

УДК 576.314.6.088.6 + 612.11.612.82.015

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КИНЕТИКИ СВЯЗЫВАНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТАГОНИСТОВ α_1 - И α_2 -АДРЕНОРЕЦЕПТОРАМИ МЕМБРАН КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

© 2009 г. Л. А. Нестерова, Б. Н. Манухин

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 26;
факс: (095) 8 499 1358012, электронная почта: manukhinb@mail.ru

Поступила в редакцию 27.05.2008 г.

На синапсомембранных мембранах головного мозга крыс исследовано связывание специфических неселективных антагонистов α_1 -адренорецепторов [^3H]празозина и α_2 -адренорецепторов [^3H]RX821002. Установлено, что для α_1 -адренорецепторов лиганд-рецепторное взаимодействие соответствует модели: один пул рецепторов и присоединение двух молекул лиганда к одному рецептору. Параметры связывания [^3H]празозина – $K_d = 1.56 \pm 0.17$ нМ, $B_{\text{max}} = 30.25 \pm 1.78$ фмоль/мг белка, $n = 2$. Для α_2 -адренорецепторов лиганд-рецепторное взаимодействие соответствует той же модели. Параметры связывания [^3H]RX821002 – $K_d = 1.94 \pm 0.08$ нМ, $B_{\text{max}} = 12.77 \pm 3.17$ фмоль/мг белка, $n = 2$. Для своих антагонистов константы диссоциации (K_d) приблизительно одинаковы (1.56 ± 0.17 и 1.94 ± 0.08 нМ соответственно), а концентрация α_2 -адренорецепторов в 2 раза ниже (30.25 ± 1.78 и 12.77 ± 3.17 фмоль/мг белка). Эффективность ($E = B_{\text{max}}/2K_d$) связывания лиганда α -адренорецепторами различается в 2.3 раза – (7.46 ± 1.32 и 3.29 ± 0.68 фмоль/мг белка/нМ) для α_1 - и α_2 -рецепторов соответственно. Предполагается, что α_1 - и α_2 -адренорецепторы в мембранах головного мозга крыс существуют в виде димеров.

Норадреналин, нейротрансмиттер симпатической нервной системы, играет ведущую роль в реализации ее пусковой и модуляторной функции. Регуляторное воздействие норадреналина осуществляется путем активации специфических адренорецепторов. В частности, через α -адренорецепторы осуществляется регуляция артериального давления, сокращение гладких мышц, регуляция когнитивных процессов и т.д. Выделяют два основных типа α -адренорецепторов – α_1 и α_2 . Рецепторы α_1 расположены преимущественно на постсинаптической мембране, а α_2 – как на пре-, так и на постсинаптической мембранах. Активация пресинаптических α_2 -адренорецепторов тормозит выход норадреналина из нервных окончаний, что позволяет использовать их агонисты как антигипертензивные и седативные препараты. Наибольшая концентрация адренорецепторов находится в ЦНС. Иммуногистохимическими методами [1, 2] и по локализации мРНК [3–6] при гибридизации *in situ* показано распространение α_1 - и α_2 -адренорецепторов в различных отделах ЦНС. По определению мРНК выявлена локализация их А, В и С-подтипов [3, 5, 6]. Каждый тип α -адренорецепторов имеет уникальный паттерн распределения в ЦНС. Для α_1 -адренорецепторов характерны локальные зоны распределения, для α_2 -адренорецепторов – широкое, диффузное распространение [7].

В настоящей работе представлены количественные характеристики функциональной активности α_1 - и α_2 -адренорецепторов мембран коры головного мозга крыс и закономерностей присоединения к ним лигандов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Опыты проводили на синапсомембранах коры головного мозга крыс-самцов линии Вистар (210–250 г), которые выделяли по описанному ранее методу [8] с некоторыми модификациями [9]. Готовые мембранные препараты хранили при -70°C в течение 3 недель. Концентрацию белка определяли по методу Лоури [10], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин (“Sigma”). Связывание радиоактивного лиганда проводили в инкубационной среде с последующим промыванием мембран от несвязанного лиганда на стеклянных фильтрах GF/B по общепринятому методу [11]. Объем инкубационной среды составлял 100 мкл – 50 мкл суспензии мембран, 50 мкл 50 мМ буфера трис-НСl, pH 7.4, вытеснитель и радиоактивный лиганд. Реакцию останавливали добавлением 1 мл холодного буфера (0°C). Для определения параметров связывания лиганда с α_1 -адренорецепторами использовали специфический неселективный антагонист α_1 -адренорецепторов [^3H]празозин (“Amersham”, 77 Ки/мМ) в концентрациях 0.33–

