.B. // *Biochemistry*. 2000. V. 39. P. 11452–11462.
27. Machold J., Weise C., Utkin Yu.N., Franke P., Tsetlin V.I., Hucho F. // *Eur. J. Biochem.* 1995. V. 228. P. 947–954.
28. Utkin Yu.N., Hatanaka Ya., Franke P., Machold J., Hucho F., Tsetlin V.I. // *J. Prot. Chem.* 1995. V. 14. P. 197–203.
29. Utkin Yu.N., Krivoshein A.V., Davydov V.L., Kasheverov I.E., Franke P., Maslennikov I.V., Arseniev A.S., Hucho F., Tsetlin V.I. // *Eur. J. Biochem.* 1998. V. 253. P. 229–235.
30. Kasheverov I., Zhmak M., Chivilyov E., Saez-Briones P., Utkin Yu., Hucho F., Tsetlin V. // *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 1999. V. 19. P. 559–571.
31. Gray W.R., Luque F.A., Galyean R., Atherton E., Shepard R.C., Stone B.L., Reyes A., Alford J., McIntosh M., Olivera B.M., Cruz L.J., Rivier J. // *Biochemistry*. 1984. V. 23. P. 2796–2802.
32. Dorman G., Prestwich G. // *Biochemistry*. 1994. V. 33. P. 5661–5673.
33. Blanton M.P., Li Y.-M., Stimson E.R., Maggio J.E., Cohen J.B. // *Mol. Pharmacol.* 1994. V. 46. P. 1048–1055.
34. Kasheverov I.E., Utkin Yu.N., Franke P., Tsetlin V.I. // *J. Peptide Res.* 1997. V. 50. P. 408–414.
35. Millon R., Olomucki M., Le Gall J.-Y., Golinska B., Ebel J.-P., Ehresmann B. // *Eur. J. Biochem.* 1980. V. 110. P. 485–492.
36. Parker J.M.R., Hodges R.S. // *J. Protein Chem.* 1985. V. 3. P. 479–489.

Photoactivatable Analogues of α -Conotoxins GI and MI and Their Interaction with Nicotinic Acetylcholine Receptor

I. E. Kasheverov[#], A. M. Rozhkova, M. N. Zhmak, Yu. N. Utkin, and V. I. Tsetlin

[#]Phonelfax: +7 (095) 330-7374; e-mail: iekash@ibch.ru

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia*

Two photoactivatable analogues of α -conotoxin GI with the benzoylphenylalanine residue (Bpa) substituted for His10 or Tyr11 were synthesized using the method of solid-phase peptide synthesis. In addition, α -conotoxin MI was chemically modified by placing an azidobenzoyl or a benzoylbenzoyl photo label at N^α of Gly1 or N^ε of Lys10. All the photoactivatable analogues were purified by HPLC, their structures were confirmed by MALDI MS, and the label positions in their molecules were localized by MS of their trypsinolysis fragments. All the analogues interacted with the nicotinic acetylcholine receptor (AChR) from *Torpedo californica* as efficiently as the native α -conotoxins, with the differences in the inhibition constants being within one order of magnitude under the same conditions. [¹²⁵I]Derivatives prepared from all the analogues retained the ability to be bound by AChR and were used in the photoinduced AChR cross-linking. All the AChR subunits were found to be cross-linked to the photoactivatable analogues, with the linking depending on both the chemical nature of label and its position in the α -conotoxin molecule. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 2; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: α -conotoxins, nicotinic acetylcholine receptor, photoactivatable analogues, photoinduced cross-linking