



УДК 591.145.2-544.088:577.354

НЕЙРОТОКСИН КАРАКУРТА И ЕГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ
С РЕЦЕПТОРАМИ ИЗ МОЗГА КРЫС

Ушкарев Ю. А., Гришин Е. В.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Из яда среднеазиатского паука каракурта *Latrodectus mactans tredecimguttatus* выделен пресинаптический нейротоксин, молекула которого состоит из двух идентичных субъединиц с молекулярной массой ~ 118 кДа. Установлено, что иодированное производное токсина связывается при 37°C синапсомембранными мембранами из мозга крыс с K_d $0,1$ нМ ($B_{\max}=0,1$ пмоль/мг мембранного белка), а при 5°C — с K_d $0,35$ нМ ($B_{\max}=0,2$ пмоль/мг мембранного белка). При промежуточных температурах детектируются оба типа токсин-рецепторных комплексов. Предполагается, что димерная форма нейротоксина взаимодействует с одним классом рецепторов, обладающих зависимой от температуры подвижностью в мембране. С помощью различных бифункциональных реагентов показано, что токсин взаимодействует с белком пресинаптической мембраны молекулярной массы 95 ± 10 кДа. Этот белок, а также белок молекулярной массы 71 кДа выделены методом биоспецифической хроматографии солюбилизованных мембран мозга крыс на сорбенте с иммобилизованным нейротоксином.

Одним из важнейших моментов в процессе синаптической передачи является управляемый выброс нейромедиатора из нервного окончания. Молекулярные механизмы секреции медиатора в настоящее время еще не выяснены, но известно, что некоторые нейротоксины способны эффективно воздействовать на этот процесс. Среди таких нейротоксинов особый интерес вызывают токсические компоненты из яда пауков рода *Latrodectus*, вызывающие массивный выброс медиатора из синаптического окончания [1—3]. Эти токсины действуют на все типы синапсов различных классов животных, что, вероятно, свидетельствует об универсальности соответствующих рецепторных компонентов, изучение которых позволит приблизиться к пониманию молекулярного механизма секреции нейромедиаторов.

Данная работа посвящена выделению нейротоксина из яда паука каракурта *Latrodectus mactans tredecimguttatus*, исследованию взаимодействия токсина с синапсомембранами из мозга крыс, а также изучению молекулярных характеристик его рецептора.

Первоначальное разделение цельного яда каракурта проводилось при помощи хроматографии на сефакириле S-300 SF при минимальной скорости элюции (рис. 1а). Обнаруженная в элюате высокотоксичная фракция S2 подвергалась дальнейшей очистке посредством хроматографии с рециклизацией на сефакириле S-300 SF (рис. 1б). В результате была получена фракция R2, содержащая до 85% нейротоксина, окончательная очистка которого достигалась анионообменной хроматографией на DEAE-сефарозе CL-6B в градиенте концентрации хлористого натрия (рис. 1в). По данным электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия, индивидуальный нейротоксин каракурта (НТК) представляет собой белок с молекулярной массой ~ 118 кДа. При анализе токсина в денатурирующих условиях методами электрофореза и гель-хроматографии было установлено, что в нативном состоянии молекула нейротоксина состоит из двух прочно связанных субъединиц с общей молекулярной массой ~ 230 кДа и изоэлектрической точкой 5,2. Выход токсина обычно составлял 5—8% от веса цельного яда, что соответствует 50—75% от его исходного содержания в яде, определенного тестированием на мышках и методом электрофореза (см. «Экспериментальную часть»). Потери токсина обусловлены его денатурацией при концентрировании.

