



УДК 547.993.04

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФОТОАКТИВИРУЕМОГО ПРОИЗВОДНОГО
НЕЙРОТОКСИНА ЯДА СРЕДНЕАЗИАТСКОГО СКОРПИОНА
С МЕМБРАНАМИ КЛЕТОК НЕЙРОБЛАСТОМЫ***Гришин Е. В., Солдатов Н. М., Овчинников Ю. А.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва**Можжаева Г. Н., Наумов А. П., Зубов А. Н., Нисман Б. Х.**Институт цитологии Академии наук СССР, Ленинград*

Проведена химическая модификация нейротоксина M_{10} из яда среднеазиатского скорпиона *Vuthus eurus* 2,4-динитро-5-фторфенилазидом. Полученное фоточувствительное мономодифицированное производное токсина сохраняло высокий уровень биологической активности. Действие этого производного на натриевые каналы исследовано методом фиксации потенциала на мембранах клеток нейробластомы. Найдены значения констант связывания для нативного $[(1,64 \pm 0,40) \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}]$ и модифицированного $[(0,30 \pm 0,10) \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}]$ токсина. Установлено, что после фотоактивации происходит образование ковалентного комплекса токсин-канал. При подпиривании иодом-125 получено радиоактивно меченое фоточувствительное производное нейротоксина M_{10} , сохраняющее биологическую активность.

Быстрые натриевые каналы электровозбудимой мембраны играют определяющую роль при генерации нервного импульса. В настоящее время полностью отсутствуют какие-либо данные об их молекулярной организации, но предполагается, что они представляют собой трансмембранные образования с фармакологически различимыми функциональными фрагментами: ион-селективным фильтром и потенциалзависимым воротным механизмом [1]. Регуляторная функция воротного механизма может быть селективно нарушена нейротоксинами из яда скорпионов, которые замедляют процесс инактивации быстрых натриевых каналов [2]. Действие этих полипептидных нейротоксинов высокоспецифично, и константа диссоциации токсин-рецепторного комплекса находится в диапазоне $10^{-7} - 10^{-9} \text{ M}$ [3, 4]. Поэтому скорпионовые нейротоксины являются весьма эффективными инструментами изучения натриевых каналов как в функциональном, так и в структурном аспектах. Вместе с тем традиционные биохимические методы мало пригодны для выделения и исследования рецепторов этих нейротоксинов из-за низкого содержания каналов в мембране, а также вследствие зависимости рецепции от величины мембранного потенциала [3—5].

Одним из путей, позволяющих преодолеть указанные трудности, является прямое ковалентное связывание радиоактивно меченых фоточувствительных производных токсинов с рецепторами. При этом модификацию возбудимой мембраны можно проводить в нативных условиях, например на живой клетке. Настоящая работа посвящена синтезу биологически

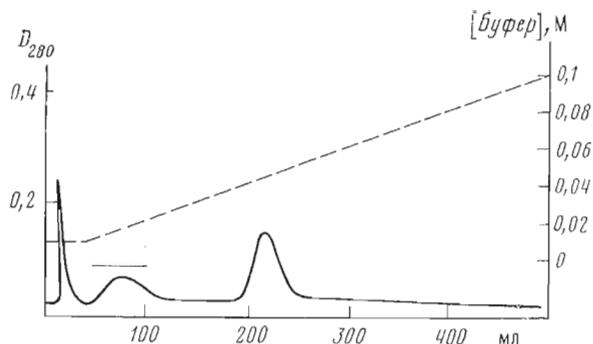


Рис. 1. Выделение модифицированного 2,4-динитро-5-фторфенилазидом токсина M_{10} хроматографией на биорексе 70 в градиенте ацетата аммония, pH 7,6. Отмечена фракция ДНФА- M_{10}

активного фоточувствительного производного нейротоксина M_{10} из яда среднеазиатского скорпиона *Buthus eupeus* [6, 7] и исследованию его взаимодействия с возбудимой мембраной культуры клеток нейробластомы клона N-18 A5 [8].

