



## КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 612.815.1:577.354

### ВЫДЕЛЕНИЕ РЕЦЕПТОРА ГАМК ИЗ МОЗГА КРЫС АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЕНАЗЕПАМА

КАРАНОВА М. В., КУЗНЕЦОВ В. Н., ТОНКИХ А. К.

Институт биологической физики АН СССР, Пушкино-на-Оке

ГАМК является основным тормозным медиатором ЦНС млекопитающих. Согласно современным представлениям, постсинаптический ГАМК-рецептор является частью макромолекулярного комплекса, включающего в себя также связывающие участки с высоким сродством и для бензодиазепинов [1]. Это обстоятельство предполагает возможность очистки ГАМК-рецепторных участков с использованием в качестве аффинного сорбента бензодиазепинов. Отдельные попытки показали, что очистка на бензодиазепиновом сорбенте приводила к увеличению ГАМК-рецепторного связывания [2, 3].

В настоящей работе приведены результаты очистки ГАМК-рецепторных участков аффинной хроматографией, где в качестве сорбента использовался отечественный бензодиазепин—феназепам [4].

Фракцию ( $P_2$ ) грубых мембран мозга крыс получали общепринятыми методами. Отмывание мембран 0,02%-ным тритоном X-100, солюбилизацию мембран 0,2%-ным DOX-Na и осаждение солюбилиизата сульфатом аммония проводили, как описано Asano, Ogasaawaga [5]. Связывание 3H-мусцимола с солюбилизированным ГАМК-рецептором определяли, используя фильтрование на нитроцеллюлозных фильтрах «Synpro» (ЧССР) с размером пор 0,4—0,8 мкм, как было описано ранее для связывания с препаратами мембран [6]. Оценку величины  $M_r$  солюбилизированного ГАМК-рецептора проводили методом гель-фильтрации на колонке с сефарозой CL-6B (1,6×50 см), на которую наносили 2 мл солюбилизированного препарата (10 мг белка/мл) и промывали 50 mM трис-HCl буфера (pH 7,4) с 0,1%-ным тритоном X-100 со скоростью 15 мл/ч. В элюируемых фракциях (по 2 мл) определяли специфическое ГАМК-рецепторное связывание 3H-мусцимола.

В качестве аффинного сорбента использовали феназепам, который реакцией алкилирования присоединяли к АН-сефарозе, как описано в работе Cuatrecasas [7]. Колонку (1×10 см) заполняли феназепам-сефарозой и уравнивали её 50 mM трис-HCl буфером (pH 7,4) с 0,1%-ным тритоном X-100. Затем через неё пропускали 100 мл раствора солюбилизированного ГАМК-рецептора в этом же буфере с концентрацией белка 1 мг/мл при скорости около 50 мл/ч и промывали 500 мл буфера. Для элюции применяли растворы бензодиазепинов с концентрацией 5 mM, которые предварительно растворяли в этаноле, а затем в 50 mM трис-буфере. Так, чтобы конечная концентрация этанола составляла 10%. Элюирующий раствор содержал также

0,5%-ный ДОХ-На или 0,1%-ный тритон X-100. За ходом элюции следили, измеряя специфическое связывание  $^3\text{H}$ -мусцимола. Элюируемый белок выходил пиком в объеме 40 мл. Так как 10%-ный этанол уменьшает удержание солиобилизованного белка фильтрами, а растворенные бензодиазепины затрудняют точное определение белка, элюируемый белок анализировали против 50 мМ трис-НСl (рН 7,4) с 0,1%-ным тритоном X-100.

Электрофорез в ПААГ с ДДС-На проводили по методу Weber и Osborn [8]. Белок перед солиобилизацией ДДС-На осаждали 12%-ной ТХУ и определяли по методу Lowry и соавт. [9].

В работе использовали  $^3\text{H}$ -мусцимол с У.А. 15 Ки/ммоль («Amersham», Англия), немеченый мусцимол («Serva», ФРГ), сефарозу CL-6B и АН-сефарозу 4B («Fagmacia», Швеция), феназепам, нитразепам и диазепам были любезно предоставлены С. А. Андронати (Физико-химический институт АН УССР). Остальные реактивы были импортные или отечественные, категории «осч».