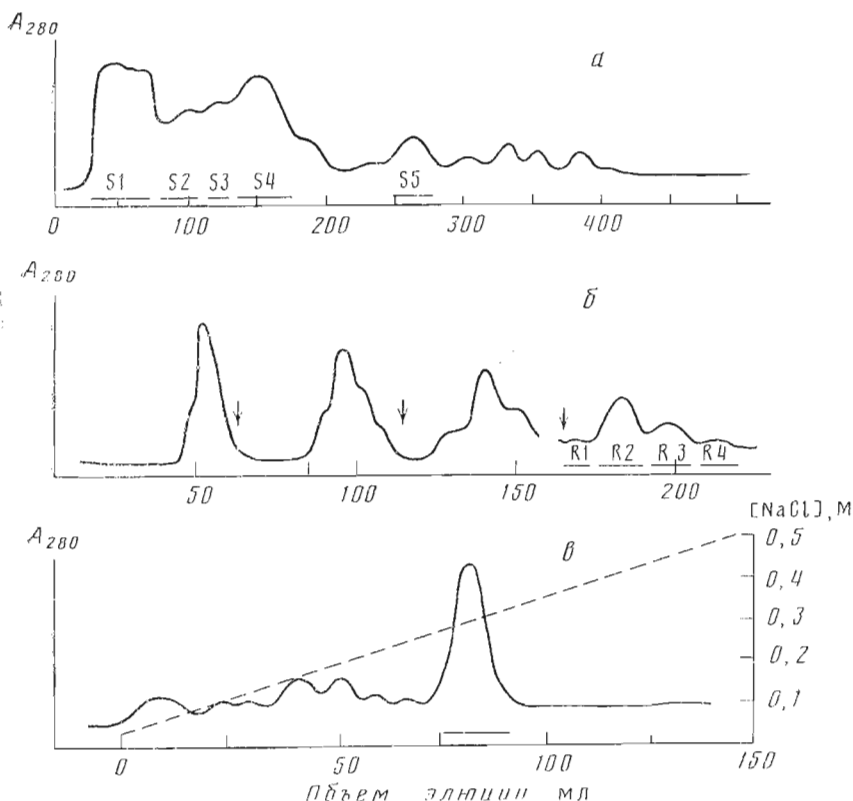


Рис. 1. Гель-фильтрация на сефакриле S-300 SF 200 мг цельного яда каракурта (колонка 1,5×200 см, скорость 3 мл/ч) (а) и фракции S2 (колонка 1×100 см, скорость 1,5 мл/ч) (б). Стрелки указывают начало нового цикла. в — ионообменная хроматография фракции R2 на DEAE-сефарозе CL-6B. Колонка 0,9×35 см, градиент концентрации NaCl (0,05—0,5 М), скорость 6 мл/ч. Отмечена фракция нейротоксина

Нейротоксин каракурта обладает высокой биологической активностью. Так, летальная доза этого токсина составляет 45 мкг/кг веса тела мышей (LD_{50} цельного яда ~ 700 мкг/кг). На нервно-мышечном препарате лягушки нейротоксин вызывает 1000—1500-кратное увеличение частоты миниатюрных потенциалов концевой пластинки и резкое повышение амплитуды вызванных потенциалов, что характеризует его как пресинаптический токсин.

По данным аминокислотного анализа, субъединица нейротоксина состоит из 1042 аминокислотных остатков: Asx — 150, Thr — 55, Ser — 58, Glu — 108, Pro — 32, Gly — 58, Ala — 81, $\frac{1}{2}$ Cys — 10, Val — 72, Met — 14, Ile — 70, Leu — 103, Tyr — 35, Phe — 48, His — 22, Lys — 74, Arg — 35 и Trp — 17. Было обнаружено, что в молекуле нейротоксина отсутствуют свободные сульфгидрильные группы и углеводные компоненты, а N-концевым аминокислотным остатком является изолейцин.

С целью исследования взаимодействия нейротоксина каракурта с рецепторными мембранными компонентами были получены его радиоактивные производные, содержащие иод-125. Иодирование токсина проводилось в присутствии хлорамина T и в зависимости от соотношения белок/иод удавалось получить радиоактивные производные с удельной активностью от 600 до 2800 Ки/ммоль. Предварительно было установлено, что нерадиоактивное иодированное производное токсина обладает такой же биологической активностью, как и нативный нейротоксин.

Изучение взаимодействия иодированного токсина с мембранами синантосом из мозга крыс осуществлялось методом быстрой фильтрации, позволяющим полностью и без нарушения равновесия отделять связанный токсин от свободного. Максимальное связывание радиоактивного производного токсина при 37°С достигалось через 10 мин после начала

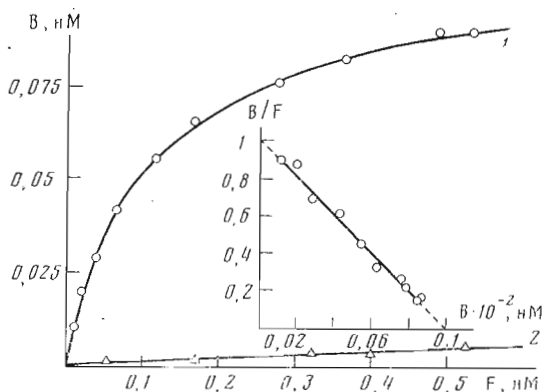


Рис. 2. Зависимость общего (1) и неспецифического (2) связывания иодированного нейротоксина каракурта ($[^{125}\text{I}]\text{НТК}$) синапсосомами из мозга крысы от концентрации $[^{125}\text{I}]\text{НТК}$. Концентрация белка синапсосом 0,5 мг/мл, температура 37°C . Неспецифическое связывание определяли в присутствии 200 нМ нативного нейротоксина (НТК). Вставка: рецепция $[^{125}\text{I}]\text{НТК}$ синапсосомами в координатах Скэтчарда. В — концентрация связанного $[^{125}\text{I}]\text{НТК}$, F — концентрация свободного $[^{125}\text{I}]\text{НТК}$

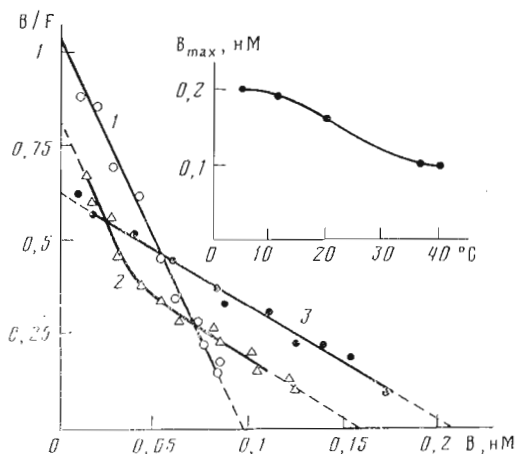


Рис. 3. Графики Скэтчарда для рецепции синапсосомами $[^{125}\text{I}]\text{НТК}$ при 37°C (1), 20°C (2) и 5°C (3). Вставка: зависимость максимального числа участков связывания токсина (B_{max}) от температуры инкубации. Концентрация синапсосомального белка — 0,25 мг/мл

