



УДК 577.112:541.572.5

## ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ НЕРАДИОАКТИВНЫЙ МЕТОД СКРИНИНГА СОЕДИНЕНИЙ, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИХ С НЕЙРОННЫМ $\alpha 7$ -ХОЛИНОРЕЦЕПТОРОМ

© 2003 г. А. С. Коротина, Е. В. Крюкова, Е. А. Азеева,  
А. Ф. Шевалье, Ю. Н. Уткин, В. И. Цетлин<sup>#</sup>

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 13.05.2002 г. Принята к печати 11.07.2002 г.

Предложен чувствительный нерадиоактивный метод обнаружения веществ, взаимодействующих с нейронным никотиновым холинорецептором (АХР)  $\alpha 7$ -типа с использованием биотинилированного  $\alpha$ -кобратоксина (Вт-СТХ). В основе метода лежит свойство *N*-концевого лигандсвязывающего экстрацеллюлярного фрагмента (ЛСЭФ)  $\alpha 7$ -АХР сохранять присущую целому рецептору способность взаимодействовать с  $\alpha$ -кобратооксином (СТХ). ЛСЭФ, полученный гетерологической экспрессией фрагмента гена  $\alpha 7$ -субъединицы АХР мозга крысы в клетках *E. coli*, сорбировали в лунках стандартного 96-луночного планшета и затем инкубировали с Вт-СТХ. Специфически связавшийся Вт-СТХ определяли колориметрически с использованием комплекса стрептавидин–пероксидаза. Способность других соединений к взаимодействию с  $\alpha 7$ -АХР определяли по степени ингибирования ими связывания Вт-СТХ с ЛСЭФ. В качестве модельных соединений использовали никотин, карбамоилхолин, *d*-тубокурарин, анабазин, а также конотоксин ImI и нейротоксин II. Чувствительность предлагаемого метода сопоставима с таковой радиолигандного метода (до 10 пмоль).

*Ключевые слова:* биотинилированный кобратоксин; нейронный  $\alpha 7$ -никотиновый холинорецептор, твердофазный метод скрининга.

### ВВЕДЕНИЕ

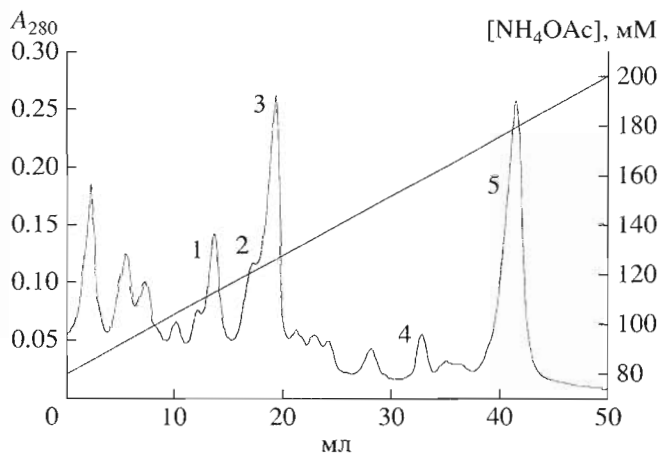
Фундаментальные исследования в области нейробиологии в последнее время позволили идентифицировать ряд белков, участвующих в развитии тех или иных патологических процессов. Так, было показано, что в развитие целого ряда патологий вовлечены нейронные никотиновые холинорецепторы (АХР) [1, 2]. Нейронные АХР являются лигандуправляемыми ионными каналами и представляют собой пентамерные мембранные белки, содержащие  $\alpha$ -субъединицы девяти типов ( $\alpha 2$ – $\alpha 10$ ) и  $\beta$ -субъединицы трех типов ( $\beta 2$ – $\beta 4$ ) [3]. Эти рецепторы могут существовать как в виде гетеромерных форм, состоящих из различных комбинаций  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц (например,  $\alpha 4\beta 2$  или  $\alpha 3\beta 4$ ), так и в виде гомомеров, включающих лишь пять  $\alpha$ -субъединиц одного типа (например,  $\alpha 7$ -АХР [4]). Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что АХР  $\alpha 7$ -типа могут быть вовлечены в развитие некоторых нейродегенеративных (болезнь

