

НЕЙРОХИМИЛ

т. 4, № 3, 1985

УДК 612.815.1:577.354

ВОЛНООБРАЗНЫЙ ХАРАКТЕР КРИВЫХ СВЯЗЫВАНИЯ ³Н-ГАМК И ³Н-МУСЦИМОЛА С МЕМБРАНАМИ ИЗ МОЗГА КРЫС И МЫШЦ САРАНЧИ

ТОНКИХ А. К., КУЗНЕЦОВ В. И., КАРАНОВА М. В., САДЫКОВ А. А.

Институт биофизики АН СССР, Пущино-на-Оке

Кривые связывания ³Н-ГАМК и ³Н-мусцимола с препаратами мембран из мозга крыс и мынц саранчи, построенные с использованием достаточно большого днапазона концентраций лигандов, имеют волнообразный вид. Максимумы повторяются при изменении концентраций меченого лиганда примерно в 1,4 раза. Обсуждаются возможные причины волнообразной формы кривых связывания.

ГАМК — главный тормозной медиатор ЦНС позвоночных животных [1], а также нервно-мышечной передачи членистоногих [2]. Имеется много работ по связыванию меченой ГАМК или се меченого аналога—мусцимола с препаратами мембран, содержащих ГАМК-рецепторы [3], однако данные о количестве связывающих участков и их константах весьма разнообразны—сообщалось об одном [4, 5], двух [6, 7] или трех [8, 9] типах связывающих участков. На графиках, приведенных в статьях, обращает на себя внимание небольшое количество точек, по которым авторы строят кривые связывания, а также в некоторых случаях несколько произвольная экстраполяция точек под теоретические кривые, характерные для определенного типа связывания.

Целью данной работы было уточнение кривых связывания ³Н-ГАМК и ³Н-мусцимола с препаратами мембран, содержащих ГАМК-рецепторы.

Материалы и методы

Фракция грубых мембран (P₂) была получена гомогенизированием целого мозга крыс в 10 объемах холодной 0,32 M сахарозы. Гомогенат центрифугировали при 1000g 10 мин, затем супернатант—при 17000g 30 мин. Осадок подвергали замораживанию-оттаиванию и трижды етмывали суспендированием в 20 объемах 50 мМ трис HCl буфера (pH 7,4) и центрифугированием при 17000g 30 мин. Отмывание мембран 0,05%-ным тритоном X-100, их солюблизацию ДОХ-Nа и осаждение солюбилизата сульфатом аммония проводили, как описано Asano, Ogasawara [10].

Фракции грубых, а также отмытых тритоном X-100 и солюбилизированных мембран могли сохраняться в жидком азоте 2—3 месяца.

Ножки саранчи размельчали в размельчителе тканей с 10-ью объемами 0,25 М сахарозы и процеживали через три слоя марли. Далее фракцию отмытых грубых мембран получали аналогично еписанному выше способу для мембран мозга крыс.

Эксперименты по связыванию проводили, используя два метода: фильтрование на интроцеллюлозных фильтрах «Synpor» (ЧССР) и центрифугирование.

В микропробирки объемом 200 мкл вносили 10 мкл различных концентраций 3Н-ГАМК или 3Н-мусцимола так, чтобы в конечном объеме 100 мкл содержались требуемые концентрации меченого лиганда; для определения уровня неспецифического связывания добавляли 10 мкм немеченых ГАМК или мусцимола в концентрации 10 или 1 мМ соответственно. Затем вносили 80 мкл суспензии грубых мембран в 50 мМ трис HCl буфера (pH 7,4) или раствора солюбилизированных мембран в этом же буфере с концентрацией белка 1 мг/мл. Смесь перемешивали и инкубировали в течение 30-60 мнн. Установили, что в этих интервалах времени связывание существенно не меняется. После инкубирования 90 мкл смеси наносили на предварительно вымоченный в дистиллированной воде фильтр диаметром 24 мм и размером пор 0,4-0,8 мкм, помещенный на фильтровальную воронку. Смесь наносили таж, чтобы ода покрывала всю новерхность фильтра. Затем включали векуум, смесь отсасывали, и фильтр промывали 3 мл холодной воды. Фильтры, которые помещали на воронку матсвой стороной вверх, подбирали так, чтобы 3 мл воды, просасызались примерно за секунду. Все процедуры проводили при 0-4°. При таком способе фильтрования на фильтре остается около 80% белка грубых и около 50% белка солюбилизированных мембран. Высушенные фильтры помещали во флаконы с 3 мл стандартного толуольного сцинциллятора и измеряли радноактинвость на счетчике «Intertechnique» (Франция).