Для модификации нейротоксина M_{10} был выбран 2,4-динитро-5-фторфенилазид. Использование этого реагента обусловлено тем, что он взаимодействует со свободными аминогруппами аминокислот приблизительно в 2000 раз активнее, чем обычно применяемый для этих целей 3-нитро-4-фторфенилазид [9]. Поэтому реакцию модификации токсина M_{10} можно было проводить в достаточно мягких условиях, что несомненно способствовало сохранению его биологической активности. Действительно, взаимодействие токсина и 2,4-динитро-5-фторфенилазида в мольном соотношении 1 : 1 при pH 8,5 и 30° С за 12 ч приводит к образованию производного нейротоксина M_{10} (ДНФА- M_{10}) с выходом 4,5%. Повторная обработка реагентом в тех же условиях повышает выход до 11,5%. ДНФА- M_{10} удалось отделить от немодифицированного токсина и других продуктов реакции при хроматографии на биорексе 70 в линейном градиенте концентраций аммоний-ацетатного буфера (рис. 1). В спектре поглощения ДНФА- M_{10} наблюдаются две специфичные для динитрофенилазидной группы полосы поглощения: интенсивная при 355 нм и слабая при 410–415 нм. Полученное производное сохраняет высокий уровень токсичности при внутривенных инъекциях мышам [10], и потеря биологической активности не превышает 12%. По данным аминокислотного анализа, ДНФА- M_{10} содержит один модифицированный остаток лизина на молекулу токсина, причем N-концевой остаток валина сохранился свободным.

Действие ДНФА- M_{10} на натриевые каналы исследовали методом фиксации потенциала на мембране клеток нейробластомы [11, 12]. Подобно нативному токсину ДНФА- M_{10} замедляет инактивацию (спад) натриевого тока и делает ее, как правило, неполной (рис. 2 и 3). Таким образом, эффект ДНФА- M_{10} качественно подобен действию токсинов M_7 и M_8 из яда скорпиона *Buthus eupeus* [3, 13], токсинов скорпионов других видов [2, 14–17] и токсина II из яда *Anemonia sulcata* [18].

Для оценки доли модифицированных каналов и определения константы связывания (K_a) токсина с каналом измеряли разницу в кинетике инактивации нормальных и модифицированных каналов [3, 13]. При анализе использовали тестовые импульсы +60 мВ, поскольку кинетика инактивации натриевого тока при положительных потенциалах имеет наиболее простой вид [13, 19]. В среднем из 6 измерений, проведенных при фиксированном потенциале V_H , равном -80 мВ, K_a для ДНФА- M_{10} составляла $(0,30 \pm 0,10) \cdot 10^7 M^{-1}$, а для исходного M_{10} — $(1,64 \pm 0,40) \cdot 10^7 M^{-1}$ (\pm стандартное отклонение). Таким образом, модификация токсина M_{10} приводит