Альцгеймера [5, 6]) или раковых (мелкоклеточная карцинома легких [7]) заболеваний. Блокирование  $\alpha 7$ -АХР  $\alpha$ -бунгаротоксином [8, 9] или конотоксином ImI [10] приводит к уменьшению пролиферации клеток мелкоклеточной карциномы. Однако эти нейротоксины высокотоксичны и взаимодействуют также с АХР других типов. Следовательно, требуется поиск новых соединений, обладающих высокой селективностью по отношению к АХР  $\alpha 7$ -типа и не столь токсичных, как  $\alpha$ -бунгаротоксин. Поиск таких соединений требует разработки эффективного метода скрининга соединений, способных взаимодействовать с  $\alpha 7$ -рецепторами.

Наиболее распространенный метод изучения взаимодействия различных соединений с рецепторами – это радиолигандный анализ. Наряду с несомненными достоинствами (высокая чувствительность, надежность и т.п.) этот метод имеет и ряд недостатков, самый существенный из которых – необходимость работы с радиоактивными веществами. В то же время в ряде случаев с использованием системы биотин–авидин или биотин–стрептавидин для мечения биомолекул удается достичь уровня чувствительности радиоизотопных методов [11].

Сокращения:  $\alpha$ -Bgt –  $\alpha$ -бунгаротоксин; СТХ и Вт-СТХ –  $\alpha$ -кобратоксин и его биотинилированное производное; ЛСЭФ – лигандсвязывающий экстрацеллюлярный фрагмент; АХР – никотиновый холинорецептор; BSA – бычий сывороточный альбумин.

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



**Рис. 1.** Разделение биотинилированных производных СТХ ионообменной хроматографией на колонке TSK-3SW (7.5 × 150 мм) в градиенте молярности ацетата аммония. Скорость потока 1 мл/мин. Фракции 1–4 – монобиотинилированные производные СТХ, фракция 5 – исходный СТХ.

Ранее эти системы были использованы для определения мембранных рецепторов вещества Р [12], антител к ацетилхолиновому рецептору [13], а также в жидкофазном иммунном анализе [14] и для локализации вазопрессиновых рецепторов на поверхности раковых клеток [15]. В настоящей работе предлагается использовать твердофазный метод анализа, основанный на связывании *N*-концевого лигандсвязывающего домена  $\alpha 7$ -АХР мозга крысы (ЛСЭФ) с Vt-СТХ, для скрининга соединений, взаимодействующих с этим рецептором.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Использование природного  $\alpha 7$ -АХР для создания высокоэффективного метода скрининга взаимодействующих с ним соединений практически невозможно вследствие его крайне низкого содержания в тканях. Гетерологическая экспрессия [16] полноразмерного рецептора в препаративных количествах до сих пор остается недостижимой задачей. Однако показано, что *N*-концевой экстрацеллюлярный домен  $\alpha 7$ -субъединицы (фрагмент 1–209) в значительной степени сохраняет лигандсвязывающие свойства полноразмерного рецептора [17–19]. Так, ЛСЭФ связывает  $\alpha$ -нейротоксины длинного типа ( $\alpha$ -бунгаротоксин,  $\alpha$ -кобротоксин), а также  $\alpha$ -конотоксин ImI, являющийся специфическим маркером  $\alpha 7$ -АХР [20]. На основании этих данных мы решили использовать для создания метода скрининга соединений, взаимодействующих с  $\alpha 7$ -АХР, экстрацеллюлярный домен рецептора.

Мы применяли ЛСЭФ, полученный гетерологической экспрессией соответствующего фрагмента гена  $\alpha 7$ -субъединицы АХР мозга крысы в

