



ДЕЙСТВИЕ ПРОТЕАЗ И ФОСФОЛИПАЗЫ A_2 НА МЕМБРАНО-СВЯЗАННЫЙ МУСКАРИНОВЫЙ ХОЛИНОРЕЦЕПТОР МОЗГА КРЫС

КЭЭМБРЕ Т. А., ЛАНГЕЛ Ю. Л., РИНКЕН А. А.,
ТЯХЕНЫЦА Л. Я., ЯРВ Я. Л.

Кафедра биохимии и органической химии Тартуского государственного университета

Изучалась доступность мембраносвязанного мускаринового холинорецептора коры больших полушарий мозга крыс протеолитическим ферментам — α -химотрипсину и трипсино. Найдено, что по скорости инактивации рецептора под действием этих протеаз можно различать два типа рецепторных участков. Сравнительно быстро инактивируется 60–70% от общего числа рецепторных участков, определяемых по специфическому связыванию 3H-хиноклидинилбензилата с мембранами мозга. Остальные рецепторные участки оказались стабильными в присутствии протеаз. Обнаруженные две популяции рецепторных участков различаются по своим связывающим свойствам в реакции с агонистом карбамилхолином. Эффективность связывания антагониста хиноклидинилбензилата с обоими классами рецепторов одинакова. Одновременно с протеазами изучали также влияние фосфолипазы A_2 на активность связанного с мозговыми мембранами мускаринового холинорецептора. Оказалось, что активность рецептора зависит от состояния и структуры липидной части мембран и полностью исчезает при инкубации мембранной суспензии с фосфолипазой.

Исследование взаимодействия ацетилхолина и ряда других типичных холиномиметиков с мембранным мускариновым холинорецептором свидетельствует о гетерогенности популяций рецепторных участков [1]. Обычно разделяют два класса центров связывания, которые с неодинаковой эффективностью взаимодействуют с молекулой агониста [1]. Однако в экспериментах по выявлению меченных ковалентно с радиоактивными лигандами рецепторных белков было установлено, что в условиях SDS-электрофореза метка обнаруживается только в одной белковой фракции, соответствующей молекулярной массе 80 кД. [2], что трудно истолковать в свете представления о гетерогенности рецепторного белка. В связи с этим наблюдаемые в опыте разные связывающие свойства рецепторных участков можно объяснить существованием некоторых конформационных состояний рецепторного белка, характеризующихся неодинаковым средством в реакции с агонистами [3]. Такие модели широко обсуждены в литературе [4]. Равновесие между разными конформациями рецептора, по-видимому, смещается очень медленно и практически не

меняется во время опытов по связыванию лигандов [5]. В обсуждении вопросов о разных конформационных состояниях мускаринового холинорецептора необходимо также учесть, что этот белок тесно интегрирован в липидный бислой синаптических мембран. Возможно, неодинаковая локализация рецепторов в мембранах влияет на связь рецепторного белка с липидной структурой, что может привести к изменению связывающих свойств.

С целью уточнения локализации мускаринового холинорецептора в структуре мозговых мембран в настоящей работе изучали кинетику действия двух протеаз— α -химотрипсина и трипсина на рецепторный белок. При этом предполагалось, что скорость разложения связанного с мембраной белка определяется его экспозицией во внешнюю среду, где он доступен растворимым в воде протеазам. Одновременно было изучено действие тех же протеаз на связанную с мозговыми мембранами АХЭ. Этот фермент локализован в синаптических мембранах рядом с холинорецептором [6], однако в отличие от него находится на поверхности липидного бислоя [7].

Материалы и методы

Препарат мембраносвязанного мускаринового холинорецептора коры больших полушарий мозга крыс получали, как описано ранее [8]. Концентрацию активного рецептора определяли по специфическому связыванию ^3H -1-хиноклидинилбензилата ($32 \text{ К}_\mu/\text{ммоль}$, «Amersham», Англия) с микросомной фракцией мозговых мембран, используя метод фильтрации проб стекло-фиберными фильтрами CF/B («Whatman», Англия). Растворы α -химотрипсина («Реакхим», СССР), трипсина («Srofa», ЧССР) и фосфолипазы A_2 (выпускаемый ИХБФ АН ЭССР препарат) изготовляли непосредственно перед использованием в $0,05 \text{ M}$ фосфатном буфере, pH 7.4.

