



УДК 577.175.82+577.112

СВЯЗЫВАНИЕ ЛИГАНДОВ D₂-ДОФАМИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ,
С КРАЙНЕ КИСЛЫМ МЕДЬСОДЕРЖАЩИМ БЕЛКОМ
МОЗГА—НЕЙРОКУПРЕИНОМБУНЯТЯН Г. Г., *МИКЕЛАДЗЕ Д. Г., *АБУТИДЗЕ К. Д.,
МЕЛИКЯН А. М., НАЛБАНДЯН Р. М.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван;

*Институт физиологии АН ГССР, Тбилиси

Нейрокупреин, крайне кислый медьсодержащий белок, с величиной M_r 10 кД, обнаружен как в мозгу [1], так и в хромаффинных гранулах надпочечников [2]. 30% меди растворимой фракции мозга приходится на долю нейрокупреина. В зависимости от того в окисленной или в восстановленной форме находится белок, медь активно связывается с катехоламинами (дофамином, норадреналином, адреналином) либо с продуктами их окисления (адренохромоподобными соединениями) [3]. Последние, наряду с другими хелаторами, легко удаляют медь из нейрокупреина [4]. Недавно было показано [5], что апоформа нейрокупреина выступает как мощный ингибитор дофамин- β -монооксигеназы, тогда как холоформа не ингибирует этот фермент. Таким образом, апонейрокупреин рассматривается как природный ингибитор дофамин- β -монооксигеназы. Поскольку сама дофамин- β -монооксигеназа также является медьсодержащим ферментом, степень насыщенности ее медью определяет уровень дофамина.

Апоформа нейрокупреина, инактивируя дофамин- β -монооксигеназу, тем самым повышает уровень дофамина. Следовательно, наличие или отсутствие меди в нейрокупреине может обусловить диаметрально противоположное поведение белка при различных патологиях, связанных с обменом дофамина.

Согласно существующим представлениям [6], дофаминовые рецепторы в мозгу подразделяются на две категории: D₁ (связанные с аденилатциклазой) и D₂ (не связанные с аденилатциклазой или участвующие в ее инактивации). Нейролептики, используемые при эндокринных, нейрорегистических и психиатрических нарушениях, как известно, модифицируют активность D₂-дофаминовых рецепторов.

Исходя из того, что нейрокупреин является одной из важнейших медьсодержащих систем мозга, связанных с дофамином [4], уровень ко-

того повышается при шизофрении, интерес представляло изучение его связывания с лигандами D₂-дофаминовых рецепторов.

Нейрокупрени из мозга крупного рогатого скота получали по ранее описанному методу [7]. Апонейрокупрени получали добавлением диэтилдитиоскарбата к белку, гель-фильтрацией на сефадексе G-25 (1,2×8 см) и концентрированием на ДЭАЭ-52 целлюлозе. Белок элюировали 0,01 M натрий-ацетатным буфером, pH 6,0, содержащим 0,6 M NaCl. Гомогенность белка контролировали электрофорезом на 10%-ном ПААГ по методу Davis [8] (рисунок, а), а также гель-фильтрацией высокого давления на колонке «Protein PAK-60» («Millipore Waters», США) (рисунок, б), уравновешенной 0,1 M натрий-ацетатным буфером, pH 7,0. Элюцию проводили тем же буфером со скоростью 1 мл/мин. Очистоте препарата судили также по спектру в диапазоне 220—400 нм (рисунок, в). Величину M_r белка определяли по методу Andrews [9].

Синтез сульпирид-сефарозы осуществляли по методам Egly, Pothat [10] и Charbonneau, Cormier [11], предложенному для связывания трифторфеназина с сефарозой. Синтез галоперидол-сефарозы осуществляли по методу Simon и соавт. [12], предложенному для связывания морфина с сефарозой.

Аффинную хроматографию на галоперидол-сефарозе проводили путем нанесения обессоленного белкового препарата на колонку галоперидол-сефарозы (0,6×8 см), уравновешенную буфером, содержащим 50 mM трис-HCl, pH 7,4, 1 mM ЭДТА, 20 мкг/мл бацитрацина, 40 ед/мл тризолола, 1 mM фенилметилсульфанилфторида. Промывание проводили этим же буфером со скоростью 5 мл/ч, пока поглощение при 280 нм не спускалось до базовой линии. Белок элюировали тем же буфером с добавлением 100 мкM галоперидола. В случае аффинной хроматографии на сульпирид-сефарозе ход опыта сохранялся тот же, только при элюции вместо галоперидола в буфер добавляли 100 мкM сульпирида.

При определении связывания [³H]лигандов с нейрокупренином, последний (80—150 мкг) инкубировали при 22° в течение 15 мин в среде, содержащей 10⁻⁸ M [³H]лиганда, 50 mM трис-HCl (pH 7,4), 10 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 1,5 mM АТР. Для определения специфичности связывания использовали немеченые лиганды (10 мкM). После инкубации смесь фильтровали на фильтрах GF/C («Whatman», Англия), фильтры промывали 2 раза по 15 мл того же буфера, и радиоактивность определяли в жидкостном сцинтилляционном спектрофотометре Interechnique SL-400 (Франция). Все использованные [³H]лиганды за исключением [³H]дофамина («Amersham», Англия) были фирмы «NEN» (США).

