

11. Думлер Н. А., Фурас В. В., Этингоф Р. Н. Докл. АН СССР, т. 253, № 6, с. 1504—1508, 1980.
12. Fung B. K., Hurley J. B., Stryer L. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 78, № 1, p. 152—156, 1980.
13. Hurley J. B., Barry B., Ebrey T. G. Biochim. et biophys. acta, v. 675, № 34, p. 359—365, 1981.
14. Bitensky M. W., Haliday K. R., Rasenick M., Sorbi R. T., Stein P. J., Uchida S., Wheeler G. L., Yamazaki A. — In: Molecular Processes in Vision. Benchmark Papers in Biochemistry (eds. E. W. Abrahamson, S. E. Ostroy), v. 3, p. 331—339, Hutchinson Ross Publ. Co., Stroudsburg, Pa. 1984.
15. Liebman P. A., Sitaramayya A., Purkes J. H., Buzdygon M. W. Trends Pharmac. Sci., v. 5, № 7, p. 293—296, 1984.
16. Bitensky M. W., Yamazaki A., Wheeler G. L., George J. S., Rasenick M. M. Adv. Cycl. Nucl. Res., v. 17, p. 227—238, 1984.
17. Kawamura S., Murakami M. Biochim. et biophys. acta, v. 870, № 2, p. 256—266, 1986.
18. Артемьса Н. О., Этингоф Р. Н. Биохимия, т. 52, № 1, с. 154—159, 1987.
19. Swanson R. J., Applebury M. L. J. Biol. Chem. v. 258, № 17, p. 16599—10605, 1983.
20. Nathans J., Hogness D. S. Cell., v. 34, p. 807—814, 1983.
21. Hurley J. B., Fung B. K., Teplow D. B., Dreyer W. J., Simon M. I. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 81, p. 6948—6952, 1984.
22. Tanabe T., Nukada T., Nishikawa Y., Sugimoto K., Suzuki H., Takanashi H., Hoda M., Haga T., Ichiyama A., Kangawa K., Minamino N., Matsuo H., Numa S. Nature, v. 315, p. 242—245, 1985.
23. Sugimoto K., Nukada T., Tanabe T., Takanashi H., Noda M., Minamino N., Kangawa K., Matsuo H., Hirose T., Inayama S., Numa S. FEBS Lett., v. 191, p. 235—240, 1985.

Поступила 10. IX 1986

УДК 577.1+577.352

РЕЦЕПТОРЫ НЕЙРОЛЕПТИКОВ И ИХ СВЯЗЬ С ПРОТЕИНКИНАЗНЫМИ РЕАКЦИЯМИ

МИКЕЛАДЗЕ Д. Г., АБУТИДЗЕ К. Д., САРТАНИЯ Н. А.

Институт физиологии им. Н. С. Бергшавили АН ГССР, Тбилиси

Из синаптических мембран головного мозга белых крыс солюбилизованы D_2 -дофаминовый и σ -опиатные рецепторы. При хроматографировании полученного экстракта на сульфирид- и галоперидол-сепаразах были выделены белки с величиной M_r 60, 50, 30 и 20 кД. Первые два из них являлись субъединицами Ca^{2+} -кальмодулинзависимой протеинкиназы II. Гель-фильтрация очищенных фракций на колонках высокого давления показала наличие еще одного низкомолекулярного белкового фрагмента с M_r 9 кД. Данный пептид специфически связывал D_2 -дофаминовый и σ -опиатные лиганды, что свидетельствует о том, что за D_2 -дофаминовую и σ -опиатную рецепцию является ответственным один и тот же участок активного центра. Предполагается, что Ca^{2+} -кальмодулинзависимая протеинкиназа либо функционально связана с рецепторным белком, либо сама содержит активные домены, взаимодействующие со специфическими лигандами.