Для центрифугирования использовали пробирки объемом 1.5 мл, в которые вносили 0,5 мл инкубациенной смеси, содержащей 500 мкг белка. После 30 мин инкубирования проводили центрифугирование при 17000g в течение 30 мин. Осадок дважды промывали 1 мл холодного буфера. Пробирки заливали дноксановым сцинциллятором и в них измеряли радноактивность. В отдельных случаях осадки в пробирках солюбилизировали в 0,4 мл 10%-ного тритойа X-100, переносили в счетные флаконы, добавляли 1 мл абсолютного этанола и 10 мл толуольного сциникляятсра: что приводило к повышению радноактивности в 1,3 раза. Это учитывали при взмерении радиоактивности в диоксановом сцинцилляторе. Осаждение солюбилизированных мембран проводили, используя полиэтиленгликоль.

Белок определяли по методу Lowry и соавт. [11] Использовали ³Н-мусцимол (15 Килмоль, "Amersham", Англия), ³Н-ГАМК (26 Ки/ммоль, "Изотоп"), мусиимол ("Serva", ФРГ), ГАМК ("Reanal", Венгрия), остальные реактивы марки "ос. ч".

Результаты и обсуждение

При построении кривых связывания ³Н-мусцимола с грубыми мембранами мозга крыс с интервалом концентраций меченого лиганда, равной 1/10 порядка, оказалось, что на этих кривых имеются участки, в которых, несмотря на более высокую концентрацию меченого мусцимола в среде инкубации, количество связавшегося ³Н-мусцимола меньше (рис. 1). Вклад в такие минимумы специфического связывания вносят как кривые общего связывания, так и связывания неспецифического, выявляемого в присутствии 0,1 мМ немеченого мусцимола. Для обеспечения достоверности существования минимумов в связывании для некоторых кривых точки взяты как среднее из 30 отдельных измерений. Характерная кривая получается, если исследовать связывание другим методом, а именно, в присутствии одной концентрации меченого мусцимола и различных концентраций иемеченого лигаида (рис. 2). Кривые, подобные приведенным на рис. 2, ранее получены нами и для связывания ³Н-ГАМК с фракцией грубых мембран мозга крыс [12]. На рис. 3 представлена кривая связывания ³Н-ГАМК с фракцией грубых мембран из мышц саранчи.



Рис. 1. Связывание ³Н-мусцимола с фракцией (P₂) грубых мембран мозга крыс: 1—эбшее связывание; 2—связывание в присутствии немеченого мусцимола в концентрации 0,1 мМ; 3—вычтенное специфическое связывание. По оси абсцисс—концентрация ³Н-мусцимола (нМ), по оси ординат—связанный ³Н-мусцимол (пмоль/мг белка). Каждая точка, как и на рис. 2—6, представляет среднее из 3—6 измерений с сбозначенными стандартными отклонениями. Если стандартные отклонения ис указаны, они находятся в пределах значков

Форма кривых не зависит от метода разделения связавшегося лиганда от свободного в инкубационной смеси, то есть фильтрования или центрифугирования.

С целью уточнения форм кривых мы получили кривые связывания ³H-мусцимола с фракцией грубых мембран мозга крыс, используя интервалы между концентрациями меченого мусцимола, равные 1/100 порядка концентраций (рис. 4). На этих кривых выявляются чередующиеся максимумы и минимумы. При шкале концентраций ³H-мусцимола, выраженной в логарифмах, видно, что положения максимумов повторяются через равные интервалы, а именно, для кривой общего связывания при изменении концентраций меченого мусцимола в среднем в 1,43 раза, а для связывания в присутствии 0,1 мМ немеченого мусцимола в 1,37 раза (эти цифры получены делением расстояния между двумя крайними максимумами на логарифмической шкале концентраций ³H-мусцимола от 10 до 1000 нМ, на количество промежутков между максимумами). Аналогичные кривые с разрешением в 1/100 получены нами для концентраций ³H-мусцимола от 10 нМ до 100 нМ (рисунок не приводится), а форма кривых на рис. 1 и 2 по-

зволяет предполагать, что подобная волнообразность кривых будет распространяться, по крайней мере, на концентрации ³Н-мусцимола от 1 нМ до 10 мкМ и даже выше, если учесть, что максимумы выяв-ляются даже в присутствии 100 мкМ немеченого мусцимола.