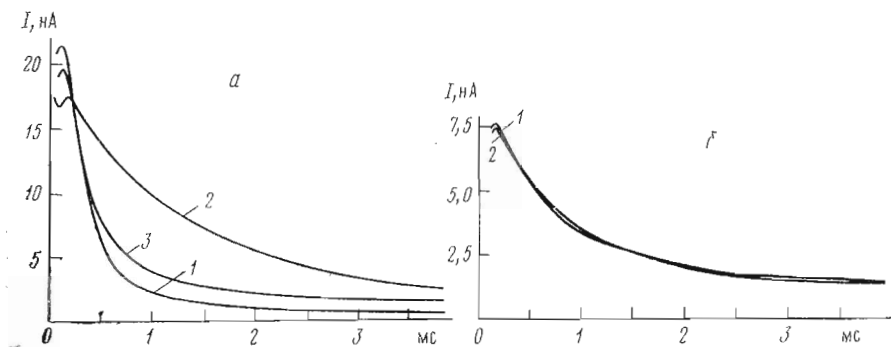


Рис. 2. Обращение эффекта модифицированного токсина ДНФА- M_{10} ($5 \cdot 10^{-7}$ M) на натриевые токи мембраны клетки нейробластомы при его удалении из внешнего раствора до (а) и после 12-минутного освещения (б). Указаны токи: а) 1 — до воздействия ДНФА- M_{10} , 2 — в присутствии токсина, 3 — после удаления токсина; б) 1 — в присутствии ДНФА- M_{10} , 2 — после его удаления из внешнего раствора. Натриевый внутренний раствор. $V_{H} -80$ мВ, $V_T +60$ мВ, $V_C -140$ мВ (100 мс). Температура 22° С. Клетка 301-79

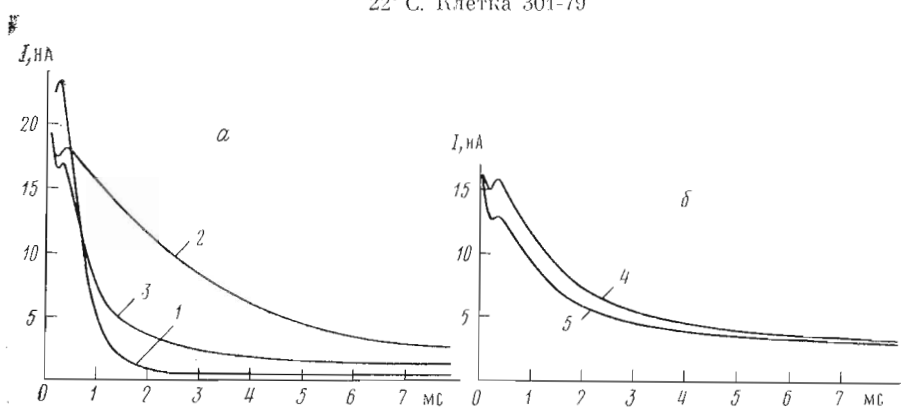


Рис. 3. Влияние длительных деполаризующих смещений мембранного потенциала на связывание токсина ДНФА- M_{10} (10^{-6} M) с натриевыми каналами клетки нейробластомы до (а) и после (б) 12-минутного освещения. Приведены токи: 1 — до воздействия токсина, 2 и 4 — в ответ на первый импульс длительностью 450 мс, 3 и 5 — в ответ на второй аналогичный импульс, приложенный через 550 мс после окончания первого. Натриевый внутренний раствор. $V_{H} -80$ мВ, $V_T +60$ мВ, $V_C -140$ мВ (140 мс). Температура 19° С. Клетка 272-79

к некоторому снижению его сродства к натриевым каналам, что, по-видимому, связано с незначительным уменьшением общего положительного заряда всей молекулы токсина M_{10} .

Анализ эффективности ковалентной модификации натриевых каналов мембраны клеток нейробластомы в условиях фиксации потенциала сводился к проверке обратимости эффекта ДНФА- M_{10} до и после освещения. Удаление токсина из внешнего раствора приводит за несколько секунд к значительному обращению эффекта. Так, в опыте, приведенном на рис. 2а, удаление ДНФА- M_{10} из внешнего раствора в темноте привело к ускорению спада натриевого тока, что соответствует диссоциации $\sim 80\%$ комплексов токсин — канал. Удаление токсина из внешнего раствора после 12-минутного освещения (рис. 1б) не вызывает сколько-нибудь заметного изменения кинетики инактивации натриевого тока. Это означает, что подавляющая часть комплексов токсин — канал после фотоактивации токсина не диссоциирует. В 12 опытах обращение эффекта ДНФА- M_{10} при отмывании мембраны до освещения составляло не менее 60%, а после 10—13 мин освещения УФ-светом с длиной волны ≥ 320 нм практически отсутствовало.