В настоящее время показано, что многие типы рецепторных белков связаны с протенинкиназными системами клетки, осуществляющими фосфорилирование мембран и цитоплазматических белков [1]. Внутриклеточный домен рецепторов многих гормонов и факторов роста является протенинкиназой, фосфорилирующей белки по тирозиновому остатку [2]. С протенинкиназами взаимодействуют также и β -адренорецептор [3], холинорецепторы мускаринового и никотинового типов [4, 5], некоторые субтипы опиатных рецепторов [6]. Ранее нами было показано, что D_2 -дофаминовый рецептор солюбилизируется и очищается совместно с Ca^{2+} -кальмодулинзависимой протенинкиназой, которая изменяет константы связывания 3H -нейролептиков с мембранами [7].

Наиболее близко по своим фармакологическим и физиологическим свойствам к D_2 -дофаминовому рецептору стоят σ -опиатные белки. σ -Опиатный рецептор специфически связывает кетощиклазолин и является нечувствительным к налоксону [8]. Агонисты этого рецептора вызывают психотомимические и дисфорические эффекты и влияют на поведенческую активность животных и человека. Там, Cook [9] показали, что σ -рецептор может связывать один из специфических лигандов D_2 -дофаминового рецептора— 3H -галоперидол, поэтому установление молекулярной организации σ -рецептора и идентификация его активных участков позволит выяснить механизмы действия как психотомимических, так и нейролептических средств. Целью настоящего исследования явилось выделение активных фрагментов σ -опиатного и D_2 -дофаминового рецепторов и сравнение их физико-химических свойств.

Солюбилизацию обоих рецепторов производили неионным детергентом ХАПС (3-[(3-холамидопропил)диметиламмоний]-1-пропан сульфат) и далее хроматографировали на аффинных колонках галоперидол-сефарозы и сульпирид-сефарозы. Элюаты, полученные с колонок, анализировали электрофорезом с ДДС-Na в ПААГ. Поскольку атипичный нейролептик сульпирид является высокоспецифичным антагонистом D_2 -дофаминового рецептора [10], а галоперидол, кроме D_2 , связывается и с другими белками, в том числе и с σ -опиатным рецептором, в элюатах с галоперидол-сефарозной колонки был обнаружен более широкий спектр белков (рис. 1, а). Около 5 фракций проявилось на электрофореграмме при окрашивании $AgNO_3$ геля элюатов с галоперидол-сефарозной колонки, и лишь 3 было найдено при электрофорезе элюатов, собранных с сульпирид-сефарозы. В обоих случаях главными оказались белки с величиной M_r 60 и 50 кД. Учитывая, что эти белки мигрировали аналогично очищенной и гомогенной Ca^{2+} -кальмодулинзависимой протенинкиназе, а также то, что элюаты с обоих аффинных сорбентов обладали подобной же ферментативной активностью, можно заключить, что они являются субъединицами Ca^{2+} -кальмодулинзависимой протенинкиназы.

Следует также отметить то, что эта протенинкиназа обнаруживается не только после хроматографирования на аффинных колонках со связанными нейролептиками, но и идентифицируется при гель-фильтрации солюбилизованного экстракта на TSK-gel HW-55 («Toyo Soda, MFG».

Япония) и сопутствует рецепторной активности (рис 1,б). Уменьшение специфического связывания ^3H -налоксона во фракциях сопровождалось понижением величины активности полос на электрофореграмме, соответствующих белкам с M_r 60 и 50 кД. Полученные данные могут свидетельствовать о том, что Ca^{2+} -кальмодулинзависимая протеинкиназа сопутствует как D_2 -дофаминовой, так и опиатной активности.

