



УДК 577.175.82.02

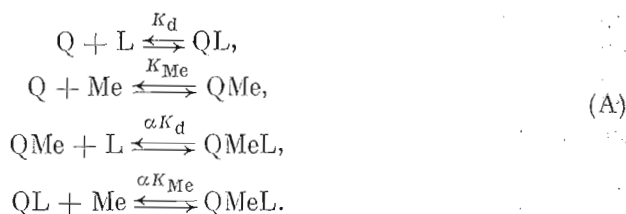
О ПРИРОДЕ КАТИОНСВЯЗЫВАЮЩИХ ГРУПП ЦЕНТРОВ СВЯЗЫВАНИЯ $[[^3\text{H}]\text{Tyr}^1, D\text{-Ala}^2, D\text{-Leu}^5]\text{ЭНКЕФАЛИНА}$

Зайцев С. В., Породенко Н. В., Варфоломеев С. Д.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского

Исследовано влияние pH на связывание меченого стабильного аналога энкефалина — $[[^3\text{H}]\text{Tyr}^1, D\text{-Ala}^2, D\text{-Leu}^5]$ энкефалина — с высоко- и низкоаффинными рецепторами мембран из головного мозга крыс. Показано, что ионы щелочноземельных металлов связываются с депротонированной группой (pK_a 7,0) высокоаффинного рецептора и активируют последний. Влияние катионов на взаимодействие лиганда с низкоаффинным центром связывания не зависит от pH. Предполагается, что высокоаффинный центр связывания содержит остаток фосфорной кислоты, а низкоаффинный — имидазольную группу. Последнее подтверждается данными химической модификации мембранного препарата диэтилпирикарбонатом.

Двух- и трехвалентные ионы щелочноземельных и переходных металлов эффективно регулируют связывание энкефалинов и опиатов со специфическими рецепторами в головном мозге [1–3]. В работе [1] нами были представлены данные о влиянии ионов металлов на взаимодействие меченого стабильного аналога энкефалина $[[^3\text{H}]\text{Tyr}^1, D\text{-Ala}^2, D\text{-Leu}^5]$ энкефалина — с высоко- и низкоаффинными центрами связывания* в мембранных препаратах головного мозга крыс. Было показано, что при взаимодействии $[[^3\text{H}]\text{энкефалина}$ (L) с любым из центров связывания (Q) в присутствии ионов металлов (Me) при фиксированном значении pH устанавливаются следующие равновесия:



Положения этих равновесий описываются совокупностью уравнений (1)–(4), где α — параметр, характеризующий влияние ионов металла на константы диссоциации комплексов.

$$K_d = \frac{[Q][L]}{[QL]}, \quad (1)$$

$$K_{Me} = \frac{[Q][Me]}{[QMe]}, \quad (2)$$

$$\alpha K_d = \frac{[QMe][L]}{[QMeL]}, \quad (3)$$

$$\alpha K_{Me} = \frac{[QL][Me]}{[QMeL]}. \quad (4)$$

Определяемое экспериментально эффективное значение константы диссоциации комплексов лиганда с рецептором с учетом уравнений (1)–(4)

Принятые сокращения: $[[^3\text{H}]\text{энкефалин}$ — $[[^3\text{H}]\text{Tyr}^1, D\text{-Ala}^2, D\text{-Leu}^5]$ энкефалин.

* Термины «рецептор» и «центр связывания» в данной статье употребляются как синонимы.

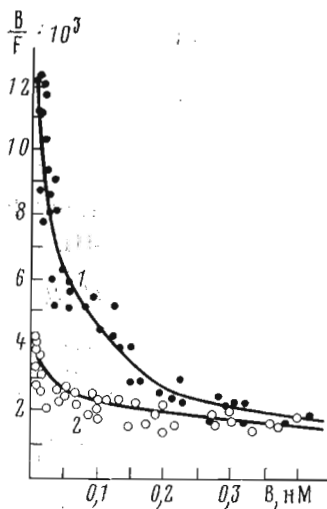


Рис. 1

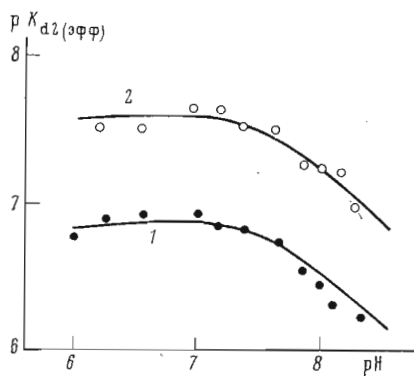


Рис. 2

Рис. 1. Изотермы специфического связывания [^3H]энкефалина с мембранами из головного мозга крыс (концентрация белка 1,4 мг/мл) при рН 6,8 (1) и 8,0 (2). Координаты Скэтчарда; B и F — соответственно концентрация специфически связанного и свободного [^3H]энкефалина