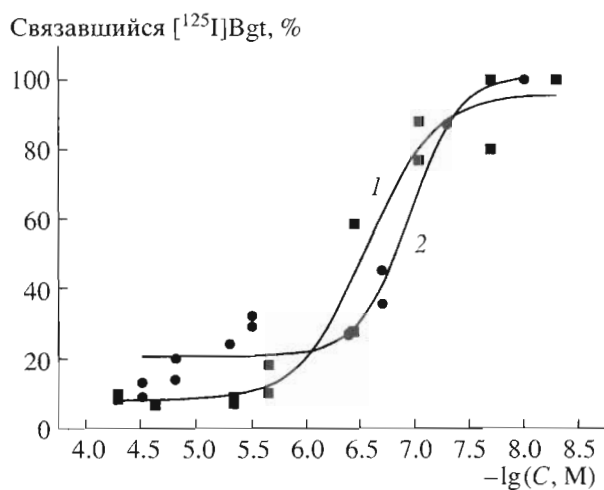
клетках *E. coli*.<sup>\*</sup> Домен был выделен из тел включения и ренатурирован в условиях, подобных тем, которые ранее использовались для получения аналогичного домена  $\alpha$ -субъединицы АХР *Torpedo californica* [21]. Выделенный нами домен связывал радиоактивный [<sup>125</sup>I]- $\alpha$ -бунгаротоксин с  $K_d$  200 нМ. Эта величина, хотя и выше таковой для природного рецептора ( $K_d \sim 1$ –5 нМ [22, 23]), тем не менее позволяет надежно обнаруживать связывание токсина и сопоставима с величинами, полученными другими авторами ( $K_d$  2.5 мкМ) [18], а также в нашей лаборатории [24] для различных форм ЛСЭФ<sup>\*</sup>.

В качестве меченого лиганда мы использовали биотинилированный  $\alpha$ -кобротоксин (Vt-СТХ) с последующей колориметрической детекцией специфически связавшегося токсина с помощью авидин-пероксидазного конъюгата. Биотинилированные производные  $\alpha$ -кобротоксина были использованы ранее для исследования АХР *Torpedo* [25]. При этом оказалось, что эффективность взаимодействия некоторых производных (в частности, биотинилированного по Lys23 аналога) с АХР уменьшалась при образовании тройного комплекса с авидином. Чтобы исключить возможность дестабилизации Vt-СТХ-доменного комплекса при связывании авидина с биотинильным остатком, мы увеличили расстояние между токсином и остатком биотина путем использования производного биотина, содержащего два остатка  $\epsilon$ -аминокапроновой кислоты.

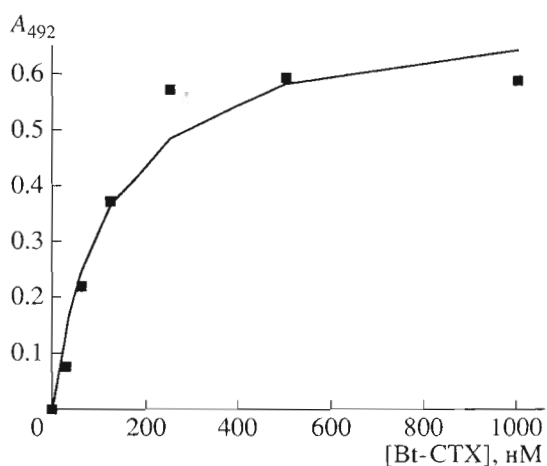
Продукты, полученные в результате реакции СТХ с *N*-оксисукцинимидным эфиром 6-(6-биотинамидокапроил)аминокапроновой кислоты, разделяли методом высокоэффективной ионообменной хроматографии (рис. 1). По данным MALDI-масс-спектрометрии фракции 1–4 соответствуют монобиотинилированным производным ( $[M]^{+}$  8281 Да), а фракция 5 – исходному СТХ ( $[M]^{+}$  7831 Да). Фракции, выходящие в начале градиента (до фр. 1), соответствуют производным, содержащим две и более меток. Фракции, выходящие между 20 и 30 мл, по данным MALDI-масс-спектрометрии, не являются производными СТХ. Как видно из рис. 1, реакция приводит к преимущественной модификации одной из шести имеющихся в СТХ [26] аминогрупп с образованием производного, элюирующегося как фракция 3. Поскольку это производное получается с максимальным выходом, оно и было использовано в дальнейшей работе.

Для того чтобы установить не уменьшает ли модификация СТХ его сродство к АХР, мы проверили способность биотинилированного производного конкурировать с радиоактивным токсином за связывание с рецептором *Torpedo* (рис. 2).

<sup>\*</sup> Будет опубликовано отдельно.