В опытах с мускариновым холинорецептором к мембранной суспензии добавляли необходимое количество раствора ферментов (конечная концентрация от $1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ до $5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) и полученную смесь инкубировали при 25° . Из нее отбирали при тщательном перемешивании пробы, к которым добавляли меченый хиноклидинилбензилат до конечной концентрации 2 нМ . Затем полученный раствор инкубировали дополнительно при 25° в течение 45 мин. После этого пробы разбавляли в 10 раз холодным фосфатным буфером ($0,05 \text{ M}$, pH 7.4) и немедленно пропускали через стекло-фиберные фильтры для определения общего связывания хиноклидинилбензилата с мембранами. Таким же путем в присутствии 2 мкМ атропина сульфата («Merck», ФРГ) определяли из параллельных опытов величину неспецифического связывания этого радиоактивного лиганда с мозговыми мембранами. Специфическое связывание было вычислено из разницы между общим и неспецифическим связыванием [8].

В этой же суспензии мозговых мембран определяли также активность мембраносвязанной АХЭ, измеряя скорость ферментативного гид-

ролиза ацетилтихолина спектрофотометрически в присутствии 0,3 мМ 5,5'-дитиобис (2-нитробензойной кислоты) в реакционной среде [9]. Реакции проводили в 1 см термостатированных кюветках на спектрофотометре «Perkin Elmer 402». В опытах с протеазами и фосфолипазой А₂ суспензию мозговых мембран инкубировали в присутствии ферментов, как описано выше. В нужные моменты времени из инкубационной смеси отбирали при тщательном перемешивании растворы пробы, которые разбавляли в фосфатном буфере для установления остаточной активности АХЭ.

Определение белка в использованных препаратах мозговых мембран проводили методом Lowry [10]. Связанный в стекло-фиберных фильтрах белок определяли в объеме до 5 мл. При этом фильтры тщательно гомогенизировали в растворе Фоллина, добавляли необходимые реагенты, и уже готовый к измерению раствор очищали от кусков стекло-фиберных волокон фильтрацией через бумажные плотные фильтры («Filtrex», ГДР). В качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин («Reanal», ВНР).

Связывающие свойства мускаринового холинорецептора в реакции с ³H-хиноклидинилбензилатом определяли, изучая зависимость специфического связывания лиганда от его концентрации [8]. Связывание рецептора с агонистом карбамилхолином («Merck», ФРГ) исследовали методом вытеснения ³H-хиноклидинилбензилата, как описано в работах Yamatuga и Snyder [11] и Kloog, Sokolovsky [12]. В этом случае к препарату рецептора добавляли разные количества агониста и через 30 мин в эти же пробы вводили раствор ³H-хиноклидинилбензилата до концентрации 0,11 нМ, что ниже K_d для этого лиганда [8]. После установления равновесного состояния пробы пропускали через стекло-фиберные фильтры и определяли связанную с рецепторными участками радиоактивность. Зависимость концентрации связанного с мембранами хиноклидинилбензилата от концентрации конкурирующего с ним агониста характеризует эффективность связывания последнего в активном центре рецептора.

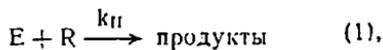
Результаты и обсуждение

Инкубация препарата мембраносвязанного мускаринового холинорецептора с α-химотрипсином и трипсином приводила к уменьшению специфического связывания ³H-хиноклидинилбензилата с мозговыми мембранами (рис. 1). Инактивация рецептора не являлась, однако, полной, и в случае обенх протеаз сохранялась до 40% от исходного уровня специфического связывания радиоактивного антагониста. При более длительной инкубации этой сравнительно стабильной фракции рецептора можно было наблюдать уменьшение концентрации рецепторных участков, однако скорость этого процесса практически совпадала со скоростью спонтанной инактивации, подробно изученной нами ранее [8].