Рис. 2. Влияние рН на константу диссоциации комплекса [^3H]энкефалина с низкоаффинным рецептором в отсутствие (1) и в присутствии (2) ионов Mn^{2+} (концентрация MnCl_2 2 мМ). Кривые построены с помощью уравнения (7) при $K_{\text{Mn}2}$ 0,07 мМ и pK_L 7,9

выражается следующим образом:

$$K_{d(\text{эфф})} = \frac{([Q] + [Q\text{Me}]) \cdot [L]}{[QL] + [Q\text{Me}L]} = \frac{\alpha K_d ([\text{Me}] + K_{\text{Me}})}{[\text{Me}] + \alpha K_{\text{Me}}} \quad (5)$$

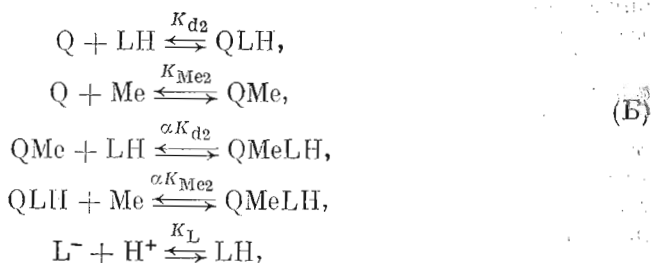
Высокие константы связывания ионов металлов с рецепторами позволяют предположить присутствие ионогенных групп, в частности кислотно-основной природы, в катионсвязывающих участках рецепторов. С целью выяснения природы этих групп в настоящей работе предпринято изучение влияния рН, а также двух- и трехвалентных ионов металлов на связывание [^3H]энкефалина с рецепторами мембран головного мозга крыс.

Из рис. 1 видно, что изменение рН среды от 6,8 до 8,0 вызывает ухудшение связывания [^3H]энкефалина. Обработка экспериментальных данных на ЭВМ по разработанной нами программе [4] показывает, что взаимодействие [^3H]энкефалина с мембранами описывается моделью, предполагающей существование двух независимых центров связывания — с высоким и низким сродством к лиганду. При этом изменение концентрации ионов водорода в среде приводит к изменению констант диссоциации обоих типов комплексов [^3H]энкефалина, $K_{d1(\text{эфф})}$ и $K_{d2(\text{эфф})}$, однако существенно не влияет на концентрацию его участков связывания. Последнее позволяет использовать «метод фиксированных концентраций лиганда» [1] для подробного анализа влияния рН среды на параметры связывания [^3H]энкефалина.

Влияние рН на взаимодействие [^3H]энкефалина с низкоаффинным центром связывания. Данные о влиянии концентрации ионов водорода на константу диссоциации комплекса [^3H]энкефалина с низкоаффинным центром связывания (рис. 2, 1) говорят о том, что при рН > 7,3 величина $K_{d2(\text{эфф})}$ увеличивается с ростом рН. В контрольных экспериментах было показано, что это изменение обратимо и, следовательно, может быть связано с обратимым протонированием ионогенных групп. Поскольку такие ионогенные группы могут в принципе присутствовать как в молекуле лиганда, так и в молекуле рецептора, необходимо было выяснить, к какому из участвующих в связывании компонентов они относятся. С этой целью

было проведено титрование [*D*-Ala², *D*-Leu⁵]энкефалина в диапазоне рН 6,5—8,5. Найдено, что р*K*_a ионогенной группы [*D*-Ala², *D*-Leu⁵]энкефалина (по-видимому, N-концевого остатка тирозина) равен 7,9. Обработка кривой 1 (рис. 2) с использованием ЭВМ свидетельствует о том, что процесс низкоаффинного связывания контролируется одной ионогенной группой с р*K*_a 7,9. Это обстоятельство позволяет предположить, что ухудшение связывания в слабощелочной среде обусловлено депротонированием N-концевой группы молекулы [³H]энкефалина.