Аффинная хроматография на сульпирид-сефарозе выявила способность нейрокупренина связываться с высокоспецифичным D₂-дофаминовым лигандом.

Известно, что наиболее близко по своим фармакологическим и физиологическим свойствам к D₂-дофаминовым рецепторам стоят σ-опиатные белки. Галоперидол, специфический D₂-дофаминовый лиганд, не только меняет уровень энкефалинов при внутривенном введении [13], но и свя-

зывается с σ -опиатными рецепторами [14]. Являясь антагонистом D_2 -дофаминовых рецепторов, галоперидол влияет на антиноцицептивное действие агониста σ -опиатных рецепторов [3H]SKF-10047 [15].

Исходя из вышесказанного, представляло интерес изучение возможного связывания нейрокупреина с галоперидолом и [3H] SKF-10047 в присутствии галоперидола.

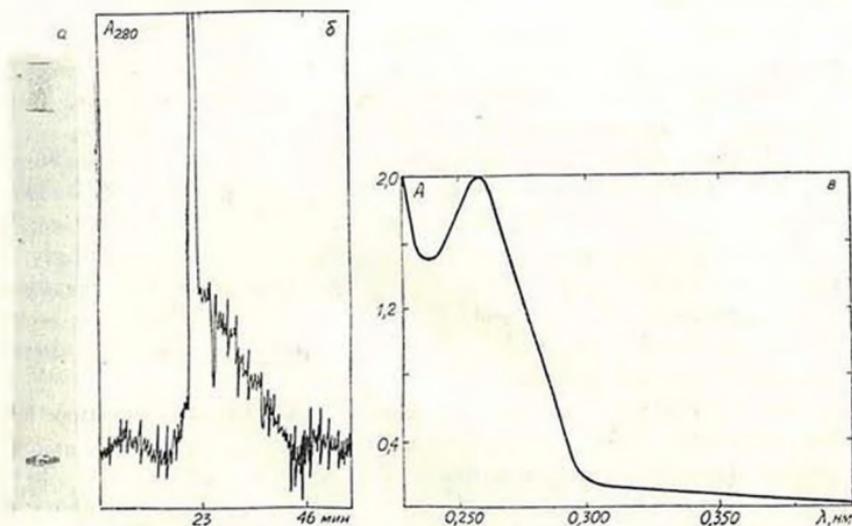


Рис. Контроль чистоты препарата холонейрокупреина: а—электрофорез в 10%-ном ПААГ, б—гель-фильтрация высокого давления на «Protein RAK-60», в—спектр холонейрокупреина в диапазоне 220—400 нм.

При нанесении белка на галоперидол-сефарозу белок вышел одним пиком без задержки. В опытах радиолигандного связывания было установлено, что галоперидол не ингибировал связывания нейрокупреина с [3H]SKF-10047 (таблица).

Надо отметить, что при использовании галоперидола в качестве неметаллического лиганда, неспецифическое связывание с [3H]сульпиридом в три раза превышало общее связывание.

В присутствии бутирофенонпроизводного [3H]дсмперида, галоперидол обнаруживает способность вытеснять 17% связанного с белком радиоактивного нейролептика. При этом уровень неспецифического связывания возрастает более чем в 40 раз по сравнению с опытами, где использовали [3H]сульпирид. Сульпирид не ингибировал связывания нейрокупреина с агонистом дофаминовых рецепторов [3H]дофамином. Как видно из приведенных в таблице данных, по способности неспецифически связываться с нейрокупреином используемые лиганды можно расположить в последовательности: [3H] домперидон > [3H] дофамин > [3H] сульпирид.

Так как медь в нейрокупреине играет важную роль в связывании катехоламинов [3], необходимо было определить, какой процент неспе-

цифически связанной радиоактивности приходится на долю меди. Для выяснения данного вопроса в аналогичных опытах с применением [³H]дофамина была использована апоформа нейрокупреина. Результаты опытов, вопреки ожиданиям, показали, что связанный с апоформой нейрокупреина [³H]дофамин на 67% замещается производным бензамидина сульпиридом. Следует отметить, что уровень общего связывания [³H]дофамина повысился почти в 4 раза по сравнению с опытами, где использовали холонейрокупреин, тогда как уровень неспецифического связывания в обоих случаях был одинаковым.