Интересно, что после освещения инактивация модифицированного канала несколько ускоряется, но в то же время значительно медленнее нормальной. Это, возможно, является дополнительным свидетельством того, что фотоиндуцируемая ковалентная модификация затрагивает именно фрагмент канала, отвечающий за процесс инактивации. Кроме того, освещение приводит к падению уровня натриевой проводимости, а иногда и к увеличению проводимости утечки. Оба эффекта выражены тем сильнее, чем длительнее освещение. Поэтому время освещения в опытах с фиксацией потенциала было ограничено 10—13 мин.

Известно [5, 20], что деполяризация мембраны также способствует диссоциации комплексов токсина — канал. Так, при больших положительных потенциалах для диссоциации достаточно доли секунды [3, 13]. Поэтому второй способ проверки эффективности ковалентной фотомодификации натриевых каналов заключался в сравнении влияния длинных деполяризующих смещений мембранного потенциала на эффект ДНФА- M_{10} до и после освещения. На рис. 3а представлены записи токов до освещения в ответ на два последовательно приложенных длительных деполяризующих импульса до +60 мВ. При этом было найдено резкое различие в ходе инактивации натриевого тока. Так, ток в ответ на первый импульс имеет кинетику инактивации, характерную для отравленных каналов, тогда как ток в ответ на второй импульс спадает гораздо быстрее — как до воздействия токсина. Эта разница объясняется тем, что за время первого импульса большая часть комплексов токсина — канал распадается и не успевает восстановиться в интервале между импульсами [3, 13]. После освещения разница между токами в ответ на первый и второй импульсы либо отсутствовала, либо сводилась к разнице амплитуд без изменения кинетики спада тока (рис. 3б). Уменьшение тока, возможно, связано с инактивацией, развивающейся во время первого импульса, которая более сильно выражена после освещения мембраны. Постоянство кинетики инактивации натриевого тока при последовательном приложении длительных деполяризующих импульсов свидетельствует о стабильности комплексов ДНФА- M_{10} — канал в условиях длительной деполяризации.

Следовательно, оба способа индуцирования диссоциации комплекса токсина ДНФА- M_{10} с натриевым каналом весьма эффективны до освещения и малоэффективны после освещения, приводящего к ковалентной модификации натриевого канала.

Для дальнейшего химического анализа ковалентномеченого рецептора необходимо было получить фотоактивируемое производное токсина, содержащее также и радиоактивную метку. Радиоактивный изотоп иод-125 наиболее удобен для получения производных белков с высокой удельной радиоактивностью. Предварительно с целью анализа биологической активности иодированного аналога ДНФА- M_{10} модификацию токсина проводили нерадиоактивным подистым натрием в мольном соотношении к ДНФА- M_{10} , равном 1,5:1, в присутствии лактопероксидазы [21]. Полученное производное (I-ДНФА- M_{10}) отделяли от продуктов реакции хроматографией на СМ-целлюлозе СМ-32 в линейном градиенте аммоний-ацетатного буфера. Биологическую активность I-ДНФА- M_{10} анализировали методом фиксации потенциала.

На рис. 4 показаны натриевые токи мембраны клетки нейробластомы до и после воздействия I-ДНФА- M_{10} в концентрации 10^{-6} М. Видно, что иодирующий токсин замедляет инактивацию натриевого тока, т. е. специфично связывается с натриевыми каналами приблизительно с той же эффективностью, что и неиодируемый токсин.

Радиоактивное производное ^{125}I -ДНФА- M_{10} получали с использованием Na^{125}I без носителя в соотношении к ДНФА- M_{10} , близком к эквимольному. Для предотвращения сорбции модифицированного токсина на стенках сосудов к элюату добавляли 0,1—0,2% бычьего сывороточного