**Рис. 2.** Ингибирование связывания радиоактивного  $[^{125}\text{I}]\text{Bgt}$  с мембранами электрического органа *Torpedo* природным СТХ (2) и Vt-СТХ (1).  $C$  – концентрация СТХ и Vt-СТХ, М. На оси ординат указано количество связавшегося  $[^{125}\text{I}]\text{Bgt}$  в процентах от максимального связывания.



**Рис. 3.** Специфическое связывание Vt-СТХ с ЛСЭФ, сорбированным в лунках 96-луночного планшета. По оси абсцисс отложена концентрация Vt-СТХ в лунке, по оси ординат – результат анализа связавшегося Vt-СТХ с использованием системы стрептавидин–пероксидаза и *o*-фенилендиамина в качестве субстрата [27].

Оказалось, что Vt-СТХ очень близок к нативному токсину по способности взаимодействовать с АХР ( $\text{IC}_{50}$  Vt-СТХ  $2.57 \times 10^{-7}$  М;  $\text{IC}_{50}$  СТХ  $1.12 \times 10^{-7}$  М) (рис. 2). Таким образом мы показали, что ЛСЭФ сохраняет способность связывать радиоактивный СТХ, а Vt-СТХ – способность связываться с рецептором *Torpedo*, и, следовательно, оба этих белка могут быть использованы для разработки нерадиоактивного метода анализа связывания.

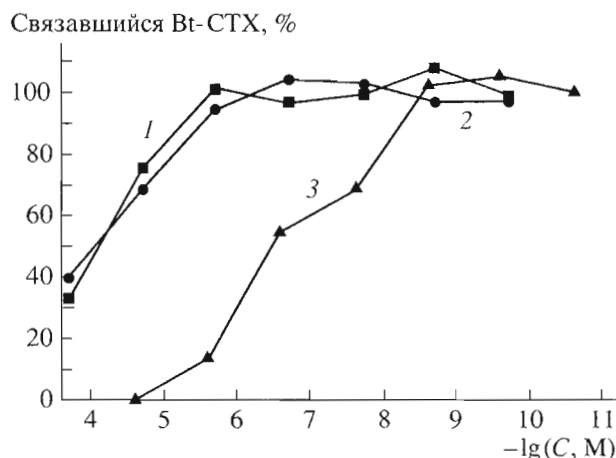
Для твердофазного анализа взаимодействия ЛСЭФ с Vt-СТХ использовали 96-луночные планшеты, применяемые для иммуноферментного анализа. Исследование условий сорбции домена на планшет показало, что оптимальное время сорбции составляет 15–17 ч при  $4^\circ\text{C}$ , а оптимальное количество белка – 10 мкг в лунку. Через 15–17 ч инкубации раствор несорбированного домена удаляли, блокировали остаточную сорбцию 2% раствором BSA и добавляли Vt-СТХ в концентрации 30 нМ–1 мкМ. При этом, чтобы уменьшить неспецифическое связывание, в раствор добавляли BSA до концентрации 0.15%. Через 1.5 ч раствор Vt-СТХ удаляли и проводили детекцию связавшегося токсина по стандартной методике [27] с использованием конъюгата стрептавидин-пероксидаза и *o*-фенилендиамина в качестве субстрата. Для определения неспецифического связывания в отдельных опытах перед добавлением Vt-СТХ планшеты с нанесенным доменом в течение 30 мин инкубировали со 100-кратным избытком нативного СТХ.

Взаимодействие сорбированного домена с Vt-СТХ в увеличивающихся концентрациях показало, что Vt-СТХ специфически и с насыщением связывается с ЛСЭФ (рис. 3). Константа диссоци-

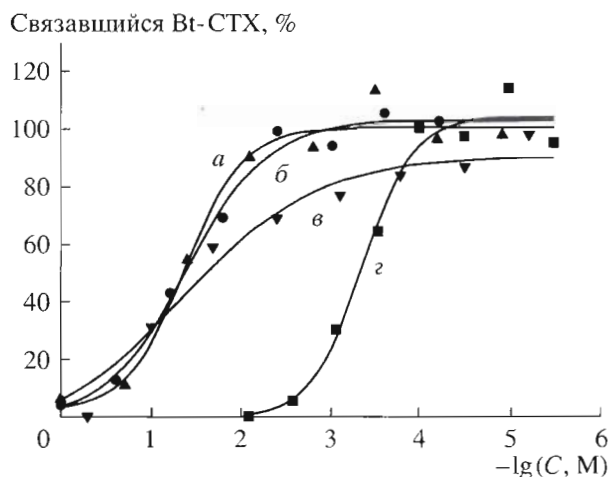
ации, определенная с использованием Vt-СТХ, составляет 120 нМ (рис. 3); величина, определенная для  $[^{125}\text{I}]\text{CTX}$  радиолигандным методом в растворе – 200 нМ.