6.60 нМ, с α_2 -адренорецепторами – специфический антагонист [^3H]RX821002 (“Amersham”, 50 Ки/мМ), в концентрациях 0.41–4.92 нМ. Специфическое связывание радиоактивных лигандов определяли по разнице между общим и неспецифическим в присутствии нерадиоактивных лигандов (“вытеснителей”) празозина для α_1 -адренорецепторов и раувольфсцина для α_2 -адренорецепторов в концентрациях 100 мкМ. Для определения закономерностей связывания антагонистов со специфическими рецепторами использовали математические и графические методы анализа лиганд-рецепторных взаимодействий.

Ранее на β -рецепторах нативных эритроцитов изолированных мембран эритроцитов, β -рецепторах и мускариновых рецепторах мембран коры головного мозга крыс теоретически и экспериментально были обоснованы методы количественного определения основных параметров в радиолигандных реакциях [12, 13]. Показано, что взаимодействие специфических радиоактивных антагонистов β -адренорецепторов с изолированными мембранами коры мозга крыс описываются уравнениями для одного или двух пулов рецепторов. Действие каждого из исследованных веществ анализировали с использованием семи математических моделей связывания лиганда рецептором [12]. Исходя из этого установлено, что связывание лигандов α_1 - и α_2 -адренорецепторами мембран коры головного мозга крыс происходит по модели, включающей один пул рецепторов.

$$b = [(B_{\max}A^n)/(K_d^n + A^n)], \quad (1)$$

где b – количество связанного лиганда, B_{\max} – количество мест связывания лиганда с константой диссоциации K_d и коэффициентом Хилла n , $[A]$ – концентрация лиганда в инкубационной среде. Расчет основных параметров лиганд-рецепторного взаимодействия – K_d , B_{\max} , n проводили с помощью компьютерной программы “SigmaPlot”. Эффективность связывания лигандов с рецепторами оценивали по уравнению:

$$E = B_{\max}/2K_d. \quad (2)$$

Эффективность (E) – интегральный показатель, количественно характеризующий величину связывания лиганда при его концентрации, равной K_d (фмоль/мг белка/нМ) [12]. На рисунках приведены результаты конкретных опытов, а в таблице – средние результаты экспериментов. Теоретические кривые строили по уравнению (1) для одного пула рецепторов. На теоретические кривые нанесены экспериментальные точки. В опытах было по пять–семь точек, каждая с трехкратным повтором. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента ($p < 0.05$). Все значения представ-

лены как среднее арифметическое и средняя ошибка ($M \pm \text{sem}$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

График специфического связывания [^3H]празозина изолированными мембранами коры головного мозга крыс представляет типичную кривую насыщения (рис. 1). Математический анализ экспериментальных данных показал, что наименьшие ошибки параметров и стандартной ошибки вычисления (Standard Error of the Estimate) получены при их расчете по уравнению (1), модели лиганд-рецепторного взаимодействия, предполагающей присоединение двух молекул лиганда к одному рецептору и включающей один пул рецепторов (таблица). Графический анализ экспериментальных данных с помощью уравнения (3), линеаризованной формы уравнения (1), в координатах (b ; b/A^2) также соответствует существованию одного гомогенного пула α_1 -адренорецепторов (рис. 2).

$$(b/A^2) = [(B_{\max})/(K_d^2)] - [b/(K_d^2)]. \quad (3)$$

Экспериментальные точки на графике расположены на прямой линии. Для подтверждения соответствия полученным данным параметров, рассчитанных по уравнению (1) и (3), построены теоретические кривые, с которыми хорошо совпадают экспериментальные точки (рис. 1 и 2).