инкубации, и это время было выбрано для всех дальнейших экспериментов в равновесных условиях. На рис. 2 представлена зависимость связывания меченого токсина синапсосомами мозга крысы от его концентрации при 37°C . При насыщающих концентрациях токсина неспецифическое связывание не превышало 5–6% от общего. Анализ этих результатов позволил установить значение константы диссоциации токсин-рецепторного комплекса ($K_d \sim 0,1$ нМ) и число участков связывания токсина ($B_{\text{max}} \sim 0,1$ пмоль/мг синапсосомального белка). Отсутствие точек перегиба на кривой связывания, построенной в координатах Скэтчарда (рис. 2), свидетельствует о существовании одного класса рецепторов нейротоксина. Подобные результаты были получены ранее для других нейротоксинов пресинаптического типа действия из яда *L. mactans* [4–6]. Однако при анализе рецепции при 20°C было обнаружено появление второго типа участков связывания (рис. 3) с меньшим сродством к токсину ($K_d \sim 0,3$ нМ). Дальнейшее понижение температуры сопровождалось возрастанием количества этих участков связывания. При 5°C детектировались только рецепторы с низким сродством, причем максимальное число участков связывания было в 2 раза выше, чем при 37°C . Установлено, что указанные температурные переходы полностью обратимы.

При исследовании стабильности токсин-рецепторного комплекса обнаружено, что его диссоциация зависит от температуры и является бифаз-

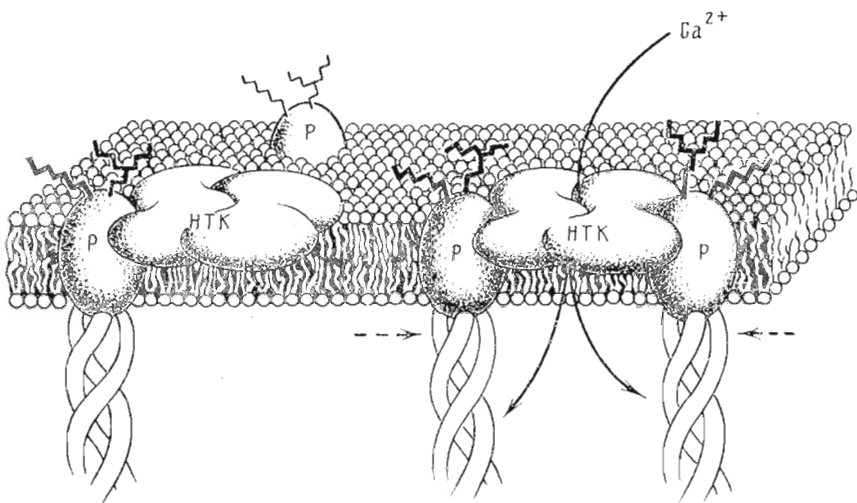


Рис. 4. Схематическое изображение взаимодействия димерных молекул нейротоксина (НТК) с рецепторами (Р) в пресинаптической мембране. Дломаными линиями изображены углеводные части молекул рецептора. Во внутриклеточном пространстве рецепторы контактируют с элементами цитоскелета (спиральные структуры). Пунктирные стрелки показывают иницируемое токсинами перемещение рецепторов в мембране. Сплошная линия — ток ионов кальция через канал, образуемый молекулой токсина в мембране

ной (константы скорости быстро и медленно диссоциирующих комплексов равны $1,3 \cdot 10^{-3}$ и $4,8 \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ соответственно).

Полученные данные могут быть интерпретированы как процесс взаимодействия димерных молекул токсина с одним классом подвижных в мембране рецепторов. При 37°C каждая молекула нейротоксина может связаться с двумя молекулами рецептора. Поэтому образующийся токсин-рецепторный комплекс характеризуется большей прочностью (низкой K_d) и меньшим числом участков связывания. При понижении температуры подвижность равномерно распределенных в мембране рецепторов ограничивается и становится возможным связывание токсина только с одной молекулой рецептора, что приводит к увеличению значения константы диссоциации и возрастанию числа участков связывания. При промежуточных температурах могут реализоваться оба типа комплексов, однако с течением времени равновесие смещается в сторону образования более прочных димерных комплексов токсина с рецептором (рис. 4).

Рецепция нейротоксина каракурта синапсосомами мозга крыс осуществляется в широком интервале значений pH и достигает максимума при pH 8,2. В свою очередь неспецифическое связывание резко возрастает при значениях pH ниже 5,5, что связано с преципитацией токсина в кислой среде.

В таблице приведены данные по влиянию различных веществ на рецепцию токсина каракурта. Так, связывание нейротоксина синапсосома-

Влияние различных веществ на рецепцию синапсосомами подпирванного токсина каракурта *

Вещество	Концентрация, мкМ	Рецепция токсина, %	Вещество	Концентрация, мкМ	Рецепция токсина, %
—	—	100	Фаллоидин	0,1	100
CaCl ₂	$5 \cdot 10^3$	150		5	81
Копкапавалин А	$10 \cdot 10^3$	205		$5 \cdot 10^2$	59
Лектин из зародышей пшеницы	10	74	Кольцицин	1	123
	10	26		$1 \cdot 10^2$	128
				$7 \cdot 10^3$	22

* Измерение проводили при концентрации синапсосомального белка 0,5 мг/мл, подпирванного токсина — 0,5 и 1 нМ.