Обработка мозговых мембран с протеолитическими ферментами не влияла на эффективность комплексообразования хиноклидинилбензила-

та с рецептором и наблюдаемое в эксперименте уменьшение специфического связывания отражает изменение концентрации рецепторных участков (рис. 2). Так, для частично инактивированного протеазами препарата рецептора получено $K_d = 0,16 \pm 0,04$ нМ и для исходного препарата $K_d = 0,15 \pm 0,03$ нМ.

На основе анализа кинетики инактивации мускаринового холинорецептора (R) под действием протеаз (E) этот процесс был описан следующей кинетической схемой:



При постоянной концентрации протеаз уменьшение активности рецептора описывается кинетическим уравнением реакции первого порядка:

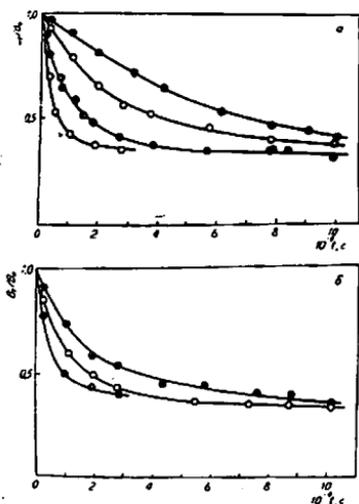


Рис. 1.

Рис. 1. Изменение активности мускаринового холинорецептора (V_t и V_0 —специфическое связывание ^3H -хиноклидинилбензилата с мембранами в начале опыта и в момент времени t) при обработке α -химотрипсином (а) и трипсином (б). Концентрации ферментов $1 \cdot 10^{-5}$ М, $5 \cdot 10^{-6}$ М, $1 \cdot 10^{-5}$ М и $5 \cdot 10^{-5}$ М

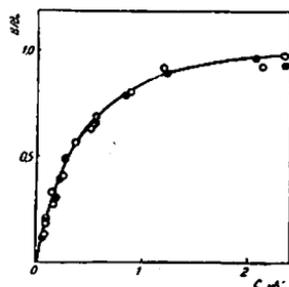


Рис. 2.

Рис. 2. Связывание ^3H -хиноклидинилбензилата с мозговыми мембранами до (●) и после (○) обработки с $5 \cdot 10^{-5}$ М раствором α -химотрипсина

$$\ln \frac{V_0 - V_t}{V_0 - V_\infty} = -k \cdot t, \quad (2)$$

где $k = k_{II} [E]$. V_0 и V_t обозначают специфическое связывание лиганда с мембранами в исходном препарате и в момент времени t после добавления протеаз, V_∞ обозначает остаточную активность рецептора после обработки с протеазами и соответствует образованию «плато» на кинетических кривых (рис. 1). На рис. 3 показано, что уравнение (2) хорошо описывает кинетику протеолитической деградации рецептора и допускает расчет констант скорости псевдопервого порядка k_1 , которые, согласно кинетической схеме (1), линейно зависят от концентрации про-

теаз (рис. 4). Получаемый в координатах k_1 и $[E]$ отрезок ординаты соответствует константе скорости спонтанной инактивации мускаринового холинорецептора. Это означает, что параллельно с процессом протеолитической деградации протекает также спонтанная инактивация рецептора, которая в одинаковой мере характерна для обеих фракций рецепторных участков и протекает с неизменной скоростью также после окончания действия протеаз.

Уровень «плато», достигаемый при обработке препарата мускаринового холинорецептора протеазами, не зависит от природы ферментов и их концентрации (рис. 1). Было установлено, что добавление после достижения «плато» нового количества протеаз не приводит к дальнейшему быстрому уменьшению концентрации рецепторных участков, поэтому можно предположить, что некоторая часть мускариновых холинорецепторов не доступна действию растворимых в воде протеаз.

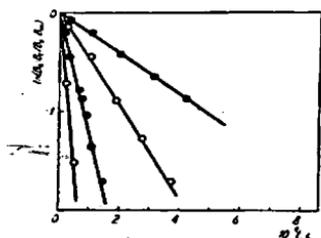


Рис. 3.