Рис. 2. Связывание 3Н-мусцимола в концентрации 10 иМ с фракцией (P₂) мозга крыс в присутствии различных концентраций немеченого мусцимола. По оси абсинсс--концентрация Н-мусцимола (мкМ), по оси ординат-связанный ³Н-мусцимол (пмоль/мг белка)



Рис. 3. Связывание 3Н-ГАМК в концентрации 10 нМ с фракцией (Р₂) грубых мембран из мышц саранчи в присутствии различных концентраций ГАМК иемеченой. По оси абсцисс—концентрация ГАМК (мкМ), по оси ординат—связаниая 3Н-ГАМК (пмоль/мг белка)

Кривые связывания ³Н-мусцимола на рис. 2 и связывания ³Н-ГАМК на рис. 3 весьма похожи. Для уточнения формы кривых связывания ³Н-ГАМК получали кривые, используя разницу в концентрациях меченой ГАМК, равную 1/100 порядка. На рис. 5 приведен участок кривой связывания ³Н-ГАМК с мембранами мышц саранчи. На участке от 0,1 до 1,0 мкМ она напоминает кривую, изображенную на рис. 1. Далее начинает выявляться волнообразность, характерная для кривой, изображенной на рис. 4, с повторением максимумов при изменении концентрации ³Н-ГАМК примерно в 1,4 раза. Связывание ^вН-ГАМК с синаптическими мембранами мозга крыс характеризуется примерно такой же кривой.

Сравнение полученных нами кривых связывания ³Н-ГАМК и ³Н-мусцимола с фракциями мембран с кривыми, приводимыми в различных опубликованных работах [4, 8, 13], наводит на мысль, что наши данные не противоречат результатам этих работ, и, возможно, объясняют различия в количестве связывающих участков и их константах, приводимых разными авторами. То есть, в зависимости от концентрации лигандов можно получить самые разнообразные кривые связывания, встречающиеся в литературе.

Связывание ³Н-мусцимола с неотмытыми грубыми мембранами мозга почти не обнаруживает специфичности, выявляемой в присутствии 0,1 мМ немечсного мусцимола, но кривая связывания имеет описанную волнообразность. После отмывания мембран, в том числе и с использованием тритона X-100, специфическое связывание выявляется за счет раздвоения волнообразной кривой так, что волнообразность имеют как кривая общего, так и неспецифического связывания. Преинкубирование мембран при 60° в течение 20 мин приводит к исчезновению как специфического рецепторного связывания, так и волнообразности кривой.



Рис. 4. Связывание ³Н-мусцимола с фракцией (P₂) грубых мембран мозга крыс: 1—общее связывание; 2—связывание в присутствии немеченого мусцимола в концентрации 0,1 мМ. По оси абсцисс—Ig(³Н-мусцимола, нМ), по оси ординат—связанный ³Н-мусцимол (пмоль/мг белка) Рис. 5. Связывание ³Н-ГАМК с фракцией грубых мембран из мышц саранчи: 1—общее связывание; 2—связывание в присутствии немеченой ГАМК в концентрации 1 мМ. По оси абсцисс—концентрация ³Н-ГАМК (мкМ), по осн ординат—связанная ³Н-ГАМК (пмоль/мг белка)

Кривые связывания ³Н-мусцимола и ³Н-ГАМК с препаратом солюбилизированных и обогащенных ГАМК-рецепторных участков имеют гиперболическую форму с $K_d = 16 \pm 4$ нМ для связывания ³Н-мусцимола (рис. 6, *a*) и с $K_d = 200 \pm 40$ нМ для связывания ³Н-ГАМК (рисунок не приводится). Эти кривые согласуются с приводимыми в литературе [14—16]. Расположение же точек на кривой связывания ³Н-мусцимола с солюбилизатом мембран (рис. 6, *б*) несколько напоминает кривую на рис. 2, что позволяет предположить, что волнообразность в некоторой мере сохраняется и при связывании с солюбилизированными мембранами.

Хотя эксперименты проводились с мембранами целого мозга крыс и мышц саранчи, то есть с объектами, в которых возможны различные популяции ГАМК-рецепторных участков, повторяющиеся максимумы: при изменении концентрации меченого лиганда примерно в 1,4 раза (на кривых, обозначенных на рис. 2 и 3, где концентрация меченого лиганда постояниа, меняется отношение доли немеченого лиганда к меченому) могут указывать на некий единый функциональный механизм, вызывающий данную волнообразность. Тот факт, что волнообразностьисчезает при инактивации ГАМК-рецепторного связывания нагреванием, может указывать на связь ее с нативной структурой мембран.



Рис. 6. Связывание ЗН-мусцимола с солюбилизированной и обогашенной фракцией (P₂) грубых мембран мозга крыс. *а*—в присутствии различных концентраций меченого мусцимола: *1*—общее связывание; *2*—неспецифическое, то есть в присутствии немеченого мусцимола в концентрации 0,1 мМ. По осн абсцисс—концентрация ЗН-мусцимола (нМ). *б*—в присутствии 10 иМ ЗН-мусцимола и различных концентраций немеченого мусцимола. По осн абсцисс—концентрация мусцимола (нМ), по_осн ординат—связанный ЗН-мусцимол (пмоль/мг белка)

Волнообразность проявляется в присутствии почти тысячекратного избытка немеченого лиганда, причем, естественно, что разброс в его концентрациях во много раз превышает разницу между концентрациями меченого лиганда. Для объяснения этого можно высказать ряд предположений. Например, молекулы или молекулярные комплексы меченого и немеченого лигандов чем-то отличаются между собой, или существует некий специфический механизм рецепторного связывания, при котором лигандные комплексы при связывании с рецептором распадаются. Могут иметь место также и чисто радиационные эффекты β-излучения трития, энергии которого вполне достаточно для некоторой модификации как самих молекул лиганда, так и непосредственносоприкасающихся с ними других молекул, например, рецепторных. Не исключены и эффекты, связанные с обменом трития на водород между молекулами меченого лиганда и теми же рецепторными участками или водой.