На следующем этапе мы проверяли, насколько фармакологическая специфичность домена соответствует таковой природного  $\alpha 7$ -АХР. Ранее было показано, что  $\alpha 7$ -АХР эффективно связывает  $\alpha$ -нейротоксины длинного типа, в то время как  $\alpha$ -нейротоксины короткого типа связываются на несколько порядков хуже [28]. В нашей системе также наблюдалась разница в несколько порядков между токсином длинного типа (СТХ) и короткого типа (нейротоксином II *Naja oxiana*) при конкуренции с Vt-СТХ (рис. 4). Величина  $\text{IC}_{50}$  для СТХ составила 0.27 мкМ, а для нейротоксина II – более 20 мкМ. В ряде работ (см., например, [20])  $\alpha$ -конотоксин ImI использовался в качестве специфического маркера  $\alpha 7$ -АХР. В нашей системе ImI, хотя и с низким сродством, взаимодействовал с ЛСЭФ (рис. 4).

Нами была также исследована способность взаимодействовать с сорбированным доменом таких низкомолекулярных лигандов, как никотин, карбамоилхолин, анабазин и *d*-тубокурарин (рис. 5). Ранее было показано [29], что фармакологический профиль  $\alpha 7$ -АХР сильно зависит от того, из какого вида животного выделен исследуемый рецептор. Для цельного рецептора типа  $\alpha 7$  в клетках линии крысиной феохромоцитомы PC12 были определены следующие значения  $\text{IC}_{50}$  для различных лигандов: карбамоилхолин –  $1.2 \times 10^{-4}$  М, никотин –  $5.6 \times 10^{-5}$  М, тубокурарин –  $4.8 \times 10^{-6}$  М [30]. В нашей системе *d*-тубокурарин оказался



**Рис. 4.** Ингибирование связывания Vt-CTX с сорбированным ЛСЭФ  $\alpha$ -конотоксином ImI (1), нейротоксином II (2) и СТХ (3).  $C$  — концентрация токсинов в лунке,  $M$ . На оси ординат указано количество связавшегося Vt-CTX в процентах от максимального связывания.



**Рис. 5.** Ингибирование связывания Vt-CTX с сорбированным ЛСЭФ низкомолекулярными лигандами никотином (а), карбамоилхолином (б), анабазинем (в) и тубокурарином (z).  $C$  — концентрация низкомолекулярных лигандов в лунке,  $M$ . На оси ординат указано количество связавшегося Vt-CTX в процентах от максимального связывания.

также существенно более активным, чем карбамоилхолин и никотин (таблица).

Таким образом, фармакологический профиль сорбированного домена соответствует профилю природного  $\alpha 7$ -АХР, хотя взаимодействие со всеми лигандами происходит с меньшей эффективностью. Константы ингибирования связывания Vt-CTX, определенные предложенным нами методом, находятся в хорошем соответствии с таковыми, определенными радиолигандным методом (таблица). Чувствительность метода также сопоставима с таковой радиолигандного метода. Так, при использовании в предлагаемом методе таких же количеств ЛСЭФ, как и в радиолигандном методе (10 пмоль), получены достоверные результаты. Предложенный метод может быть легко ав-