Рис. 3. Инактивация мускаринового холинорецептора при обработке α -химотрипсином (концентрации те же, что на рис. 1)

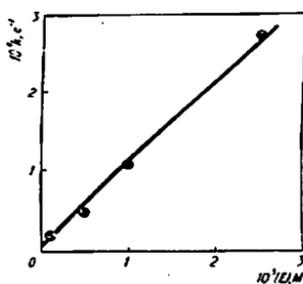


Рис. 4.

Рис. 4. Зависимость k_1 от концентрации α -химотрипсина в реакции с мускариновым холинорецептором

Возможно, что такая неодинаковая доступность мускариновых холинорецепторов протеазам связана с образованием непроницаемых для молекул ферментов везикул, хотя для разрушения подобных структур в процессе изолирования мембран специально применяли буферные растворы с разной ионной силой [8]. Для проверки такой возможности изучали также действие протеаз на АХЭ мозга, которая локализована рядом на синаптических мембранах в непосредственной близости от мускаринового холинорецептора [6]. Опыты с обоими белками проводили в идентичных условиях, используя одну и ту же микросомную фракцию мозговых мембран. На рис. 5 и 6 видно, что α -химотрипсин и трипсин инактивируют АХЭ мозга; этот процесс соответствует кинетической схеме (1) и уравнению (2), если через V_1/V_0 обозначить относительную активность фермента в реакции с ацетилтихолином. При этом, однако, все молекулы АХЭ одинаково доступны протеазам и $V_\infty = 0$. Следовательно, образование непроницаемых для растворимых ферментов везикул не мо-

жет быть причиной неполного протеолиза связанных с мембранами белков. В таком случае вышеприведенные данные о неодинаковой доступности мембраносвязанного мускаринового холинорецептора протеазам свидетельствуют о неодинаковой локализации молекул этого белка в структуре мембран. При этом 30–40% от общего числа рецепторных молекул погружены, очевидно, так глубоко в липидный бислой, что защищены от действия α -химотрипсина и трипсина.

Уменьшение активности мускаринового холинорецептора и АХЭ при обработке мозговых мембран протеазами не сопровождалось значительным изменением общего количества связанного с мембранными фрагментами белка. Так, например, обработка мембранной суспензии $5 \cdot 10^{-5}$ нМ раствором α -химотрипсина в течение 38 ч достаточна для полной инактивации АХЭ (рис. 5, а) и уменьшает количество улавливаемого стеклофиберными фильтрами белка только на 4%. Так как действие α -химотрипсина вряд ли селективно направлено на АХЭ, можно сделать вывод, что инактивация фермента происходит без разрыва связи белка с мембранной структурой.

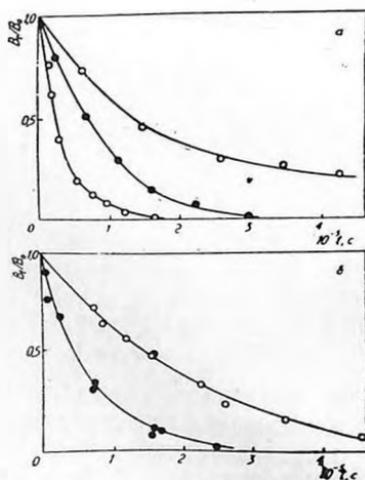


Рис. 5.

Рис. 5. Изменение активности мозговой ацетилхолинэстеразы при обработке α -химотрипсином (а) и трипсином (б). Концентрации α -химотрипсина — $1 \cdot 10^{-6}$ М, $5 \cdot 10^{-6}$ М и $1 \cdot 10^{-5}$ М, трипсина — $1 \cdot 10^{-6}$ М и $1 \cdot 10^{-5}$ М

Помимо эффекта протеолитических ферментов, в настоящей работе было также изучено действие фосфолипазы A_2 на активность мембраносвязанных холинорецептора и АХЭ. Обработка мембран этим

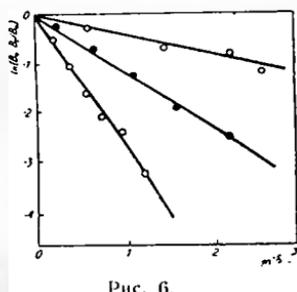


Рис. 6.