Ранее нами было показано [1], что наличие в среде инкубации ионов Mg²⁺, Mn²⁺, La³⁺ и лантаноидов приводит к уменьшению *K*_{d2(эфф)} в 5—6 раз, причем активирующее действие ионов металлов возрастает в ряду Mn²⁺ > La³⁺ > Mg²⁺. В этой связи большой интерес представляло исследование возможности участия ионов металлов в протонных равновесиях, определяющих взаимодействие [³H]энкефалина с низкоаффинным рецептором. Результаты влияния ионов Mn²⁺ на величину *K*_{d2(эфф)} представлены на рис. 2 (кривая 2). Видно, что кривая зависимости р*K*_{d2(эфф)} от рН в этом случае такая же, как и в отсутствие ионов Mn²⁺, однако смещена вверх по оси ординат. Это означает, что ионы Mn²⁺ не влияют на величину р*K*_a ионогенных групп, контролирурующих взаимодействие лиганда с низкоаффинным рецептором. Систему равновесий, характеризующих взаимодействие [³H]энкефалина с низкоаффинным центром связывания, можно представить следующим образом:



где *K*_{Me2} — константа диссоциации комплекса иона с низкоаффинным рецептором энкефалина; *K*_{d2} — «истинная» равновесная константа, характеризующая средство формы лиганда LH к рецептору; α — параметр, характеризующий влияние связывания иона металла с рецептором на *K*_{d2}. Положения этих равновесий описываются уравнениями, аналогичными уравнениям (1)–(4), и уравнением (6):

$$K_L = \frac{[L^-][H^+]}{[LH]}. \tag{6}$$

Исходя из того, что *K*_{d2(эфф)} = ([Q] + [QMe]) ([LH] + [L⁻]) / ([QLH] + [QMeLH]), и подставляя в это выражение значения концентраций, получаем

$$K_{d2(эфф)} = \frac{\alpha K_{d2}([Me] + K_{Me2})(1 + K_L/[H^+])}{\alpha K_{Me2} + [Me]}. \tag{7}$$

Если принять, что

$$K'_{d2} = K_{d2} \left(1 + \frac{K_L}{[H^+]} \right), \tag{8}$$

то выражение (7) трансформируется в уравнение (5).

Учет р*K*_a лиганда позволяет вычислить «истинную» константу, характеризующую взаимодействие лиганда в форме LH с низкоаффинным центром связывания. Она равна 100 нМ. Используя это значение, а также р*K*_L 7,9 и найденное в работе [1] значение *K*_{Mn2} 0,07 мМ, с помощью уравнения (7) можно построить теоретическую кривую, на которую, как видно из рис. 2, хорошо ложатся экспериментальные точки. Это означает, что влияние ионов металлов на низкоаффинный центр связывания [³H]-