Как уже было сказано выше, с галоперидолом могут взаимодей-

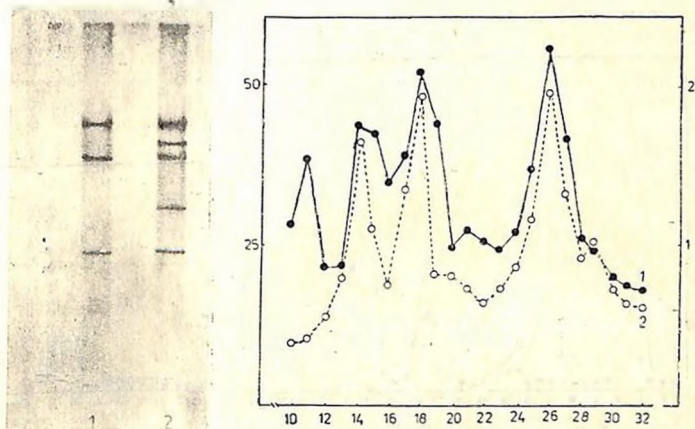


Рис. 1. а—электрофореграмма белков, полученных после хроматографирования солиubilизированного экстракта на сульфид-сефарозе (1) и галоперидол-сефарозе (2); б—хроматография солиubilизированных белков на TSK-gel HW-55. 1—протеинкиназная активность, 2—специфическое связывание ^3H -налоксона. По оси абсцисс—номера проб; по осям ординат слева—протеинкиназная активность в 10^3 имп/мин ^3P ; справа—связывание ^3H -налоксона в 10^3 имп/мин

вовать не только белки, проявляющие D_2 -дофаминовую активность, но и σ -опиатный рецептор [9]. Для выяснения того, какие из белков, связывающиеся с галоперидол-сефарозой, являются ответственными за σ -опиатную активность, проводили гель-фильтрацию на колонке высокого давления Protein Pak SW-300 („Millipore-Waters“, США) после предварительного инкубирования с ^3H -SKF 10047. Выяснилось, что из 5 белковых пиков, выходящих из колонки, 3 обладали σ -рецепторной активностью. Радиоактивный лиганд связывали белки, выходящие в свободном объеме колонки, и белки с M_r 60, 50 и 9 кД. Максимальной активностью характеризовался низкомолекулярный пик, который, по-видимому, соответствовал протеолитическому фрагменту рецепторного белка (рис. 2. а).

В процессе выделения и солиubilизации рецепторных белков в результате активности эндогенных протеаз происходит образование пептидных фрагментов. Некоторые из них, несмотря на небольшую величину

M_r , проявляют рецепторную активность и могут связывать специфические лиганды [11]. Однако, обладая активными участками связывания радиоактивных лигандов, из-за отсутствия пространственной ориентации и третичной структуры они теряют стереоспецифичность. Поскольку эти пептиды имеют сравнительно простую структуру, то их изучение является более удобным для идентификации активных участков рецепторного белка.

Полученный нами низкомолекулярный фрагмент с величиной M_r 9 кД

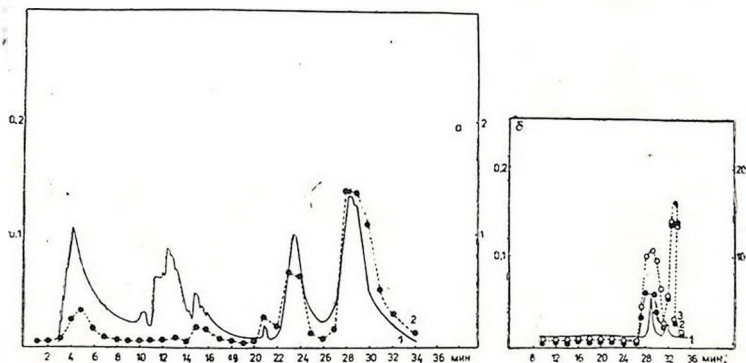


Рис. 2. Гель-фильтрация галоперидолсвязывающих белков на колонке SW-300 (а) и пептида с величиной M_r 9 кД на колонке SW-60 (б). 1—количество белка; 2—связывание ^3H -SKF 10047; 3—связывание ^3H -домперидона. По оси абсцисс—время в мин; по осям ординат: слева—поглощение при A_{214} в усл. ед., справа—связывание ^3H -SKF 10047 и ^3H -домперидона в 10^2 имп/мин