ферментом быстро уменьшала связывание 3H -хинуклидинилбензилата с рецептором. При этом активность рецептора исчезала полностью, что совпадало с результатами инактивации АХЭ под действием протеаз. В отличие от этого нарушение структуры липидной мембраны при обработке фосфолипазой A_2 вообще не влияло на активность мозговой АХЭ.

Полученные результаты подтверждают представление о том, что для сохранения функциональной активности мускаринового холинорецептора необходимо его взаимодействие с липидным окружением, тогда как активность АХЭ не зависит от состояния мембраны и связи фермента с ним.

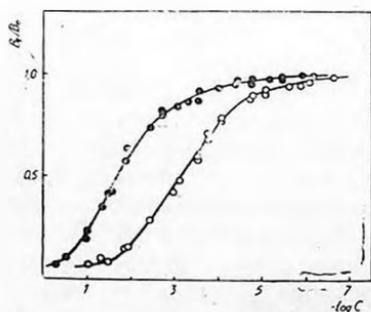


Рис. 7. Связывание карбамилхолина с препаратом мускаринового холинорецептора до (●) и после (○) обработки α -химотрипсином

Различия в локализации двух популяций мускариновых холинорецепторов в структуре мозговых мембран не отражены в закономерностях их взаимодействия с хинуклидинилбензилатом (рис. 2), а также с другими антагонистами мускаринового типа [3]. Иные выводы можно сделать в случае карбамилхолина — типичного холиномиметика мускаринового типа. Обработка мозговых мембран α -химотрипсином смещает кривую вытеснения ^3H -хинуклидинилбензилата меченым карбамилхолином в сторону меньших концентраций агониста (рис. 7). Формально это соответствует увеличению сродства рецептора к этому лиганду, так как характер кривых связывания агонистов для нативного препарата рецептора свидетельствует о существовании, по меньшей мере, двух типов рецепторных участков, различающихся эффективностью связывания лигандов [1]. Для взаимодействия карбамилхолина с мускариновыми холинорецепторами мозга крысы нами получены значения $K_d = 4,45 \cdot 10^{-7}$ М для 60% рецепторных участков и $K_d = 8,91 \cdot 10^{-5}$ М для остальных рецепторных участков. В такой ситуации для смещения всей кривой вытеснения хинуклидинилбензилата карбамилхолином в сторону меньших концентраций агониста достаточно увеличения относительной концентрации рецепторных участков с большим сродством к лиганду, что, по-видимому, происходит в случае частичного протеолиза рецепторного белка. Интересно отметить практически одинаковое процентное содержание в мембранах мозга рецепторных участков с высоким сродством к агонистам, с одной стороны [1], и стабильных в условиях протеолиза рецепторов, с другой.

Неоднородность связывающих свойств мускаринового холинорецептора мозга и возможная связь этого явления с его функционированием обсуждаются во многих работах [3, 5]. При этом представляются доводы в пользу того, что физиологическая роль принадлежит молекулам рецепторов с большим сродством к ацetylхолину. Так, например, для большой серии агонистов показано наличие линейной зависимости меж-

ду величинами ED_{50} , полученными в опытах с препаратами гладкой мышцы, и pK_{11} , характеризующими связывание лигандов с рецепторными участками с большим сродством к агонистам. Более того, константы ED_{50} и pK_{11} , как правило, весьма близки по значению [13]. Вероятно, что мускариновый холинорецептор регулирует работу Ca^{2+} -каналов, которые, в принципе, могут входить в состав рецепторного комплекса [14], чем объясняется необходимость локализации этих белков внутри мембран.