ми весьма существенно зависит от концентрации ионов кальция в инкубационной среде и достигает максимума (150–200% от исходного уровня связывания) при добавлении 10 мМ хлористого кальция. При этом анализ рецепции по Скэтчарду показывает увеличение количества менее прочных токсин-рецепторных комплексов. По-видимому, ионы кальция подобно пониженной температуре уменьшают подвижность мембранных рецепторов, что приводит к связыванию с мембраной большого числа молекул нейротоксина. Дальнейший рост концентрации ионов кальция сопровождается постепенным падением специфического связывания токсина. Следует также отметить, что рецепция токсина каракурта осуществляется и в отсутствие ионов кальция, например при добавлении в инкубационную среду EDTA.

Весьма существенным влиянием на рецепцию нейротоксина обладают лектины. Так, лектин из зародышей пшеницы способен снижать связывание токсина на 74%, а конканавалин А — на 26%. Интересно отметить эффект веществ, воздействующих на микротубулярную систему нервного окончания. Колхицин при концентрации 10^{-6} М вызывает заметное увеличение числа мест связывания токсина, однако при повышении концентрации до $7 \cdot 10^{-3}$ М он не только ингибирует связывание на 70–80%, но и одновременно примерно в 2 раза уменьшает значение K_d токсин-рецепторного комплекса. Фаллоидин также снижает специфическое связывание токсина каракурта, но в отличие от колхицина не влияет на сродство нейротоксина к рецептору (таблица). Полученные результаты позволяют предположить участие цитоскелета нервного окончания в рецепции токсина каракурта.

На рис. 4 представлен гипотетический механизм действия нейротоксина каракурта. Токсин, связываясь с рецепторами в пресинаптической мембране, вызывает их кластеризацию. Последующий массивный вток ионов кальция через канал, образуемый нейротоксином в мембране [7], может приводить в действие сократительную систему клетки и запускать процесс секреции нейромедиатора.

Рецепция токсина каракурта отсутствовала в мембранных препаратах клеток печени, а в мембранах клеток сердца обнаруживалось не более 5 фмоль рецепторов/мг белка.

Для определения молекулярной массы рецепторных компонентов пресинаптической мембраны осуществлялась обработка комплексов нейротоксина с рецептором различными бифункциональными реагентами: диметилсуберимидатом, N,N'-дисукцинимидилсубералом, 3,3'-дитиобис(N-сукцинимидилпропионатом) и N,N'-дисукцинимидилтартратом. При этом в большинстве экспериментов наблюдалось образование 30–50% ковалентно сшитых токсин-рецепторных комплексов. Повышение температуры инкубации токсина с синапсосомами перед обработкой бифункциональными реагентами от 5 до 37°С приводило к уменьшению общего количества связанного токсина в 2 раза, но выход ковалентных токсин-рецепторных комплексов при этом повышался примерно в 1,7 раза. Эти результаты прямо подтверждают гипотезу о взаимодействии молекулы токсина с двумя молекулами рецептора, подвижность которого в мембране зависит от температуры. С помощью электрофоретического анализа было установлено, что ковалентный токсин-рецепторный комплекс обладает молекулярной массой ~210 кДа (рис. 5). Учитывая размер молекулы нейротоксина (118 кДа), молекулярная масса собственно рецепторных компонентов должна составлять ~92 кДа.

Аналогичные результаты были получены при использовании фоточувствительного аналога нейротоксина каракурта (НТК*). Иодированный токсин обрабатывался N-сукцинимидил-6-(4-азидо-2-нитрофениламино)гексаноатом, а образующееся биологически активное производное специфично связывалось при освещении с компонентом синапсосомальной мембран молекулярной массы ~95 кДа (рис. 5).

Для выделения рецепторов нейротоксина каракурта из мозга крыс применялась биоспецифическая хроматография на сорбенте с иммобилизованным токсином. В результате предварительных аналитических