Таблица

Связывание [³H]лигандов D₂-дофаминовых и β-адренергических и σ-опиатных рецепторов с холонейрокупреином и апонейрокупреином (срм/мг белка)

	[³ H] лиганд	Немеченый лиганд	Общее связывание	Неспецифическое связывание	Специфическое связывание	% от общего связывания
Холонейрокупреин	[³ H] SKP-10047	галоперидол	4084±76	4342±641	0	0
	[³ H] сульпирид	галоперидол	2060±49	7406±1277	0	0
	[³ H] домперидон	галоперидол	427543±5349	354237±30657	73306*	17%
	[³ H] дофамин	сульпирид	54104±9.415	70764±2103	0	0
	[³ H] дигидроалпренолол	пропранолол	723.2±10529	62423±6368	9969	13%
Апонейрокупреин	[³ H] дофамин	сульпирид	211430±8439	68815±7374	142615**	67%
	[³ H] дигидроалпренолол	пропранолол	65597±7837	45075±5276	20522	31%

Примечание. В таблице представлены данные трех опытов. *p<0,05, **p<0,001.

Из приведенных данных можно заключить, что при удалении меди нейрокупреин проявляет способность специфически связываться с лигандами D₂-дофаминовых рецепторов.

Результаты настоящих исследований показали также, что как холонейрокупреин, так и апоформа нейрокупреина неспецифически связываются с лигандами β-адренергических рецепторов. Однако связывание агониста β-адренорецепторов [³H]дигидроалпренолола не ингибируется в присутствии антагониста—пропранолола.

Как было показано ранее [1], медь в нейрокупреине проявляет высокую чувствительность к изменениям pH среды. Возможно, при физиологических значениях pH (7,4) способность меди к связыванию катехоламинов резко падает.

Исходя из существующих представлений об особенностях рецепторных белков, трудно объяснить почему нейрокупреин, являющийся растворимым, сравнительно низкомолекулярным белком, способен специфически связываться с лигандами дофаминовых рецепторов. Однако имеющиеся факты о том, что апоформа нейрокупреина, являясь природным ингибитором дофамин-β-монооксигеназы, регулирует обмен дофамина, влияет на уровень меди в мозгу и, как показали настоящие исследования, специфически связывается с дофамином, дают основания предполагать, что данный белок является фрагментом дофаминового рецептора, и поэтому,

вероятно, может играть ключевую роль в развитии шизофрении и других патологий, связанных с нарушением обмена дофамина. —

BINDING OF D₂-DOPAMINE RECEPTOR LIGANDS WITH EXTREMELY ACID COPPER CONTAINING PROTEIN-NEUROUCPREIN

BUNIATIAN G. H., *MIKELADZE D. G., *ABUTIDZE K. D., MELIKYAN A. M.
and NALBANDYAN R. M.

Institute of Biochemistry Arm. SSR Acad. Sci., Yerevan

*Institute of Physiology Georg. SSR Acad. Sci., Tbilisi

The radioligand binding analyses revealed the ability of aponeurocuprein for specific binding with dopaminergic agonist [³H] dopamine. [³H] Dopamine binding with aponeurocuprein was 60% replaced by specific D₂-dopamine receptor antagonist sulpiride, whereas no specific binding occurred when copper-containing form of neurocuprein was used.

Binding of β-adrenergic agonist [³H] dihydroalprenolol with holocuprein and aponeurocuprein was not inhibited by β-adrenergic antagonist propranolol.

Earlier reports combined with the present evidence favor the hypothesis that aponeurocuprein seems to be a fragment of D₂-dopamine receptor.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sharoyan S. G., Shalyan H. H., Nalbandyan R. M., Buniatian H. Ch. Biochem. et biophys. akta, v. 493, p. 478–487, 1977.
2. Grygorian N. A., Nalbandyan R. M., Buniatian H. Ch. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 103, p. 921–928, 1981.
3. Gasparov V. S., Nalbandyan R. M., Buniatian H. Ch. FEBS Lett., v. 97, p. 37–41, 1979.
4. Налбандян Р. М. Нейрохимия, т. 5, № 1, с. 74–84, 1986.
5. Markossyan K. A., Paitian N. A., Mikaelyan M. V., Nalbandyan R. M. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 138, p. 1–8, 1986.
6. Keabian J. W., Calne D. B. Nature, v. 277, p. 93–96, 1979.
7. Mikaelyan M. V., Grygorian N. A., Nalbandyan R. M. Biochem. et biophys. akta, v. 924, p. 48–55, 1987.
8. Davits B. I. Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 121, p. 404–427, 1964.
9. Andrews P. Biochem. J., v. 96, p. 595–606, 1965.
10. Egly J. M., Porath J. J. Chromatogr., v. 168, № 1, p. 35–37, 1979.
11. Charbonneau H., Cormier M. J. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 90, № 3, p. 1039–1047, 1979.
12. Simon E., Dole W. P., Hitler J. M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 69, p. 1835–1847, 1972.
13. Costa E.—In: Synaptic Constituents in Health and Disease. Proc. of the Third Meeting for Neurochemistry (eds. M. Brzin, D. Skot. H. Bachelard), p. 687. Mladinska-Knjica—Pergamon Press. Ljubljana-Oxford, 1980.
14. Микеладзе Д. Г., Абутидзе К. Д., Саргания Н. А. Нейрохимия, т. 1, с. 89–94, 1987.
15. Чиченков О. Н., Коробов Н. В., Петрова В. Е. Фармакология и токсикология, т. XLVIII, № 2, с. 58–61, 1985.

Поступила 17. XII. 1983