На рис. 1 представлена хроматография солиобилизованных в 0,2%-ном ДОХ-На мембран мозга крыс на колонке с сефарозой CL-6B. Пик  $^3\text{H}$ -мусцимол связывающей активности приходится на  $M_r \sim 600$  кД. Интересно отметить, что во всех описанных случаях при

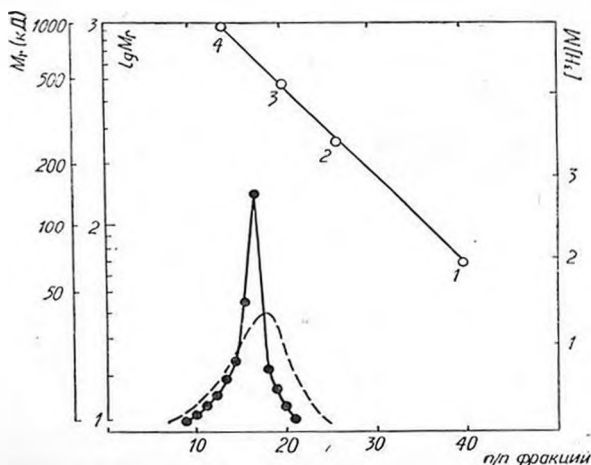


Рис. 1. Гель-фильтрация на сефарозе CL-6B фракции  $P_2$  мозга крыс, солиобилизованной в ДОХ-На. 1—альбумин ( $M_r = 68\,000$ ), 2—каталаза ( $M_r = 240\,000$ ), 3—мономер ферритина ( $M_r = 450\,000$ ), 4—димер ферритина ( $M_r = 990\,000$ ), ———— экстинкция при 280 нм; —•—  $^3\text{H}$ -М—специфическое связывание  $^3\text{H}$ -мусцимола (пмоль/2 мл фракции).

солиобилизировании мембран с ДОХ-На образуются комплексы с величинами  $M_r$  от 550 до 900 кД [10—12], в то время как солиобилизование неионными детергентами, например, тритоном X-100, приводит к величине  $M_r$  около 230 кД [13]. Поэтому, возможно, что полученная нами величина  $M_r$ , равная 600 кД, соответствует димеру или тетрамеру.

После нанесения на колонку с феназепам-сефарозой 100 мл солиобилизованного препарата со специфическим связыванием  $^3\text{H}$ -мус-

цимола порядка 10 пмоль/мг белка, на колонке адсорбируется около 50% связывающей активности, так как в белковом пике, выходящем сразу же из колонки, специфическое связывание уменьшено вдвое. При дальнейшем промывании колонки специфическое связывание  $^3\text{H}$ -мусцимола в элюате практически не обнаруживалось.

Элюцию проводили, используя три разных бензодиазепина в концентрации 5 мМ: нитразепам, диазепам и феназепам. Наибольший выход специфического связывания был получен с феназепамом. После диализа элюата против 50 мМ трис- $\text{HCl}$  с 0,1%-ным тритоном

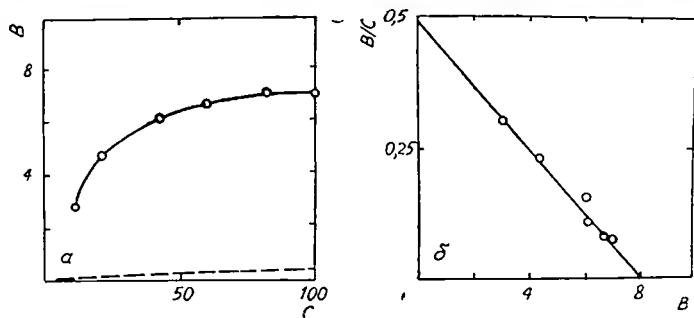


Рис. 2. Связывание  $^3\text{H}$ -мусцимола с предварительно диализованным элюатом из колонки с феназепам-сэфарозой: а—в обычных координатах—по оси абсцисс— $^3\text{H}$ -мусцимол (нМ), по оси ординат—связанный  $^3\text{H}$ -мусцимол (пмоль/мл раствора); б—в координатах Скэтчарда—по оси абсцисс—связанный  $^3\text{H}$ -мусцимол (пмоль/мл раствора). Путирком обозначен уровень неспецифического связывания.