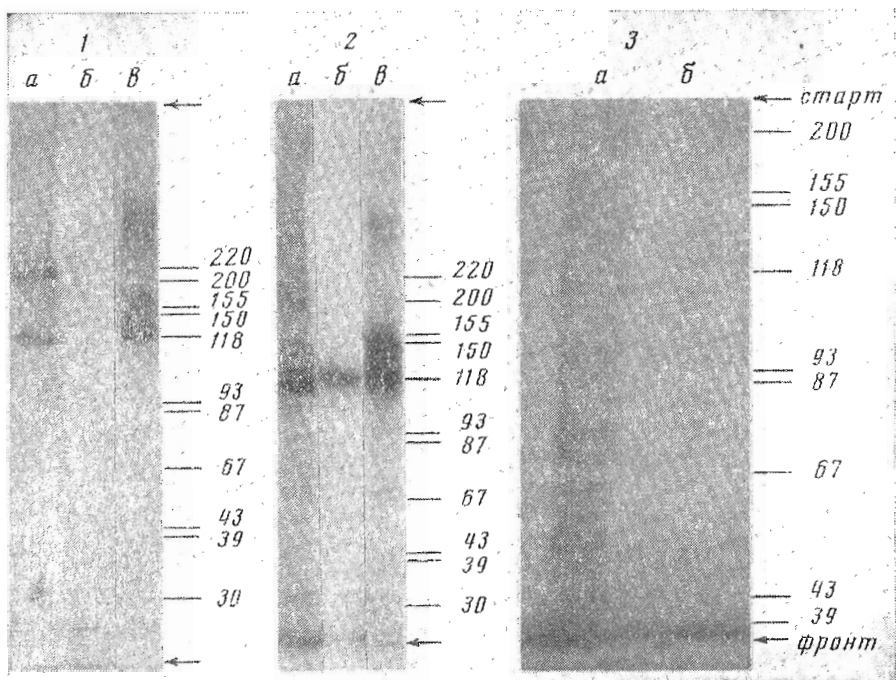


Рис. 5. Радиоавтографы гелей после диск-электрофореза (см. «Экспериментальную часть»). 1 — обработка 1 мМ N,N'-дисулцилдимидилсубератом мембран в присутствии 10 нМ [125 I]НТК (а), 10 нМ [125 I]НТК и 3 мкМ НТК (б); [125 I]НТК в отсутствие мембран (в); 2 — облучение при 254 нм мембран в присутствии 5 нМ [125 I]НТК* (а), 5 нМ [125 I]НТК* и 1 мкМ НТК (б); [125 I]НТК* в отсутствие мембраны (в). 3 — фракция, элюируемая с биоспецифического сорбента раствором НТК в отсутствие (а) и в присутствии (б) ингибиторов протениаз. Цифры указывают положение и молекулярные массы стандартных белков в тысячах дальтон

опытов было обнаружено, что для солиubilизации рецепторных компонентов наиболее целесообразно использовать луброл РХ. Детекция солиubilизированных рецепторов осуществлялась методом фильтрации на СМ-целлюлозных фильтрах СМ-82. Для облегчения идентификации рецепторов перед солиubilизацией мембранные препараты иодировались с помощью реактива Болтона — Хантера. Предварительная очистка солиubilизированных рецепторов проводилась посредством хроматографии на DEAE-сефарозе СЛ-6В. Полученный элюат немедленно пропускали через колонку с аффигелем 15, содержащим иммобилизованный токсин. После тщательной промывки колонки сорбированные рецепторы элюировались раствором нативного токсина каракурта. С помощью электрофореза в элюате был обнаружен только один белковый компонент, содержащий радиоактивную метку, с молекулярной массой 95 ± 10 кДа (рис. 5). Если проводить биоспецифическую хроматографию в отсутствие ингибиторов протениаз, в элюате обнаруживается также белковый компонент с молекулярной массой ~ 71 кДа (рис. 5).

В совокупности полученные результаты свидетельствуют о высокой специфичности рецепции нейротоксина каракурта в мозге млекопитающих, сложном характере взаимодействия токсина с пресинаптической мембраной и наличии в последней одного класса рецепторов с молекулярной массой ~ 95 кДа.

Экспериментальная часть

Лиофилизированный цельный яд каракурта получали из Ташкентского зоокомбината.

Выделение нейротоксина каракурта. Цельный яд (200 мг) растворили в 2 мл 0,05 М трис-НСl, рН 8,2. Нерастворимые частицы отделяли центрифугированием при 20 000 g в течение 30 мин на центрифуге J-21 В (Бек-

ман, США). Супернатант наносили на колонку (1,5×200 см) с предварительно отмученным сефакрилом S-300 SF (Pharmacia, Швеция), также уравновешенным в 0,05 М трис-НСl, рН 8,2 (буфер А). Элюцию проводили буфером А при скорости 3 мл/ч. Фракцию, токсичную для мышей (см. ниже), после концентрирования с помощью мембранного фильтра СХ-10 (Millipore, США) до объема 2 мл наносили на колонку (1×100 см) с сефакрилом S-300 SF и хроматографировали с рециклизацией при скорости 1,5 мл/ч. Токсичную фракцию далее разделяли на ДЕАЕ-сефарозе СL-6В (Pharmacia, Швеция), уравновешенной в буфере А (колонка 0,9×35 см), при элюции градиентом концентрации хлористого натрия (0,05→0,5 М) при скорости 6 мл/ч. Выделенный токсин обессомили на колонке (1,5×40 см) с сефадексом G-25 М (Pharmacia, Швеция) и хранили при 0° С в течение месяца.

Молекулярную массу белков определяли при помощи электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия на приборе модели 220 (Bio-Rad, США) по методике [8] в пластинках с градиентным (4–12%) разделяющим гелем и 4% концентрирующим гелем. Для приготовления гелей и проведения электрофореза использовали реактивы Bio-Rad (США). При определении молекулярной массы пользовались следующей смесью маркерных белков: миозин из мышц кролика (200 кДа) — Институт белка АН СССР, субъединицы РНК-полимеразы — β' (155 кДа), β (150 кДа), σ (87 кДа) и α (39 кДа) — ИБХ им. М. М. Шемякина АН СССР; тироглобулин (330 кДа), ферритин (220 кДа), фосфорилаза В (94 кДа), бычий сывороточный альбумин (67 кДа), каталаза (60 кДа), овальбумин (43 кДа), лактатдегидрогеназа (36 кДа) и карбоангидраза (30 кДа) — Pharmacia, Швеция.