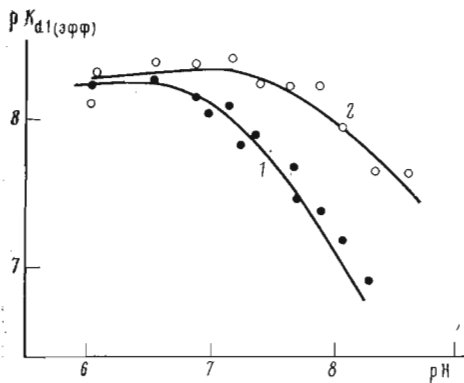


Рис. 3

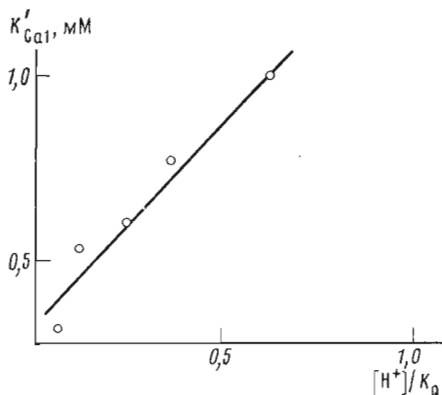


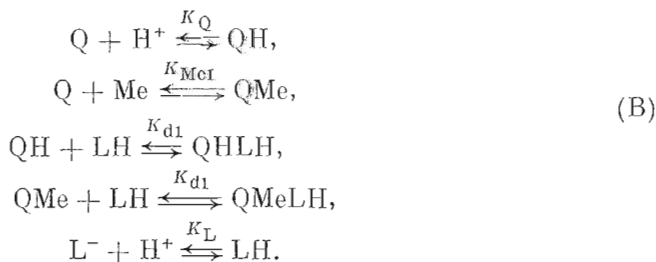
Рис. 4

Рис. 3. Влияние pH на константу диссоциации комплекса [^3H]энкефалина с высокоаффинным рецептором в отсутствие (1) и в присутствии (2) ионов Ca^{2+} (концентрация CaCl_2 5 мМ). Кривые построены с помощью уравнения (12) при $K_{\text{Ca1}} 0,37$ мМ; $pK_L 7,9$ и $pK_Q 7,0$

Рис. 4. Зависимость эффективной константы диссоциации комплекса Ca^{2+} с высокоаффинным рецептором [^3H]энкефалина от концентрации ионов водорода в среде

энкефалина с учетом состояния ионизации лиганда при pH 6,0–8,5 описывается приведенной выше схемой Б.

pH-Зависимость связывания [^3H]энкефалина с высокоаффинным центром. Зависимость константы диссоциации комплекса [^3H]энкефалина с высокоаффинным рецептором ($K_{d1(\text{эфф})}$) от pH существенно отличается от полученной для низкоаффинного связывания (рис. 3). Представляло интерес выяснить, как влияют на эту зависимость ионы двух- и трехвалентных металлов. Для удобства работы был выбран ион Ca^{2+} — представитель группы катионов, селективно увеличивающих средство высокоаффинного центра к лиганду [1]. Экспериментальные данные, иллюстрирующие влияние ионов Ca^{2+} на $pK_{d1(\text{эфф})}$ (рис. 3, 2), позволяют сделать следующие выводы: 1) присутствие в среде ионов Ca^{2+} приводит к тому, что уменьшение средства лиганда к рецептору наступает при более высоких значениях pH; 2) ионы Ca^{2+} не влияют на минимальное значение $K_{d1(\text{эфф})}$. Согласно расчетам, кривая 2 отражает титрование группы с $pK_a 7,9$, т. е. в присутствии ионов Ca^{2+} указанная pH-зависимость обусловлена ионизацией лиганда. При математической обработке кривой 1 найдено что взаимодействие [^3H]энкефалина с высокоаффинным рецептором контролируется еще одной ионогенной группой с $pK_a 7,0$. Поскольку молекула [$D\text{-Ala}^2, D\text{-Leu}^3$]энкефалина не содержит группы с таким значением pK_a , она должна присутствовать в молекуле рецептора. Кроме того, полученные результаты свидетельствуют о конкуренции ионов Ca^{2+} с протонами за эту ионогенную группу. Взаимодействие [^3H]энкефалина с высокоаффинным рецептором в присутствии ионов металлов можно представить в виде схемы В:



Положения этих равновесий описываются совокупностью уравнений (9)–(11):

$$K_Q = \frac{[Q][H]}{[QH]}, \tag{9}$$

$$K_{d1} = \frac{[QH][LH]}{[QHLH]}, \quad (10)$$

$$K_{d1} = \frac{[QMe][LH]}{[QMeLH]}, \quad (11)$$

а также уравнениями (2) и (6). Эффективная константа диссоциации $K_{d1(\text{эфф})} = ([Q] + [QH] + [QMe]) ([L^-] + [LH]) / ([QMeLH] + [QHLH])$, с учетом этих уравнений выражается следующим образом:

$$K_{d1(\text{эфф})} = \frac{K_{d1} \{K_{Me1} (1 + [H^+]/K_Q) + [Me]\} (1 + K_L/[H^+])}{K_{Me1} [H^+]/K_Q + [Me]}. \quad (12)$$

Нетрудно показать, что в результате преобразований, выполненных в соответствии с уравнениями (13)–(15), это выражение приобретает такой же вид, как и уравнение (5).

$$\alpha' = \frac{[H^+]/K_Q}{1 + [H^+]/K_Q}, \quad (13)$$

$$K'_{Me1} = K_{Me1} (1 + [H^+]/K_Q), \quad (14)$$

$$K'_{d1} = K_{d1} \frac{(1 + [H^+]/K_Q)}{[H^+]/K_Q} (1 + K_L/[H^+]). \quad (15)$$