томатизирован и позволяет избежать работы с радиоактивными соединениями.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали  $N$ -оксисукцинимидный эфир 6-(6-биотинамидокапроил)аминокапроновой кислоты, анабазин, никотин, Трис, BSA и  $o$ -фенилендиамин фирмы Sigma, DMSO (Merck), Тритон X-100 (Serva), ионообменные фильтры DE-81 (Whatman), 96-луночные планшеты (EIA/RIA, flat bottom, high binding, Costar), карбамоилхолин и  $d$ -тубокурарин (Fluka), стрептавидин-пероксидаза (Roche Applied Science),  $\alpha$ -кобратоксин *Naja kaouthia* и нейротоксин II *Naja oxiana* получены как описано в работе [18]. Радиоактивный [ $^{125}$ I] $\alpha$ -Bgt ( $9 \times 10^4$  имп./пмоль) приготовлен по методике [31]. Мембраны электрического органа *T. californica* любезно предоставлены проф. Ф. Хухо (Свободный университет Берлина). ЛСЭФ получали гетерологической экспрессией фрагмента гена, соответствующего  $N$ -концевому домену  $\alpha 7$ -субъединицы АХР мозга крысы, в клетках *E. coli* в условиях, подобных тем, которые ранее использовались для получения аналогичного домена  $\alpha$ -субъединицы АХР *T. californica* [21].

**Биотинилированный СТХ (Vt-CTX).** К 8.2 мг (1.05 мкмоль) СТХ в 2 мл натрий-фосфатного буфера (рН 8.0) добавляли раствор 1.2 мг (2.1 мкмоль)  $N$ -оксисукцинимидного эфира 6-(6-биотинамидокапроил)аминокапроновой кислоты в 200 мкл DMSO и перемешивали 16 ч при комнатной температуре. После обессоливания реакционной смеси на колонке (1.5  $\times$  90 см) с

Взаимодействие низкомолекулярных лигандов с  $N$ -концевым доменом  $\alpha 7$ -холинорецептора по данным двух методов

Конкурирующее вещество	IC <sub>50</sub> , мМ	
	Метод с использованием Vt-CTX	Радиолигандный метод
$d$ -Тубокурарин	0.45	1.0
Карбамоилхолин	41.6	46
Никотин	42	120
Анабазин	48	Не опр.

сефадексом G-15 в 0.1 М уксусной кислоте и лиофилизации биотинилированные производные СТХ разделяли на колонке TSK CM-3SW (7.5 × 150 мм) в градиенте концентрации ацетата аммония от 80 до 200 мМ за 50 мин (рис. 1). После лиофилизации для работы использовали фракцию 3.

**Взаимодействие Vt-СТХ с доменом  $\alpha 7$ -АХР.** В лунки 96-луночного планшета вносили по 100 мкл раствора домена (0.1 мг/мл, 0.1 М NaHCO<sub>3</sub>, pH 8.0) и инкубировали 15–17 ч при 4°C. Затем раствор домена удаляли, в лунки вносили по 200 мкл 2% раствора BSA в 50 мМ Трис-НСl (pH 8.0) и инкубировали 60 мин при комнатной температуре. Раствор BSA удаляли, в лунки вносили 50 мкл буфера (0.15% BSA, 50 мМ Трис-НСl, pH 8.0), затем 50 мкл раствора Vt-СТХ (фракция 3, рис. 1; 0.15% BSA, 50 мМ Трис-НСl, pH 8.0) в возрастающей концентрации (30 нМ–1 мкМ) и инкубировали 1.5 ч при 37°C. Каждое измерение производили в двух повторах. Неспецифическое связывание определяли аналогично с той лишь разницей, что во все лунки перед добавлением Vt-СТХ вместо буфера вносили раствор природного СТХ (100-кратный молярный избыток по отношению к Vt-СТХ) и инкубировали 30 мин при 37°C. После инкубации с Vt-СТХ раствор с несвязавшимся токсином удаляли, промывали лунки буфером (0.15% BSA, 50 мМ Трис-НСl, pH 8.0, 3 раза по 200 мкл) и вносили в каждую лунку по 100 мкл раствора стрептавидин-пероксидазы (0.2 мг/мл). Дальнейшую обработку проводили согласно методике [27] с использованием *o*-фенилендиамина в качестве субстрата.

**Радиолигандный анализ.** К 100 нМ раствору экстрацеллюлярного домена  $\alpha 7$ -АХР в 50 мМ Трис-НСl (pH 8.0) добавляли [<sup>125</sup>I]α-Bgt в концентрациях от 14 до 800 нМ (конечный объем инкубационной смеси 50 мкл) и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Комплекс рецептор–токсин отделяли от несвязавшегося [<sup>125</sup>I]α-Bgt на фильтрах DE-81 и после однократной промывки 5 мл 50 мМ Трис-НСl с 0.1% Три-тон X-100 определяли количество связавшегося радиоактивного [<sup>125</sup>I]α-Bgt на γ-счетчике. Неспецифическое связывание определяли в присутствии 100-кратного избытка немеченого СТХ, который инкубировали с доменом 30 мин перед добавлением [<sup>125</sup>I]α-Bgt.