Молекулярную массу нативного токсина определяли также при гель-хроматографии на сефакриле S-300 SF (см. выше) с использованием в качестве стандартов ферритина, гемоглобина человека, бычьего сывороточного альбумина и лизоцима (Serva, ФРГ).

Щелочной электрофорез в неденатурирующих условиях проводили на пластинках с градиентным (5–30%) гелем по методу [9]. По аналогичной методике проводили также электрофорез в присутствии 0,6% лубрولا РХ (Sigma, США).

Изоэлектрическое фокусирование полученных фракций проводили на приборе Multiphor 2117 (ЛКВ, Швеция) с использованием стандартных пластинок.

Определение биологической активности. Тестирование токсичных фракций на мышах осуществляли введением 0,1–50 мкг белка в растворе Рингера в хвостовую вену. Значение LD₅₀ определяли по методу Литчфильда и Уилкоксона [10], используя по 5 животных в каждой группе.

Нейротоксическое действие токсина каракурта исследовали на нервномышечных препаратах лягушки (*musculus sartorius*). В камеру объемом 5 мл добавляли 0,5–50 мкг белка. Постсинаптические потенциалы мышечного волокна регистрировали с помощью стеклянных микроэлектродов с сопротивлением 5–15 МОм, усилителя УТП-2, осциллографа С-1-18 и фоторегистратора ФОР-2 (СССР).

N-Концевую аминокислоту определяли в виде Dns-производного по модифицированному методу Грэй [11] и идентифицировали с помощью микротонкослойной хроматографии на силикагеле [12] или микрополиамидных пластинках F 1700 [13].

Аминокислотный состав нейротоксина определяли на аминокислотном анализаторе модели D-500 (Durrum, США) после 24, 48 и 72 ч гидролиза в 5,7 н. НСl (Pierce, США). Содержание остатков триптофана находили спектрофотометрически по поглощению при 280 нм, используя молярные коэффициенты поглощения остатков триптофана и тирозина — 5579 и 1200 М⁻¹см⁻¹ соответственно. Титрование свободных сульфгидрильных групп осуществляли с помощью 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислоты) [14].

Иодирование нейротоксина каракурта. Радиоактивное производное токсина получали по методу [15]. Для этого к 50–100 мкл раствора

токсина (0,1–0,3 нмоль) в буфере А добавляли 10–20 мкл Na^{125}I (1 мКи, «Изотоп», СССР) и 10–20 мкл свежеприготовленного раствора хлораминина Т в воде (20 нмоль). Реакционную смесь перемешивали прокачиванием через пластиковый капилляр не более 1,5 мин, после чего реакцию останавливали добавлением 20 мкл $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (5 мг/мл) и 50 мкл NaI (20 мг/мл). Полученную смесь наслаивали на биогель Р-4 (100–200 меш, Bio-Rad, США) в пластиковой колонке (0,6×20 см), уравновешенной в буфере А. Через сорбент для уменьшения адсорбции токсина предварительно пропускали 1% раствор бычьего сывороточного альбумина в том же буфере. Элюцию проводили при скорости 4 мл/ч. Радиоактивность фракций объемом 100 мкл измеряли на гамма-счетчике Ultrogamma (ЛКВ, Швеция) в течение 1 мин. Удельная радиоактивность получаемых препаратов нейротоксина составляла 600–2800 Ки/ммоль. Для получения нерадиоактивного производного токсина реакцию йодирования проводили в тех же условиях, но количество всех реагентов увеличивали в 20 раз, а также использовали холодный NaI (ос.ч., Союзреактив).

Концентрацию белка во всех фракциях определяли по методу Бредфорда [16] с использованием готового реактива (Bio-Rad, США) или спектрофотометрически (ϵ $136 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). В препаратах мембран и радиоактивного токсина концентрацию белка определяли по методу Лоури [17] с осаждением белка 7,5% раствором трихлоруксусной кислоты в воде.

Выделение синапсом и препаратов плазматических мембран. Синапсомы получали из мозга крыс по методу [18], а фракцию плазматических мембран гепатоцитов — как описано в [19]. Мембраны клеток сердца крыс выделяли по методике [20]. Буферные растворы на всех стадиях выделения содержали ингибиторы протеиназ: фенилметансульфонилфторид (0,1 мМ), иодацетамид (1 мМ), *o*-фенантролин (1 мМ), пепстатин (1 мкМ) и EDTA (1 мМ).

Исследование взаимодействия нейротоксина с мембраной синапсом проводили в буфере Б, содержащем 50 мМ трис-НСI (рН 8,2), 100 мМ NaCl и 0,32 М сахарозу. Порции суспензии синапсом (250 мкл, 0,25 мг белка/мл) инкубировали с 0,001–50 нМ меченым токсином при 5, 10, 20 или 37° С. В контрольном эксперименте для определения неспецифического связывания в инкубационную среду добавляли нативный токсин до концентрации 200 нМ. Через 10 мин после начала инкубации для отделения свободного токсина проводили фильтрацию суспензии через стеклянные фильтры GF/F (Whatman, Англия) на приборе FH 224v (HSI, США) при давлении 15 мм рт. ст. Фильтры предварительно вымачивали в течение 1 сут в буфере Б, содержащем 1% бычьего сывороточного альбумина. Перед нанесением аликвот суспензии (по 200 мкл) на фильтры наслаивали по 3 мл инкубационного буфера Б, охлажденного до 0° С. После включения вакуума фильтры промывали два раза по 3 мл буфера Б. Радиоактивность фильтров, помещенных в пластиковые флаконы, измеряли на гамма-счетчике. Для определения концентрации свободного йодированного токсина (F) проводили также измерение радиоактивности аликвот фильтрата. Для расчета параметров рецепции на ЭВМ HP-3000 (Hewlett-Packard, США) использовали программу, описанную ранее в работе [21]. Для исследования влияния различных веществ на рецепцию токсина каракурта применяли описанную выше методику с добавлением в инкубационную среду определенного количества указанного вещества (таблица).