Связывание [^3H]RX821002 α_2 -адренорецепторами изолированных мембран коры головного мозга крыс также описывается стандартными кривыми насыщения (рис. 3). Математический анализ экспериментальных данных показал, что наименьшие ошибки параметров и стандартной ошибки вычисления получены при их расчете по уравнению (1) и модели связывания – присоединение двух молекул лиганда к рецептору и одного гомогенно-

Параметры связывания [^3H]празозина и [^3H]RX821002 α_1 - и α_2 -адренорецепторами мембран коры головного мозга крыс

Параметры	α_1 -адренорецепторы	α_2 -адренорецепторы
K_d , нМ	1.56 ± 0.17	1.94 ± 0.08
B_{\max} , фмоль/мг	30.25 ± 1.78	12.77 ± 3.17
n	2	2
E , фмоль/мг/нМ	7.46 ± 1.32	3.29 ± 0.68
Стандартная ошибка вычисления*	1.94 ± 0.41	0.57 ± 0.17

Примечание. K_d – константы диссоциации; B_{\max} – концентрация адренорецепторов; n – коэффициент Хилла; E – эффективность. * Standard Error of the Estimate.

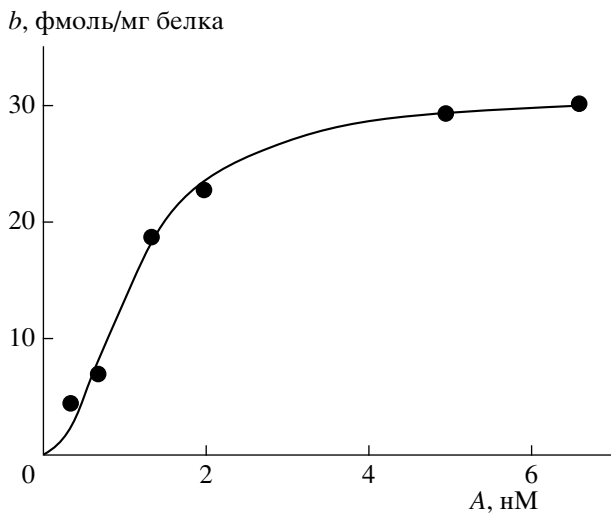


Рис. 1. Экспериментальные точки и теоретическая кривая специфического связывания [^3H]празозина α_1 -адренорецепторами мембран коры головного мозга крыс. По оси абсцисс – концентрация [^3H]празозина (нМ), по оси ординат – количество мест, связанных лигандом (b , фмоль/мг белка). Теоретическая кривая рассчитана при значениях параметров: $K_d = 1.10$ нМ, $B_{\text{max}} = 30.65$ фмоль/мг белка.

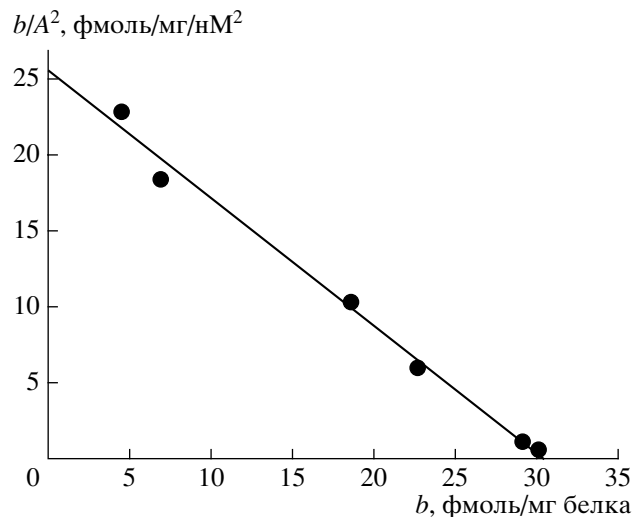


Рис. 2. Экспериментальные точки и теоретическая кривая специфического связывания [^3H]празозина α_1 -адренорецепторами мембран коры головного мозга крыс. По оси абсцисс – количество мест, связанных лигандом (b , фмоль/мг белка), по оси ординат – отношение количества мест, связанных лигандом, к квадрату его концентрации (b/A^2 , фмоль/мг/нМ²).