«Амплитуда волнообразности изменяется пропорционально концентрации меченого лиганда и при концентрации лиганда, равной 100 нМ,. имеет порядок 0,1 пмоль/мг белка. При солюбилизации мембран и обогащении солюбилизата ГАМК-рецепторными участками специфическое связывание ³Н-мусцимола при концентрации 100 нМ составляет около 10 пмоль/мг белка. Амплитуда же волнообразности остается порядка 0,1 пмоль/мг белка (рис. 6, б). На основании этого, с одной стороны, можно предположить, что волнообразность обусловлена каким-то неспецифическим фактором, от которого освобождаются в процессе обогащения ГАМК-рецепторными участками, а с другой стороны, нельзя исключить и то, что волнообразность отражает специфическое состояние ГАМК-рецепторного комплекса в солюбилизированной мембране, для которого характерна гиперболическая кривая связывайия.

Проверка всех возможных объяснений волнообразности потребует специальных экспериментов. Данная же работа ставит вопрос о правомочности интерпретаций кривых связывания с необогащенными ГАМК-рецепторными препаратами, которые приводятся в публикуемых работах, так как амплитуда показанной волнообразности соизмерима с величинами специфического ГАМК-рецепторного связывания для этих препаратов.

WAVE-FORM CURVES OF THE RAT BRAIN AND LOCUST MUSCLE MEMBRANE BINDING WITH 'H-GABA AND 'H-MUSCIMOL

TONKYKH A. K., KUZNETSOV V. I., KARANOVA M. V., SADYKOV A. A. Institute of Biological Physics, Acad. Sci. of the USSR, Poustchino

Rat brain and locust muscle membrane binding with ³H-GABA and ³H-muscimol has been studied in a large concentration range of ligands (1-1000 nM) at one decimal interval. It was shown that the total and unspecific binding curves have a typical wavy form with convexity (or concavity) arising regularly with ligand concentration change by approx 1.4. Such waveform curves were observed both with rat brain membranes and plasma membranes of the locust muscle. Possible reasons of the wave-/form curves are discussed.

ЛИТЕРАТУРА

- 1. Kenjevic K. Physiol. Rev., v. 54, p. 418-540, 1974
- 2. Gerschenfeld H. M. Physiol. Rev., v. 53, p. 1-119, 1973.
- 3. De Fendis F. V. Neuroscience, v. 5: p. 675-688, 1980.
- 4. Young A. B. In; GABA in nervous system function (eds. E. Roberts, I. N. Chase, D. B. Tower), p. 305-317, N. Y., Raven Press, 1976.
- 5. Snodgrass S. R. Nature, v. 273. p. 332-391, 1978.
- .6. Enna S. J., Snyder S. H. Mol. Plarmacol., v. 13, p. 442-453, 1977.
- 7. Beaumont K., Chilton W., Yanan ira H. I., Ennz S. J. Brain Res., v. 148, p. 153-162, 1978.

.266

- 8. Winkler M. H., Nicklas W. J., Berl S. J. Neurochem, v. 32, p. 79-84, 1979.
- Johnston G. A. R., Allan R. D., Kennedy S. M. E., Twitchin B.-In: GABA-Neurotransmitters (eds. by Krogsgaard-Larsen P., Schell-Krüger J., Kofod H.), p. 149-164, Munksgaard, Copenhagen, 1979.
- 10. Asano T., Ogasawara N. Life Sci., v. 26, p. 1131-1137, 1980.
- Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J., J. Biol. Chem., v. 193, p. 265-275, 1951.
- 12. Кузнецов В. И., Тонких А. К., Ким О. Н., Асланов Х. А. Укр. бнохим. журн. т. 54, с. 428—431, 1982.
- 13. Meiners B. M., Kehoe P., Shaner D. M., Olsen R. W. J. Neurochem., v. 32, p. 979-990, 1979.
- 14. Stephenson F. A. Watkins A. E., Olsen R. W. Eur. J. Biochem., v. 123, p. 291-298, 1982.

15. Sigel E., Mamalaki C., Barnard E. A. FEBS Lett., v. 147, № 1, p. 45-48, 1982. 16. Asano T., Ogasawara N. Life Sci., v. 29, p. 193-200, 1981.

Поступила 20. III 1985.

267

3-714

- <u>-</u> - .