Для изучения кинетики диссоциации токсин-рецепторных комплексов к суспензии синапсом, преинкубированных с 0,1 нМ йодированным токсином, добавляли нативный токсин до концентрации 100 нМ, аликвоты смеси анализировали фильтрацией через каждую минуту в течение 30 мин. Константу скорости диссоциации комплексов определяли по формуле $k_{-1} = -2,303 \cdot \text{tg } \alpha$, где α — угол наклона прямолинейного участка графика зависимости логарифма концентрации связанного токсина от времени.

Ковалентные токсин-рецепторные комплексы получали обработкой

синапсом (1 мг белка/мл) различными бифункциональными реагентами — диметилсуберимидатом, N,N'-дисукцинимидилсубератом, 3,3'-ди-тиобис(N-сукцинимидилпропионатом) или N,N'-дисукцинимидилтартра-том (Pierce, США) — в присутствии иодированного нейротоксина. Синапсомы преинкубировали 10 мин с 10 нМ иодированным токсином в Na-фосфатном буфере, pH 8,0, содержащем 0,1 М NaCl и 0,32 М сахарозу (буфер В). Бифункциональные реагенты добавляли в виде раствора в ацетонитриле или диметилформамиде в количестве не более 5% от объема инкубационной суспензии до конечной концентрации 0,25–3 мМ. После 1–1,5 ч инкубации при 5, 20 или 37° С непрореагировавшие активированные эфиры гидролизировали добавлением 0,5 М трис-HCl, pH 8,2. Затем к образцам добавляли 300-кратный избыток нативного токсина и отбирали аликвоты для определения связывания методом фильтрации. Модифицированные мембраны осаждали центрифугированием при 18 000 g в течение 30 мин и анализировали методом электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия.

Модификация рецепторов фотоактивируемым аналогом токсина. Для получения фоточувствительных производных нейротоксина каракурта к раствору иодированного токсина (10 пмоль) в 1 мл фосфатного буфера, pH 8,0, добавляли в темноте при 20° С 0,01–2 нмоль N-сукцинимидил-6-(4-азидо-2-нитрофениламино)гексаноата (Pierce, США). Через 3 ч к реакционной смеси добавляли 200 мкл 0,5 М трис-HCl, pH 8,2, и диализовали против буфера А в течение 1 сут в темноте при 4° С. Биологическую активность полученных производных токсина (НТК') определяли связыванием с синапсомами в темноте. С целью фотомодификации мембраны (1 мг белка/мл) облучали при 254 нм в течение 1–2 мин в присутствии 1–10 нМ фоточувствительного производного токсина и 3 мМ β-меркаптоэтанола в качестве гасителя свободных радикалов при 5° С. После облучения мембраны осаждали центрифугированием и анализировали электрофорезом в денатурирующих условиях.

Солюбилизацию рецепторов токсина каракурта осуществляли инкубацией синапсом в течение 5–120 мин в 0,02 М Na-фосфатном буфере, pH 8,0, содержащем 0,2–1,2% луброла РХ или тритона X-100. Мембраны отделяли от солюбилизата центрифугированием при 30 000 g в течение 30 мин при 4° С, после чего супернатант разбавляли буфером для снижения концентрации детергента до 0,1%.

Детекция связывания иодированного токсина с солюбилизованными рецепторами. Аликвоты супернатанта после солюбилизации синапсом инкубировали с 0,01–5 нМ меченым токсином в 0,02 М Na-фосфатном буфере (pH 8,0), 0,1% луброла РХ (буфер Г). Аликвоты инкубационной смеси (по 5–20 мкл) через 20 мин наносили на вымоченные в буфере СМ-целлюлозные фильтры СМ-82 (Whatman, Англия), затем фильтраты промывали 6 мл того же буфера. Радиоактивность определяли в гамма-счетчике. Для контроля неспецифического связывания в инкубационную смесь в параллельном эксперименте добавляли 500 нМ холодный токсин.

Биоспецифическая хроматография солюбилизованных рецепторов. Для получения биоспецифического сорбента 2 мл аффигеля 15 (Bio-Rad, США) промывали изопропанолом и ледяной водой, а затем добавляли к 2,5 мг нейротоксина в 5 мл 0,1 М Na₂CO₃, pH 8,0, содержащего 0,1 М NaCl. Суспензию встряхивали 1 ч при 20° С, после чего добавляли 1 М раствор глицина, pH 8,0. Гель промывали буфером, содержащим 0,8% луброла РХ.