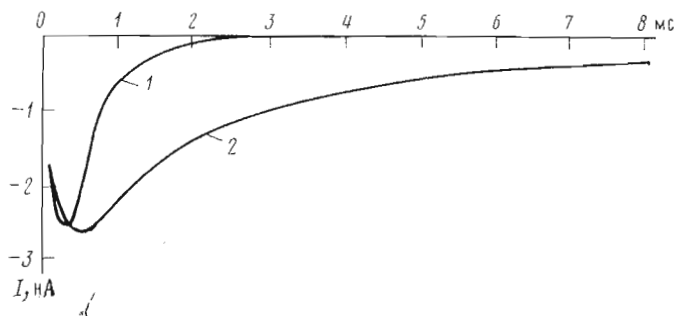


Рис. 4. Действие I-ДНФА- M_{10} на натриевые каналы клетки нейробластомы. Приведены натриевые точки до (1) и после (2) воздействия 10^{-6} М I-ДНФА- M_{10} . Калиевый внутренний раствор. V_H -80 мВ, V_T -10 мВ, V_C -140 мВ (100 мс). Температура 22° С. Клетка 280-79

альбумина. Удельная радиоактивность полученного ^{125}I -ДНФА- M_{10} составляла до 100 Ки/ммоль.

Таким образом, обработка нейротоксина M_{10} 2,4-динитро-5-фторфенилазидом приводит к образованию фоточувствительного производного с высоким уровнем биологической активности. При фотоллизе модифицированного токсина происходит ковалентная модификация быстрых натриевых каналов электровозбудимой мембраны. Йодирование ДНФА- M_{10} не вызывает снижения биологической активности, что свидетельствует о возможности применения ^{125}I -ДНФА- M_{10} для исследования молекулярной организации и выделения рецепторов токсина скорпиона, являющихся компонентами натриевых каналов.

Экспериментальная часть

2,4-Динитро-5-фторфенилазид (ДНФА) получали по модифицированному методу Вилсона и др. [9]. 245 мг 2,4-динитро-5-фторанилина (Serva, ФРГ) растворяли при охлаждении до -2°C в 2 мл конц. HCl . К полученному раствору за 10 мин по каплям добавляли 0,98 мл водного раствора 0,181 г NaNO_2 . Смесь перемешивали 10 мин при -2°C , разбавляли 1 мл воды и фильтровали через стеклянный фильтр GF/F (Whatman, Англия). Фильтрат перемешивали с 0,61 мл водного раствора 0,147 г NaN_3 10 мин при охлаждении в темноте. Кристаллы ДНФА отделяли фильтрованием, промывали 50 мл воды и сушили в токе воздуха. Выход ДНФА 230 мг (80%). УФ-спектр (этанол), λ_{max} : 207, 245, 268, 315 и 405 нм при соотношении интенсивностей соответственно 0,958 : 1 : 0,622 : 0,226 : 0,035. ИК-спектр (вазелиновое масло): 2130 и 2090 cm^{-1} . ДНФА хранили при 0°C в темноте над CaCl_2 .

Нейротоксин M_{10} выделяли из яда скорпиона *Buthus eupeus* как описано [6, 7]; молекулярный вес нейротоксина около 7000.

Получение ДНФА- M_{10} . К раствору 0,5 мкмоль нейротоксина M_{10} в 0,3 мл 0,1 М фосфатного буфера, pH 8,6, добавляли 0,51 мкмоль ДНФА в 35,6 мкл этанола. Смесь перемешивали 12 ч в темноте при 35°C , повторно добавляли 0,51 мкмоль ДНФА и перемешивали дополнительно 12 ч при 30°C . Обессоливание реакционной смеси проводили на колонке (1,5×40 см) с биогелом Р-2 (100–120 меш), уравновешенным 0,2 М уксусной кислотой. Белковую фракцию липофильно высушивали, растворяли в 2 мл 0,01 М аммоний-ацетатного буфера, pH 7,6, и наносили на колонку (1×6,5 см) с биорексом 70 (200–400 меш), уравновешенным тем же буфером (рис. 1). Элюцию проводили 30 мл 0,01 М ацетата аммония, pH 7,6, а затем линейным градиентом концентраций (от 0,01 до 0,1 М) этого буфера. Объем фракций 15,4 мл, скорость элюирования 37 мл/ч. Контроль за разделением осуществляли на приборе Uvicord II

(ЛКВ, Швеция) при 280 нм. Фракцию, соответствующую молярности буфера 0,017 М, объединяли и дважды лиофильно высушивали*. Выход ДНФА-М₁₀ составлял 11,5%. УФ-спектр (вода), $\lambda_{\text{макс}}$: 278,355, 412 нм.