Можно высказать предположение, что рецепторы с меньшим сродством к ацетилхолину, также определяемые в экспериментах по связыванию радиоактивного антагониста, лишены физиологической активности. Рецепторные белки, обладающие меньшим сродством к мускариновым лигандам, являются либо предшественниками функционально активных рецепторов, либо их появление связано с частичной деградацией рецепторного белка, приводящей к изменению гидрофобных взаимодействий. Последний процесс сопровождается, по-видимому, выходом рецепторного белка из липидного окружения. Установлено, что инкубация рецепторного препарата в условиях, содействующих фосфорилированию белков, приводит к уменьшению сродства препарата к агонистам [15]. Этот эффект может быть связан с увеличением полярности рецепторного белка, «выталкиванием» его из липидной фазы и увеличением в результате этого относительной концентрации рецепторных участков с меньшим сродством к агонистам.

ACTION OF PROTEASES AND PHOSPHOLIPASE A_2 ON THE MEMBRANE-BOUND MUSCARINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR FROM RAT BRAIN

KÄÄMBRE T. A., LANGEL Ü. L., RINKEN A. A.,
TÄHEPÖLD L. J., JÄRV J. L.

Departments of Organic Chemistry and Biochemistry, Tartu State University,
Tartu, Estonian SSR

Exposition of the membrane-bound muscarinic receptor into the external solution has been studied by making use of proteases— α -chymotrypsin and trypsin. It has been found that two different populations of the receptor sites can be separated by the rate of their digestion with proteases. The rapidly inactivating receptor made up approx. 60% of the total number of the receptor sites, determined from the specific binding data for 3H -quinuclidinyl benzilate (3H -QNB). The remaining 40% of the binding sites are more stable under the used condition of protease treatment.

Two receptor populations reveal different binding properties in reaction with a typical agonist carbachol, while their affinity to antagonist 3H -QNB is identical.

The action of phospholipase A_2 has been studied on the membrane-bound receptor and acetylcholinesterase preparations. It has been found

that the receptor activity has totally diminished during incubation with this enzyme while practically no decrease can be found in acetylcholinesterase activity.

ЛИТЕРАТУРА

1. Birdsall N. J. M., Burgen A. S. V., Hulme E. C. *Mol. Pharmacol.*, *14*, 723-736, 1978.
2. Birdsall N. J. M., Burgen A. S. V., Hulme E. C. *Brit. J. Pharmacol.*, *66*, 337-342, 1979.
3. Birdsall N. J. M., Berrie C. P., Burgen A. S. V., Hulme E. C.—In: *Receptors for Neurotransmitters and Peptide Hormones* (Pepin G., Kuhar M. J., Enna S. J., eds.), p. 107-116. Raven Press, N. Y., 1980.
4. Hellbronn E., Bartfai T. *Progress in Neurobiology*, *11*, 171-188, 1978.
5. Ktoog Y., Sokolovsky M. *Brain Res.*, *144*, 31-48, 1978.
6. Bartfai T., Berg P., Schultzberg M., Hellbronn E. *Biochim. et biophys. acta*, *426*, 186-197, 1976.
7. Nachmanson D. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, *68*, 3170-3174, 1971.
8. Лангел Ю. Л., Ринкен А. А., Тяхенид Л. Я., Яров Я. Л. *Нейрохимия*, *1*, 4, 343-351, 1982.
9. Ellman G. G., Courtney K. D., Anders J., Featherstone R. U. *Biochem. Pharmacol.*, *7*, 88-95, 1961.
10. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall A. J. *J. Biol. Chem.*, *193*, 265-275, 1951.
11. Yamamura H. J., Snyder S. H. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, *71*, 1725-1729, 1974.
12. Kloog Y., Sokolovsky M. *Brain Res.*, *134*, 167-172, 1977.
13. Birdsall N. J. M., Hulme E. C. *J. Neurochem.*, *27*, 7-16, 1976.
14. Ticku M. K., Triggle D. J. *Gen. Pharmac.*, *7*, 133-140, 1976.
15. Berrie C. P., Birdsall N. J. M., Burgen A. S. V., Hulme E. C. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, *87* (4), 1000-1005, 1979.

Поступила 26. I 1983.