содержал активные рецепторные центры связывания ^3H -домперидона и ^3H -SKF 10047, причем связывание этих соединений было специфичным, ибо радиоактивные лиганды при инкубировании замещались нерадиоактивными. Гель-фильтрация высокого давления на колонке Protein Pak SW-60 („Millipore-Waters“, США) показала, что пик специфической радиоактивности соответствовал пептиду, выходящему в объеме M_r 9 кД (рис. 2, б).

Полученный с помощью аффинной хроматографии и двух гель-фильтрационных колонок чистый фрагмент рецептора подвергали протеолитическому перевариванию (рис. 3, а). С целью получения галоперидолсвязывающих аминокислотных последовательностей после обработки протеазами гидролизат повторно наносили на аффинную колонку галоперидол-сефарозы. Из всех использованных нами протеаз (трипсина, химотрипсина, проназы, колагеиназы и папаина) лишь проназа отсекала фрагмент, обладавший способностью связываться с аффинной колонкой (рис. 3, б). Папаин, химотрипсин и трипсин вызывали более сильное

расщепление белка и образовавшиеся пептиды, состоявшие из 10—15 аминокислот, не связывались с галоперидолом.

Связывавшийся с галоперидол-сефарозой отщепляемый проназой фрагмент имел величину M_r 3,5 кД; кроме 3H -галоперидола и 3H -домперидона он связывал также и 3H -SKF 10047. Предварительная инкубация пептида с этими соединениями с дальнейшей гель-фильтрацией смеси на SW-60 показала, что радиоактивность обнаруживалась в объеме M_r 3,5 кД; это свидетельствовало о том, что данный фрагмент содержит также и центр связывания, ответственный за σ -опиатную активность.

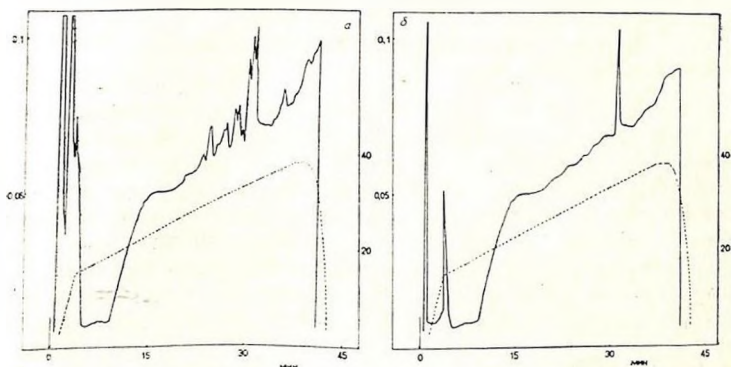


Рис. 3. Хроматография проназного гидролизата пептида с величиной M_r 9 кД на колонке C18 (RP) (а) и проназного гидролизата пептидов (б), связывающихся с галоперидол-сефарозой. 1—количество белка, 2—выделение CH_3CN . По оси абсцисс—время в мин; по осям ординат: слева—поглощение при A_{214} в усл. ед., справа—выделение CH_3CN , в %.