X-100, максимум насыщаемого связывания соответствовал примерно 8 пмоль/мл элюата при концентрации белка в растворе менее 10 мкг/мл (рис. 2), что соответствовало специфическому связыванию  $^3\text{H}$ -мусцимола более 800 пмоль/мг белка. Мы полагаем, что эта величина занижена, так как элюированный из аффинной колонки солубилизат подвергался 2—3-часовому диализу, во время которого возможна некоторая потеря связывающей активности. Если предположить, что величина  $M_r$  комплекса в мономере около 200 кД, как это следует из ряда определений величины  $M_r$  разными методами [11, 13], и ГАМК-рецептор имеет один связывающий участок для мусцимола, то предполагаемая максимальная очистка должна приводить к связыванию около 5 нмоль/мг белка. Полученная нами величина (более 0,8 нмоль/мг белка) и известная из литературы (более 1,3 нмоль/мг белка) [3] приближаются к теоретической. Константа связывания  $^3\text{H}$ -мусцимола с солубилизатом после аффинной колонки ( $\approx 16$  нМ) соответствовала константе связывания с солубилизатом, наносимым на колонку.

Электрофорез в ПААГ с ДДС- $\text{Na}$  даст одну четкую полосу, расположенную между полосами контрольных белков с  $M_r$  45 и 68 кД, что находится в полном соответствии как с данными электрофореза

ГАМК- и бензодиазепинового рецепторов после аффинной хроматографии [2, 3], так и с данными по фотоаффинному мечению мембран мозга  $^3\text{H}$ -мусцимолом и  $^3\text{H}$ -бензодиазепинами [14].

Таким образом, данная работа подтверждает возможность высокой степени очистки ГАМК-рецепторных участков аффинной хроматографией на бензодиазепиновом сорбенте, что открывает дальнейшие возможности для изучения постсинаптических ГАМК-рецепторных комплексов.

## ISOLATION OF RAT BRAIN GABA RECEPTOR BY AFFINITY CHROMATOGRAPHY ON PHENAZEPAM-SEPHAROSE

KARANOVA M. V., KUZNETSOV V. I., TONKYKH A. K.

Institute of Biological Physics, Academy of Sciences of USSR, Poustchino

Phenazepam-Sepharose was used for affinity chromatography of the deoxycholate solubilized  $^3\text{H}$ -muscimol binding sites from rat brain.  $B_{\text{max}}$  of the purified preparation was 0,8 nmol/mg of protein. On SDS-PAGE one major band with  $M_r$  about 55000 has been detected.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Olsen R. W. J. *Neurochem.*, v. 37, p. 1—13, 1981.
2. Gavish M., Snyder S. H. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 78, p. 1939—1942, 1981.
3. Sigel E., Mamalaki C., Barnard E. A. *FEBS Lett.*, v. 147, p. 45—48, 1982.
4. Богатский А. В., Андронати С. А., Якубовская М. Н. Феназепам (под ред. А. В. Богатского), Киев, Наукова думка, 1982.
5. Asano T., Ogasawara N. *Life Sci.*, v. 26, p. 1131—1137, 1980.
6. Кузнецов В. И., Тонких А. К., Ким О. Н., Асланов Х. А. *Укр. биохим. журн.*, т. 54, с. 428—431, 1982.
7. Cuatrecasas P.—In: *Advances in Enzymology*, v. 36, p. 29—38, N. Y., Interscience, 1972.
8. Weber K., Osborn M. J. *Biol. Chem.*, v. 244, p. 4406—4415, 1969.
9. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. *J. Biol. Chem.*, v. 183, p. 235—275, 1951.
10. Greenlee D. V., Olsen R. W. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, v. 88, p. 380—387, 1979.
11. Asano T., Ogasawara N. *Life Sci.*, v. 29, p. 193—200, 1981.
12. Stephenson A., Watkins A. E., Olsen R. W. *Eur. J. Biochem.*, v. 123, p. 291—298, 1982.
13. Chang Li-Ren., Barnard E. A. *J. Neurochem.*, v. 39, p. 1507—1518, 1982.
14. Asano T., Sakakibara J., Ogasawara N. *FEBS Lett.*, v. 151, p. 277—280, 1983.

Поступила 11. XII. 1984