В экспериментах по конкуренции 4 мкл суспензии мембран *T. californica* (содержание белка 1.1 мг/мл, 50 мМ Трис-НСl, pH 8.0) предварительно инкубировали с биотинилированным или небитинилированным кобратоксином в возрастающей концентрации (50 нМ–30 мкМ) или низкомолекулярным лигандом (1 мкМ–1 М) в течение 1 ч, затем вносили [<sup>125</sup>I]α-Bgt (конечная концентрация 22 нМ, конечный объем инкубационной

смеси 50 мкл) и после часовой инкубации отделяли несвязавшийся [<sup>125</sup>I]α-Bgt как описано выше.

**Взаимодействие ЛСЭФ с низкомолекулярными лигандами.** Внесение домена в лунки проводили как описано выше для взаимодействия Vt-СТХ с доменом. Затем для определения общего связывания в часть лунок добавляли 50 мкл буфера (0.15% BSA, 50 мМ Трис-НСl, pH 8.0), а для определения связывания ЛСЭФ с низкомолекулярными лигандами в другие лунки вносили исследуемое вещество: никотин (1 М–64 мкМ), карбамоилхоллин (1 М–61 мкМ), анабазеин (0.5 М–6.4 мкМ), *d*-тубокурарин (8 мМ–3.3 мкМ) и инкубировали 30 мин. После чего во все лунки добавляли раствор Vt-СТХ и инкубировали еще 1.5 ч. Раствор лиганда и токсина удаляли, промывали лунки 0.15% BSA (3 раза по 200 мкл) и вносили в каждую лунку по 100 мкл раствора стрептавидин-пероксидазы (0.2 мг/мл). Дальнейшую обработку проводили согласно методике [27] с использованием *o*-фенилендиамина в качестве субстрата.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lindstrom J. // Mol. Neurobiol. 1997. V. 15. P. 193–222.
2. Jones S., Sudweeks S., Yakel J.L. // Trends Neurosci. 1999. V. 22. P. 555–561.
3. Itier V., Bertrand D. // FEBS Lett. 2001. V. 504. P. 118–125.
4. Gerzanich V., Anand R., Lindstrom J. // Mol. Pharmacol. 1994. V. 45. P. 212–220.
5. Nordberg A. // Biol. Psychiatry. 2001. V. 49. P. 200–210.
6. Nakamura S., Takahashi T., Yamashita H., Kawakami H. // Alcohol. 2001. V. 24. P. 79–81.
7. Sciamanna M.A., Griesmann G.E., Williams C.L., Lennon V.A. // J. Neurochem. 1997. V. 69. P. 2302–2311.
8. Quik M., Chan J., Patric J. // Brain Res. 1994. V. 655. P. 161–167.
9. Codignola A., Tarroni P., Cattaneo M.G., Vicentini L.M., Clementi F., Sher E. // FEBS Lett. 1994. V. 342. P. 286–290.
10. Colignola A., McIntosh J.M., Cattaneo M.G., Vicentini L.M., Clementi F., Sher E. // Neurosci. Lett. 1996. V. 206. P. 53–56.
11. Wilcheck M., Bayer E.A. // Anal. Biochem. 1988. V. 171. P. 1–32.
12. Головнина Т.А., Кашиверов И.Е., Плаксин Д.Ю., Якунина Н.Б., Коваленко В.А., Уткин Ю.Н., Цетлин В.И. // Биоорган. химия. 1992. Т. 18. С. 932–941.
13. Quinn A., Harrison R., Jehanli A.M.T., Lunt G.G., Walch S. // J. Immunol. Methods. 1988. V. 107. P. 197–203.
14. Selo I., Negroni L., Creminon C., Grassi J., Wal J.M. // J. Immunol. Methods. 1996. V. 199. P. 127–138.
15. Howl J., Wang X., Kirk C.J., Wheatley M. // Eur. J. Biochem. 1993. V. 213. P. 711–719.
16. Aztiria E.M., Sogayar M.C., Barrantes F.J. // Neurochem. Res. 2000. V. 25. P. 171–180.