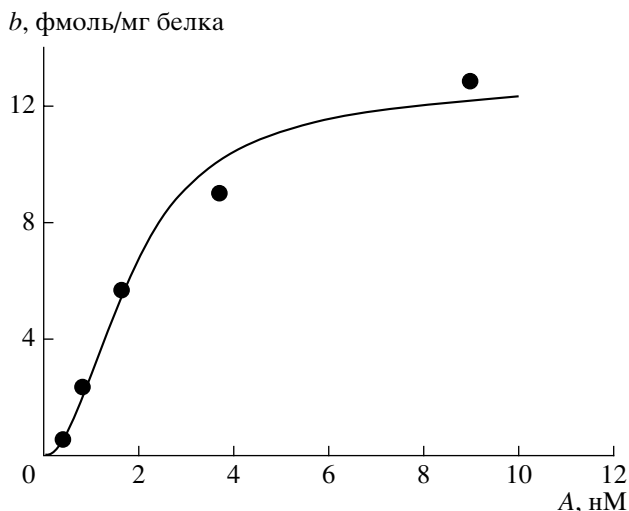


Рис. 3. Экспериментальные точки и теоретическая кривая специфического связывания [^3H]RX821002 α_2 -адренорецепторами мембран коры головного мозга крыс. По оси абсцисс – концентрация [^3H]RX821002 (нМ), по оси ординат – количество мест, связанных лигандом (b , фмоль/мг белка). Теоретическая кривая рассчитана при значениях параметров: $K_d = 1.88$ нМ, $B_{\text{max}} = 12.65$ фмоль/мг белка.

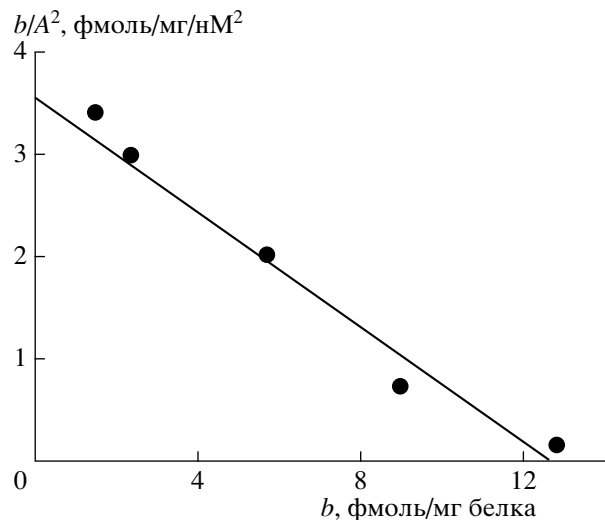


Рис. 4. Экспериментальные точки и теоретическая кривая специфического связывания [^3H]RX821002 α_2 -адренорецепторами мембран коры головного мозга крыс. По оси абсцисс – количество мест, связанных лигандом (b , фмоль/мг белка), по оси ординат – отношение количества мест, связанных лигандом, к квадрату его концентрации (b/A^2 , фмоль/мг/нМ²).

го по аффинности пула рецепторов (таблица). Графический анализ экспериментальных данных с помощью уравнения (3) в координатах (b ; b/A^2) также соответствует существованию одного гомогенного пула α_2 -адренорецепторов (рис. 4). Для подтвер-

ждения соответствия рассчитанных параметров экспериментальным результатам по уравнению (1) и (3) построены теоретические кривые, с которыми хорошо совпадают экспериментальные точки (рис. 3 и 4).

Кинетика связывания специфических лигандов α_1 - и α_2 -адренорецепторами мембран коры головного мозга крыс сходна по основным характеристикам. Величина связывания лиганда зависит от его концентрации и насыщаема, т.е. при определенной, характерной для каждого типа рецепторов концентрации лиганда в инкубационной среде, достигается максимальная концентрация комплекса лиганда с активными рецепторами. Экспериментальные данные лучше описываются уравнениями (1, 3) при величине $n = 2$, т.е. к рецептору присоединяются две молекулы лиганда и α_1 - и α_2 -адренорецепторы представлены в виде гомогенных пулов (таблица).