Иодирование ДНФА-М₁₀. ДНФА-М₁₀ (2,8 нмоль) в 20 мкл 0,05 М фосфатного буфера, pH 7,3, смешивали с 20 мкл (2,5 мКи, 1,6 нмоль) Na¹²⁵I («Изотоп», СССР) и 2 мкл водной суспензии лактопероксидазы, 10 мг/мл (Boehringer-Mannheim, ФРГ). С интервалом в 1 мин к смеси добавляли 0,68 мМ H₂O₂ (5×5 мкл). Смесь разбавляли 100 мкл 0,05 М аммоний-ацетатного буфера, pH 5,5, и наносили на полиэтиленовую колонку с 3 мл СМ-целлюлозы СМ-32 (Whatman, Англия), уравновешенной тем же буфером, колонку промывали 0,05 М ацетатным буфером, pH 5,5, до тех пор, пока уровень радиоактивности в элюате не снизился до постоянного (~30 мл). Детекцию радиоактивности фракций объемом по 3 мл проводили счетчиком Гейгера «Thyas III» (Victoreen, США). ¹²⁵I-ДНФА-М₁₀ элюировали в линейном градиенте 0,05–0,3 М ацетата аммония, pH 5,5. Фракцию, отвечающую пику радиоактивности, собирали и дважды лиофильно высушивали. По данным измерения на гамма-счетчике Ultrogamma (ЛКВ, Швеция), удельная радиоактивность ¹²⁵I-ДНФА-М₁₀ составляла 38 Ки/моль без учета эффективности измерения. Для предотвращения сорбции модифицированного токсина на стенках сосудов к радиоактивному препарату добавляли 1 мг бычьего сывороточного альбумина (Serva, ФРГ). Помеченный I-ДНФА-М₁₀ для тестирования биологической активности в опытах с фиксацией потенциала получали по описанной выше методике с использованием нерадиоактивного NaI (ос.ч., «Союзреактив») в мольном соотношении к ДНФА-М₁₀, равном 1,5:1. Концентрацию токсинов определяли по данным аминокислотного анализа.

Аминокислотный анализ белковых образцов проводили, как описано ранее [7], на анализаторе аминокислот модели D-500 (Dugum, США).

Измерение ионных токов. Натриевые токи мембраны клеток нейробластомы N-18 А5 (средний диаметр 20–30 мкм) измеряли в методике фиксации потенциала, описанной ранее в работах П. Г. Костюка и др. [11], Н. С. Веселовского и др. [12]. При определении мембранного потенциала потенциал паружного раствора был принят за отсчетный. Постоянно поддерживаемый мембранный потенциал (V_{II}) обычно устанавливали на уровне –80 мВ. Натриевые токи измеряли в ответ на тестовые деполаризующие импульсы (V_T), которым предшествовали предимпульсы (V_C) до –140 мВ длительностью 100 мс.

Состав наружной среды: 140 мМ Na⁺, 2 мМ Ca²⁺, 5 мМ трис⁺ и 149 мМ Cl⁻. Для внутренней перфузии использовали натриевый или калиевый растворы, содержащие 5 мМ трис⁺, 140 мМ F⁻, 5 мМ Cl⁻ и 140 мМ Na⁺ или K⁺.