Для иодирования белков синапсомальных мембран 800 мкл суспензии синапсом (5 мг общего белка) в буфере В добавляли к сухому осадку N-сукцинимидил-3-(4-окси-[²¹⁵I]иодфенил)пропионата (1 мКи; Amersham, Англия). Пробирку встряхивали 16 ч при 4° С. После добавления к модифицированным мембранам 100 мкл 1 М ацетата аммония, pH 8,0, синапсомы осаждали центрифугированием при 18 000 g в течение 30 мин при 4° С. Солюбилизацию рецепторов проводили, как описано выше. Солюбилизат (10 мл, 0,3 мКи) в буфере Г пропускали через

колонку с 10 мл DEAE-сефарозы CL-6B, уравновешенной в том же буфере. Элюат сразу же нанесли на колонку с 1 мл биоспецифического сорбента при скорости 0,5 мл/ч. Колонку быстро промывали 20 мл буфера Г, содержащего 0,5 М NaCl, а затем элюировали 2 мл раствора токсина (0,2 мг/мл того же буфера) при скорости 0,5 мл/ч. Элюат анализировали методом электрофореза. Гели, полученные после электрофоретического анализа, высушивали и экспонировали на рентгеновскую пленку РТ-1 в течение 5 сут с усиливающим экраном.

Авторы выражают благодарность акад. Ю. А. Овчинникову за постоянное внимание к данной работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Longenecker H. E. Jr., Hurlbut W. P., Mauro A., Clark A. W. *Nature*, 1970, v. 225, № 5234, p. 701-703.
2. Frontali N. *Brain Res.*, 1972, v. 37, № 1, p. 146-148.
3. Grasso A., Senni M.-I. *Eur. J. Biochem.*, 1979, v. 102, № 2, p. 337-344.
4. Tzeng M.-C., Siekevitz P. J. *Neurochem.*, 1979, v. 33, № 1, p. 263-274.
5. Grasso A., Ruffini S., Senni M.-I. *Proc. Int. Soc. Neurochem.*, 1977, v. 6, № 4, p. 352-358.
6. Meldolesi J. J. *Neurochem.*, 1982, v. 38, № 6, p. 1559-1569.
7. Соколов Ю. В., Ушкарев Ю. А., Грассо А., Гришин Е. В., Лышко В. К. *Укр. биохим. журн.*, 1983, т. 55, № 2, с. 179-184.
8. Mahadic S. P., Korenovsky A., Rapport M. M. *Anal. Biochem.*, 1976, v. 76, № 2, p. 615-633.
9. Lambin P., Fine J. M. *Anal. Biochem.*, 1979, v. 98, № 1, p. 160-168.
10. Бельский Л. М. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Л.: Гос. изд-во мед. лит-ры, 1963, с. 81.
11. Gray W. P. *Meth. Enzymol.*, 1967, v. XI, p. 469-475.
12. Бельский В. Г., Гапкина Э. С., Нестеров В. В. *Докл. АН СССР*, 1967, т. 172, № 1, с. 91-93.
13. Арутюнян А. А., Северин Е. С., Варшавский Я. М. *Биохимия*, 1975, т. 40, вып. 4, с. 878-884.
14. Ellmann G. L. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1959, v. 82, № 1, p. 70-77.
15. Hunter W. M., Greenwood F. C. *Nature*, 1962, v. 194, № 4827, p. 495-496.
16. Bradford M. M. *Anal. Biochem.*, 1976, v. 72, № 1, p. 248-254.
17. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. *J. Biol. Chem.*, 1951, v. 193, p. 265-275.
18. Abita J.-P., Chicheportiche R., Schweitz H., Lazdunsky M. *Biochemistry*, 1977, v. 16, № 9, p. 1838-1844.
19. Ray T. K. *Biochim. et biophys. acta*, 1970, v. 196, № 1, p. 1-9.
20. Saccotani G., Spenney J. G., Urry D. W., Sachs G. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1973, v. 6, № 6, p. 505-521.
21. Гришин Е. В., Ефремов Е. С., Солдатов Н. М., Подрезова Е. И., Петренко А. Г. *Биоорг. химия*, 1980, т. 6, № 4, с. 576-584.

Поступила в редакцию
25.VI.1985

BLACK WIDOW SPIDER NEUROTOXIN AND ITS INTERACTION WITH RAT BRAIN RECEPTORS

USHKARYOV Yu. A., GRISHIN E. V.

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

A presynaptic neurotoxin isolated from the venom of the Central Asia spider karakurt (Black Widow Spider, *Latrodectus mactans tredecimguttatus*) is shown to consist of two identical subunits of mol. weight about 118 kDa. The iodinated neurotoxin binds to the rat brain synaptosomal plasma membranes with K_d 0,1 nM (B_{max} 0,1 pmol/mg of protein) at 37° C, and with K_d 0,35 nM (B_{max} 0,2 pmol/mg of protein) at 5° C. At intermediate temperatures both types of receptors are detectable. It is supposed that the dimeric form of the toxin interacts with a single class of receptors possessing lateral mobility in the membrane. By the use of different bifunctional reagents it is revealed that the neurotoxin interacts with a presynaptic membrane protein of mol. weight 95 kDa. A protein of the same size accompanied by a 71 kDa protein was isolated by the affinity chromatography of solubilized synaptosomal membranes on the absorbent, containing immobilized neurotoxin.