На рис. 1 и 3 видно, что в картезианских координатах зависимость величины реакции от концентрации лиганда одинаково представлена гиперболой. Величины основных параметров K_d и B_{max} характеризуют аффинность рецепторов и их количество в эффекторной системе. Трактовка значения величины n не столь однозначна. Предполагается, что n (в энзимологии его называют коэффициентом кооперативности, коэффициентом Хилла) характеризует кооперативность взаимодействия лиганда с ферментом, показывает число молекул лиганда, присоединяющихся к ферменту [14, 15]. Хилл [16] рассчитал кинетику связывания кислорода с гемоглобином в шести разных инкубационных средах. Показано, что количество молекул кислорода, связывающихся с молекулой гемоглобина, величина n , колеблется от 1.67 до 3.19. Молекула гемоглобина состоит из четырех субъединиц [17], что теоретически позволяет предположить возможность присоединения четырех молекул кислорода. Полученная нами величина $n = 2$ (таблица) в уравнении связывания лиганда с рецептором формально указывает на присоединение двух молекул лиганда к одному рецептору. Это возможно при наличии двух специфических мест связывания лиганда на одной молекуле рецептора или существовании рецепторов в виде димеров. По-видимому, кооперативное взаимодействие между двумя лиганд-связывающими центрами может проявляться только при активации обоих активных центров связывания димерных рецепторов. Так, на серотониновых димерных рецепторах показано, что присоединения серотонина к одному из них, недостаточно для активации G_q белка и образования инозитолтрифосфата [18]. В последние годы с помощью количественного биолюминесцентного/флуоресцентного метода (BRET/FRET bioluminescence/fluorescence resonance energy transfer) экспериментально установлена возможность различных семидоменных G-белок-связывающих рецепторов образовывать гомо- и гетеродимеры [19]. Показана гомодимеризация подтипов α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} α_1 -адренорецепторов [20], гомо- и гетеродимеризации

α_{2A} и α_{2C} -адренорецепторов [21]. Гетеродимер α_{1B} и α_{1D} образует один рецептор с активностью большей, чем у отдельных подтипов [22].

В литературе мало прямых данных о присоединении двух молекул лиганда к одному рецептору. Показано присоединение двух молекул хинуклидинилбензилата к М-холинорецепторам мембран коры мозга [9] и [3H]пропранолола к β -адренорецепторам эритроцитов крыс [11]. Косвенно на такую возможность указывают экспериментальные данные, в которых коэффициенты n мускариновых холинорецепторов мембран миокарда [23], мембран электрического органа ската *Torpedo californica* больше единицы [24]. Есть данные о кооперативном связывании [3H]хинуклидинилбензилата и других лигандов с М-холинорецепторами [23–26], изопротеренола с β -адренорецепторами [27]. На основании теоретических и экспериментальных данных можно предполагать, что величина n показывает количество молекул лиганда, присоединяющихся к одному моно- или димерному рецептору. Эта величина, наряду с K_d и B_{max} , является объективным количественным показателем кинетики лиганд-рецепторного взаимодействия и функциональной характеристики специфических рецепторов.

Рассмотрена система количественного анализа лиганд-рецепторных взаимодействий. Определяемые при этом основные параметры дают характеристику свойств исследуемой системы: количество пулов рецепторов, их аффинность к лиганду (K_d), количество активных рецепторов (B_{max}), количество молекул лиганда, связывающихся с рецептором (n). Производный параметр – эффективность $E = B_{max}/2K_d$ – количественно характеризует общую активности эффекторной системы. Предложенный метод анализа лиганд-рецепторных взаимодействий применим для исследования биологических реакций, результаты которых могут быть представлены количественно.