17. Wells G.B., Anand R., Wang F., Lindstrom J. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 964–973.
18. Utkin Y.N., Kukhtina V.V., Kryukova E.V., Chiodini F., Bertrand D., Methfessel C., Tsetlin V.I. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 15810–15815.
19. Fischer M., Corringier P.-J., Schott K., Bacher A., Changeux J.-P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. P. 3567–3570.
20. Johnson D.S., Martinez J., Elgoyhen A.B., Heinemann S.F., McIntosh J.M. // *Mol. Pharmacol.* 1995. V. 45. P. 194–199.
21. Alexeev T., Krivoshein A., Shevalier A., Kudelina I., Telyakova O., Vincent A., Utkin Y., Hucho F., Tsetlin V. // *Eur. J. Biochem.* 1999. V. 259. P. 310–319.
22. Couturier S., Bertrand D., Matter J.M., Hernandez M.C., Bertrand S., Millar N., Valera S., Barkas T., Ballivet M. // *Neuron.* 1990. V. 5. P. 847–856.
23. Gerzanich V., Anand R., Lindstrom J. // *Mol. Pharmacol.* 1994. V. 45. P. 212–220.
24. Tsetlin V.I., Dergousova N.I., Azeeva E.A., Kryukova E.V., Kudelina I.A., Shibanova E.D., Kasheverov I.E., Methfessel C. // *Eur. J. Biochem.* 2002. V. 269. P. 2801–2809.
25. Lobel P.N., Kao P., Bircen S., Karlin A. // *J. Biol. Chem.* 1985. V. 260. P. 10605–10612.
26. Karlsson E. // *Experientia.* 1973. V. 29. P. 1319–1327.
27. Baumgarten H. // *J. Immunol. Methods.* 1986. V. 94. P. 91–98.
28. Servent D., Winckler D., Hai-Yan Hu, Kessler P., Drevet P., Bertrand D., Menez A. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 24279–24286.
29. Peng X., Katz M., Gerzanich V., Anand R., Lindstrom J. // *Mol. Pharmacol.* 1994. V. 45. P. 546–554.
30. Rangwala F., Drisdell R.C., Rakhilin S., Ko E., Atluri P., Harkins A.B., Fox A.P., Salman S.S., Green W.N. // *J. Neurosci.* 1997. V. 17. P. 8201–8212.
31. Клукас О., Пешенко И.А., Родионов И.Л., Телякова О.В., Уткин Ю.Н., Цетлин В.И. // *Биоорганическая химия.* 1995. Т. 21. С. 152–155.

## Sensitive Nonradioactive Screening for Compounds Interacting with Neuronal $\alpha 7$ Cholinergic Receptor

A. S. Korotina, E. V. Kryukova, E. A. Azeeva, A. F. Shevalier, Yu. N. Utkin, and V. I. Tsetlin<sup>#</sup>

<sup>#</sup> Phone/fax: +7 (095) 335-5733; e-mail: vits@ibch.ru

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

A sensitive nonradioactive method for detection of substances interacting with the neuronal nicotinic acetylcholine  $\alpha 7$ -type receptor (AChR) was proposed. The method uses biotinylated  $\alpha$ -cobratoxin (Bt-CTX) and is based on the ability of the N-terminal ligand-binding extracellular domain (LBED) of AChR to interact with  $\alpha$ -cobratoxin (CTX) as does the whole receptor. LBED was produced by heterologic expression of a gene fragment of the  $\alpha 7$  subunit of AChR from the rat brain in *Escherichia coli* cells sorbed on wells of a 96-well plate and incubated with Bt-CTX. The specifically bound Bt-CTX was determined by staining with streptavidin–peroxidase complex. The ability of other compounds to interact with  $\alpha 7$ -AChR was checked according to the degree with which they inhibit Bt-CTX binding to LBED. Nicotine, carbamylcholine, *d*-tubocurarin, anabaseine, conotoxin Iml, and neurotoxin II were used as model compounds. The sensitivity of this method was comparable with that of the radioligand method (up to 10 pmol). The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* biotinylated  $\alpha$ -cobratoxin, neuronal  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor, solid-phase screening method