Таким образом, с помощью аффинной колонки и хроматографии высокого давления был получен минимальный фрагмент рецепторного белка, обладающий как σ -опиатной, так и D_2 -рецепторной активностями. O'Callaghan и соавт. [6] показали, что опиаты в зависимости от времени и дозы вызывают усиление фосфорилирования белков синаптических мембран с M_r 60 и 50 кД. Наши предыдущие [7] и вышеприведенные исследования также указывают на то, что белки с M_r 63 и 52 кД являются сопутствующими D_2 -дофаминовому и опиатным рецепторам. Эти белки являются субъединицами Ca^{2+} -кальмодулинзависимой протенинказы II, имеющей высокую величину M_r и обладающей самофосфорилирующей активностью [12]. Эта Ca^{2+} -кальмодулинзависимая протенинказа широко распространена в нейронах, образует специфическую пространственную структуру и связана со многими клеточными элементами нейрона, в том числе белками синаптических мембран и постсинаптических уплотнений [13, 14]. Полученные нами данные могут свидетельствовать о том, что либо Ca^{2+} -кальмодулинзависимая протенин-

наза функционально связана с D_2 - и опиатными рецепторами, либо сама имеет домены, ответственные за рецепцию нейролептиков и пептиклиндов.

Мы не можем в настоящее время сказать, являются ли полученные нами низкомолекулярные пептиды фрагментами белков с M_r 62 и 53 кД, или они являются продуктами протеолитического распада других белков. Однако ясно, что пептид с величиной M_r 9 кД является фрагментом белка, ответственного за σ -опиатную и D_2 -дофаминовую активность.

RECEPTORS OF NEUROLEPTICS AND THEIR CONNECTION WITH PROTEIN KINASE REACTIONS

MIKELADZE D. G., ABUTIDZE K. D., SARTANIJA N. A.,

I. S. Beritashvili Institute of Physiology Georgian SSR Acad. Sci, Tbilisi

D_2 -Dopamine and σ -opiate receptors have been solubilized from rat brain synaptic membranes. On chromatography on sulpyrid-and haloperidol-Sepharose 6B proteins with M_r 60,50,30 and 20 K have been resolved. The first two turned to be subunits of Ca^{2+} , calmodulin-dependent protein kinase II. HPLC Made it possible to identify one more low- M_r component with M_r 9K; this peptide specifically binds both with D_2 -dopamine and σ -opiate ligands pointing to the fact that one common site of the active center is responsible for D_2 -dopamine and σ -opiate reception. A suggestion is made that Ca^{2+} -calmodulin dependent protein kinase may be either functionally coupled with receptor proteins or itself contains active domains reacting with specific ligands.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Nestler E. J., Walacs S. I., Greengard P. Science, v. 225, p. 1357—1364, 1984.
2. Nairn A. C., Hemmings H. C., Greengard P. Annu. Rev. Biochem., v. 54, p. 931—976, 1985.
3. Nambi P., Peters Y. R., Sibley D. R., Lefcowitz R. L. J. Biol. Chem., v. 260, p. 2165—2171, 1985.
4. Burgoyne R. D. FEBS Lett., v. 122, p. 282—288, 1980.
5. Changeux Y.—P., Deviffers—Thierry A., Chemouiffi P. Science, v. 225, p. 1335—1345, 1984.
6. O'Callaghan J. P., Joskevich J. C., Lovenberg W. J. Pharmacol. Experim. Therap., v. 220, p. 696—702, 1982.
7. Mikeladze D. G., Dzeladze D. T. J. Neurochem., v. 44, suppl. p. 575, 1985.
8. Snyder S. H. Science, v. 224, p. 22—31, 1984.
9. Tam S. W., Cook L. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 81, p. 5618—5621, 1980.
10. Seem P. Pharmacol. Rev., v. 32, p. 229—313, 1980.
11. Howard A. D., de La Baume, Gioannini T. L., Hiller J. M., Simon E. J. Biol. Chem., v. 260, p. 10833—10839, 1985.
12. Lai Y., Nairn A. C., Greengard P. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 83, p. 4253—4257, 1985.
13. Goldenring J. R., McGuire J. S. Jr., DeLorenzo R. J. J. Neurochem., v. 42, p. 1077—1084, 1984.
14. Shieds S. M., Vernon P. J., Kelly T. J. Neurochem., v. 43, p. 1599—1609, 1984.

Поступила 9. IX 1986