Работа поддержана грантом РФФИ № 05-04-48340а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Acosta-Martinez M., Fiber J.M., Brown R.D., Etgen A.M. Localization of alpha1B-adrenergic receptor in femal rat brain regions involved in stress and neuroendocrine function // *Neurochem. Int.* 1999. V. 35. № 5. P. 383–391.
2. Nakadate K., Imamura K., Watanabe Y. Cellular and subcellular localization of alpha-1 adrenoceptors in the rat visual cortex // *Neuroscience.* 2006. V. 141. № 4. P. 1783–1792.
3. Price D.T., Lefkowitz R.J., Caron M.G., Berkowitz D., Schwinn D.A. Localization of mRNA for three distinct alpha1-adrenergic receptor subtypes in human tissues: implications for human alpha-adrenergic physiology // *Mol. Pharmacol.* 1994. V. 45. № 2. P. 171–175.

4. *Domyancic A.V., Morilak D.A.* Distribution of alpha1A adrenergic receptor mRNA in the rat brain visualized by *in situ* hybridization // *J. Comp. Neurol.* 1997. V. 386. № 3. P. 358–378.
5. *Berkowitz D.E., Price D.T., Bello E.A., Page S.O., Schwinn D.A.* Localization of messenger RNA for three distinct alpha2-adrenergic receptor subtypes in human tissues. Evidence for species heterogeneity and implications for human pharmacology // *Anesthesiology.* 1994. V. 81. № 5. P. 1235–1244.
6. *Scheinin M., Lomasney J.W., Hayden-Hixson D.M., Scambra U.B., Caron M.G., Lefkowitz R.J., Fremneau R.T. Jr.* Distribution of alpha2-adrenergic receptor subtype gene expression in rat brain // *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1994. V. 21. № 1–2. P. 133–149.
7. *McCune S.K., Voigt M.M., Hill J.M.* Expression of multiple alpha adrenergic receptor subtype messenger RNAs in the adult rat brain // *Neuroscience.* 1993. V. 57. № 1. P. 143–151.
8. *Henn S.W., Henn F.A.* Handbook of neurochemistry. The identification of subcellular fractions of the central nervous system/Ed. Lajtha A. N.Y., London: Plenum Press, 1982. P. 147–161.
9. *Нестерова Л.А., Смурова Е.А., Манухин Б.Н.* Характеристика связывания специфического блокатора [³H]хиноклидинилбензилата М-холинорецепторами мембран коры мозга крыс // Доклады АН. 1995. Т. 343. № 2. С. 268–271.
10. *Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.I.J.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. P. 265–275.
11. *Манухин Б.Н., Нестерова Л.А., Смурова Е.А.* Характеристика кинетики взаимодействия β-адренорецепторов эритроцитов крыс со специфическим блокатором пропранололом // Биол. мембраны. 1994. Т. 11. № 5. С. 489–485.
12. *Манухин Б.Н., Нестерова Л.А., Смурова Е.А., Кичулова Т.П.* Анализ взаимодействия радиоактивных лигандов со специфическими рецепторами // Биол. мембраны. 1999. Т. 16. № 3. С. 541–555.
13. *Manukhin B.N., Nesterova L.A., Smurova E.A., Kichulova T.P.* An approach to analysis of radiolabeled ligand interactions with specific receptors // *Eur. J. Pharmacol.* 1999. V. 386. № 2–3. P. 273–288.
14. *Диксон М., Уэбб Э.* Ферменты: Пер. с англ. М.: Мир, 1982. Т. 3. 1117 с.
15. *Келети Т.* Основы ферментативной кинетики: Пер. с англ. М.: Мир, 1990. 348 с.
16. *Hill A.V.* The possible effects of the aggregation of the molecules of hemoglobin on its dissociation curves // *J. Physiol.* 1910. V. 40. *Proceed. Physiol. Soc.* P. iv–vii.
17. *Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф.* Биологическая химия: М.: Медицина, 2007. 704 с.
18. *Herrick-Davis K., Grinde E., Harrigan T.J., Mazurkiewicz J.E.* Model of wild-type 5-HT2C receptor inactivation following heterodimerization with S138R 5-HT2C receptors // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. № 48. P. 40144–40151.
19. *Авдонин П.В.* Структура и сигнальные свойства сопряженных с G-белками рецепторных комплексов // Биол. мембраны. 2005. Т. 22. № 1. С. 3–26.
20. *Uberty M.A., Hall R.A., Minneman K.P.* Subtype-specific dimerization of alpha1-adrenoceptors: effects on receptor expression and pharmacological properties // *Mol. Pharmacol.* 2003. V. 64. № 6. P. 1379–1390.
21. *Small K.M., Schwarb M.R., Glinka C., Theiss C.T., Brown K.M., Seman C.A., Liggett S.B.* Alpha1A- and alpha2C-adrenergic receptors form homo- and heterodimers: the heterodimeric state impairs agonist-promoted GRK phosphorylation and beta-arrestin recruitment // *Biochemistry.* 2006. V. 45. № 45. P. 4760–4767.
22. *Hague C., Lee S.E., Chen Z., Prinster S.C., Hall R.A., Minneman K.P.* Heterodimers of alpha1B- and alpha1D-adrenergic receptors form a single functional entity // *Mol. Pharmacol.* 2006. V. 69. № 1. P. 45–55.
23. *Wreggett K.A., Wells J.W.* Cooperativity manifest in the binding properties of purified cardiac muscarinic receptors // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. № 38. P. 22488–22499.
24. *Dunn S.M.J., Raftery M.A.* Agonist binding to the torpedo acetylcholine receptor // *Biochemistry.* 1997. V. 36. № 13. P. 3846–3853.
25. *Chidiac P., Green M.A., Pawagi A.B., Wells J.W.* Cardiac muscarinic receptors. Cooperativity as the basis for multiple states of affinity // *Biochemistry.* 1997. V. 36. № 24. P. 7361–7379.
26. *Lazareno S., Birdsall N.J.M.* Detection, quantitation, and verification of allosteric interactions of agents with labeled and unlabeled ligands at G protein-coupled receptors: Interactions of strychnine and acetylcholine at muscarinic receptors // *Mol. Pharmacol.* 1995. V. 48. № 2. P. 362–378.
27. *Fowler C.J., Vedin V., Sjoberg E.* Evidence for cooperative binding of (–) isoproterenol to rat brain α₁-adrenergic receptors // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1999. V. 257. № 2. P. 629–634.