При рН 7,4 значение $1/\alpha'$, вычисленное с использованием выражения (13), равно 3,1, что близко к значениям $1/\alpha'$, приведенным в табл. 1. В пользу схемы В свидетельствуют также экспериментальные данные, представленные на рис. 4. В соответствии с уравнением (14) константа K_{Me1} должна линейно зависеть от концентрации ионов водорода. Согласно рис. 4, K'_{Ca1} линейно возрастает с увеличением $[H^+]$. Это дает возможность определить величину «истинной», независимой от рН константы K_{Ca1} , а также значение константы K_Q . Вычисленное с помощью этой кривой значение K_Q равно 7,0, что совпадает со значением, найденным при изучении влияния рН на связывание энкефалина в отсутствие ионов металлов. Аналогичным образом можно определить величины K_{Me1} и для ряда других ионов (см. табл. 1).

Выражение (12) и данные табл. 1 позволяют рассчитать теоретические кривые зависимости $K_{d1(\text{эфф})}$ от рН в отсутствие и в присутствии ионов металлов. Как видно из рис. 3, теоретические кривые хорошо описывают экспериментальные результаты, что говорит в пользу справедливости схемы В в исследуемом диапазоне рН.

Итак, ионы металлов по-разному влияют на взаимодействие [^3H]энкефалина с высоко- и низкоаффинным центром связывания. В случае низкоаффинного центра они усиливают его сродство к лиганду. В случае же высокоаффинного центра K'_{Me} зависит не только от сродства ионов к центру связывания, но и от концентрации ионов водорода.

Представленные в табл. 1 данные позволяют выделить три группы катионов, различающихся по их влиянию на энкефалиновые рецепторы: 1) ионы Mg^{2+} , Mn^{2+} , La^{3+} и лантаноидов, активирующие как высоко-, так и низкоаффинные рецепторы энкефалина; 2) ионы Ca^{2+} , Sr^{2+} , селективно активирующие высокоаффинные рецепторы; 3) ионы Ni^{2+} и Co^{2+} , селективно активирующие низкоаффинные рецепторы.

Следует отметить, что в присутствии селективных активаторов высокоаффинного центра связывания [^3H]энкефалина ослабляется влияние других ионов на сродство низкоаффинного центра к лиганду. Например, добавление ионов Ca^{2+} в среду приводит к ингибированию активирующего действия ионов Mn^{2+} (рис. 5).

О природе функциональных групп энкефалиновых рецепторов. Подробное изучение механизма влияния рН и ионов щелочноземельных и переходных металлов на образование комплексов [^3H]энкефалина с рецепторами мембран из головного мозга крыс и определение параметров соот-

Влияние ионов металлов на связывание [³H]энкефалина с мембранами из головного мозга крыс *

Ион металла	K_{Me1} , мкМ	K_{Me2} , мкМ	$\frac{1}{\alpha'}$	$\frac{1}{\alpha}$
Ca ²⁺	370±32	—	3,0±0,2	—
Sr ²⁺	510±67	—	2,3±0,2	—
Mn ²⁺	75±20	70±18	2,5±0,5	6,0±0,7
Mg ²⁺	850±220	1300±170	2,9±0,6	6,2±1,2
La ³⁺	17±4	210±48	2,6±0,4	6,2±1,6
Nd ³⁺	4,0±1,1	50±11	2,0±0,3	4,6±1,2
Sm ³⁺	0,9±0,2	22±8	2,3±0,8	5,1±1,7
Eu ³⁺	1,0±0,16	8,0±1,0	2,0±0,7	4,9±1,6
Gd ³⁺	0,54±0,18	Не определено	2,6±0,8	Не определено
Co ²⁺	>5000	1,2±0,1	Не определено	5,2±0,3
Ni ²⁺	>5000	0,6±0,05	»	5,7±0,4

* K_{Me1} и K_{Me2} — равновесные константы диссоциации комплексов ионов металла с высоко- и низкоаффинными рецепторами [³H]энкефалина; α' — параметр, характеризующий равновесие между протонированной и депротонированной формами высокоаффинного рецептора при pH 7,4; α — параметр, характеризующий влияние ионов металла на сродство низкоаффинного центра к лиганду. В случае Ca²⁺ и Sr²⁺ активизирующее влияние ионов на низкоаффинном рецепторе не проявляется.