Токсины добавляли в наружный раствор. Для фотоактивации использовали осветитель ОИ-18, фокусируя луч на камере с клеткой. Свет пропускали через фильтр БС-6.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hille B. (1978) Biophys. J., 22, 283–294.
2. Okamoto H., Takahashi K., Yamashita N. (1977) Nature, 266, 465–467.
3. Можаяева Г. Н., Наумов А. П., Солдатов Н. М., Гришин Е. В. (1979) Биофизика, 24, 235–241.
4. Ray R., Morrow C. S., Catterall W. A. (1978) J. Biol. Chem., 253, 7307–7313.
5. Catterall W. A. (1977) J. Biol. Chem., 252, 8660–8668.
6. Grishin E. V., Soldatov N. M., Soldatova L. N., Ovchinnikov Yu. A. (1979) Toxicon, 17, supplement N 1, 60.
7. Гришин Е. В., Солдатова Л. П., Шахпаронов М. П., Казаков В. К. (1980) Биоорг. химия, 6, 714–723.
8. Беспалова М. А., Писман Б. Х., Мухина А. П., Игнатова Т. П., Туманова С. Ю. (1979) Вестн. Ленинградск. ун-та, № 15, вып. 3, 51–54.

* Все операции по выделению и очистке ДНФА-М₁₀ проводили в темноте.

9. Wilson D. F., Miyata Y., Erecińska M., Vanderkooi J. M. (1975) Arch. Biochem. and Biophys., 171, 104-107.
10. Гришин Е. В., Солдатов Н. М., Талимухамедов Б. А., Атакузиев Б. У. (1978) Биооргани. химия, 4, 450-461.
11. Kostyuk P. G., Krishtal O. A., Pidoplichko V. I. (1975) Nature, 257, 691-693.
12. Веселовский Н. С., Костюк П. Г., Крышталь О. А., Наумов А. П., Пидопличко В. И. (1977) Нейрофизиология, 9, 641-643.
13. Можаява Г. Н., Наумов А. П., Носырева Е. И. (1978) сб. «Механизмы действия зоотоксинов», № 6, 9-27.
14. Koppenhöfer E., Schmidt H. (1968) Pflügers Arch., 303, 133-149.
15. Narahashi T., Shapiro B. I., Deguchi T., Scuka M., Wang C. M. (1972) Amer. J. Physiol., 222, 850-857.
16. Romey G., Chicheportiche R., Lazdunski M., Rochat H., Miranda F., Lissitzky S. (1975) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 64, 115-121.
17. Bernard P., Courand F., Lissitzky S. (1977) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 77, 782-788.
18. Bergman C., Dubois J. M., Rojas E., Rathmayer W. (1976) Biochim. et biophys. acta, 455, 173-184.
19. Chiu S. Y. (1977) J. Physiol., 273, 573-596.
20. Catterall W. A., Ray R., Morrow C. S. (1976) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 73, 2682-2686.
21. Morrison M., Bayse G. S., Webster R. G. (1971) Immunochemistry, 8, 289-297.

Поступила в редакцию
2.XI.1979

INTERACTION OF THE PHOTOREACTIVE DERIVATIVE OF THE NEUROTOXIN FROM THE MIDDLE-ASIAN SCORPION VENOM WITH NEUROBLASTOMA CELL MEMBRANES

GRISHIN E. V., SOLDATOV N. M., OVCHINNIKOV Yu. A., MOZHAYEVA G. N.,
NAUMOV A. P., ZUBOV A. N., NISMAN B. Ch.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow; Institute of Cytology,
Academy of Sciences of the USSR, Leningrad*

2,4-Dinitro-5 fluorophenylazide has been used for modification of the neurotoxin M₁₀ from the venom of Middle-Asian scorpion *Buthus eupeus*. The resulted monosubstituted photosensitive neurotoxin derivative manifested a high biological activity. The action of the obtained derivative on sodium channels was analyzed by voltage clamp technique with the neuroblastoma cell membranes. The binding constants were estimated for both native and modified toxins. The irradiation was shown to result in the formation of a covalent toxin-channel complex. The [¹²⁵I]-labeled photosensitive derivative of the neurotoxin M₁₀ was obtained which retained the biological activity.