Comparative Characteristics of Binding Kinetics of Specific Antagonists by α_1 - and α_2 -Adrenoceptors in Rat Cerebral Cortex Membranes

L. A. Nesterova, B. N. Manukhin

*Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova, 26, 119334 Moscow, Russia;
Fax (499)-135-80-12; e-mail : manukhinb@mail.ru*

The binding of specific nonselective α_1 - and α_2 -adrenoceptor antagonists [^3H]prazosine and [^3H]RX821002 has been studied on rat cerebral cortex synaptosomal membranes. It is shown that for α_1 -adrenoceptors the ligand-receptor interaction corresponds to the model assuming the presence of one pool of receptors and binding of two ligand molecules to the receptor. The parameters of [^3H]prazosine binding to α_1 -adrenoceptors were: $K_d = 1.56 \pm 0.17$ nM, $B_{\max} = 30.25 \pm 1.78$ fmol/mg protein, $n = 2$. For α_2 -adrenoceptors the ligand-receptor interaction corresponded to the same model. For α_1 - and α_2 -adrenoceptor antagonists the dissociation constants (K_d) are approximately equal (1.56 ± 0.17 and 1.94 ± 0.08 nM, respectively), but the concentration of α_2 -adrenoceptors is two times lower than that of α_1 -adrenoceptors (12.77 ± 3.17 and 30.25 ± 1.78 fmol/mg protein, respectively). The efficiency ($E = B_{\max}/2K_d$) of the ligand binding to α_1 -adrenoceptors is 2.3 times higher than that to α_2 -adrenoceptors (7.46 ± 1.32 and 3.29 ± 0.68 fmol/mg protein/nM, respectively). The parameters of the [^3H]RX821002 binding to α_2 -adrenoceptors were: $K_d = 1.94 \pm 0.08$ nM, $B_{\max} = 12.77 \pm 3.17$ fmol/mg, $n = 2$. The data suggest that α_1 - and α_2 -adrenoceptors in rat cerebral cortex exist as dimers.