Таблица 2

Коэффициенты линейной корреляции кривых зависимости констант нестойкости комплексов ионов металлов с различными соединениями * от значений констант диссоциации комплексов катионов с рецепторами [³H]энкефалина

Соединение	Коэффициенты линейной корреляции	
	высокоаффинный рецептор	низкоаффинный рецептор
НРО ₄ ²⁻	0,97	-0,5
Фосфосерин (R-PO ₄ ²⁻)	0,99	—
Имидазол	-0,9	0,91
Гистидин	-0,78	0,97
Уксусная кислота	0,43	0,47
Аспарагиновая кислота	0,26	0,75
Глутаминовая кислота	0,18	—
SO ₄ ²⁻	-0,23	-0,3
Лизин	—	-0,68
Тирозин	0,48	-0,33
Серин	-0,62	—
Цистеин	-0,57	—

* Литературные данные (см. работы [5—7]); прочерки означают отсутствие данных по константам нестойкости соответствующих групп ионов с данными аминокислотами.

ветствующих схем Б и В позволяет высказать предположения о природе функциональных групп, ответственных за связывание.

Приведенные в табл. 1 значения K_{Me} для ионов Ca²⁺ и Sr²⁺ свидетельствуют о достаточно сильном взаимодействии этих катионов с функциональными группами высокоаффинных центров связывания энкефалина. Это позволяет предположить, что в состав этих функциональных групп входят атомы кислорода, в то время как наличие атомов азота маловероятно. Судя по величине pK_a 7,0, такой функциональной группой может быть остаток фосфорной кислоты. Действительно, корреляционный анализ констант нестойкости комплексов ионов металлов с различными соединениями и рецепторами энкефалина показывает, что наилучшим образом связывание катионов с высокоаффинным рецептором моделирует анион НРО₄²⁻ и фосфосерин (см. табл. 2 и рис. 6). Таким образом, приведенные данные указывают на возможность участия фосфатной группы в связыва-

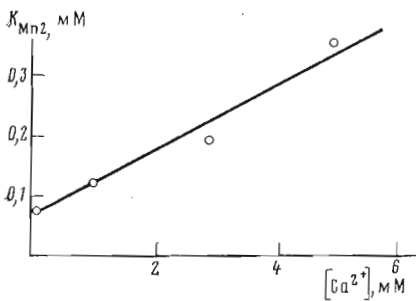


Рис. 5

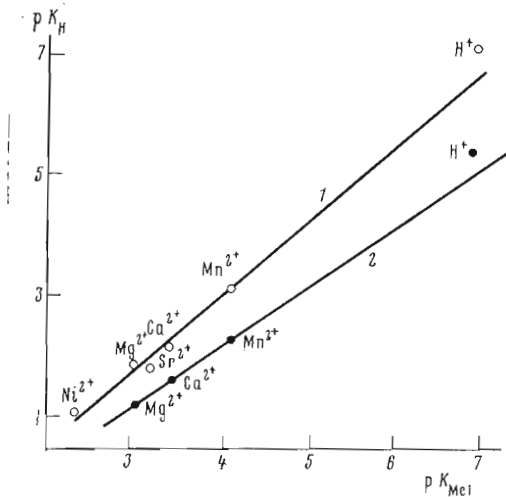


Рис. 6

Рис. 5. Влияние ионов Ca^{2+} на константу диссоциации комплекса Mn^{2+} с низкоаффинным рецептором [^3H]энкефалина. Найденное значение K_1 $2,2 \pm 0,3$ мМ

Рис. 6. Графическое представление корреляционных зависимостей, связывающих значения констант диссоциации комплексов ионов металлов с высокоаффинным рецептором энкефалина (K_{MeI}) и констант нестойкости (K_{M}) комплексов ионов металлов с анионами HPO_4^{2-} (1) и фосфосерина (2)

нии энкефалина. Не исключено, однако, что pK_a 7,0 относится к карбоксильной группе какой-либо аминокислоты, расположенной в гидрофобном окружении, поскольку гидрофобное окружение способствует значительному увеличению pK_a карбоксильных групп [8–10].

Если исходить из предположения об участии фосфатной группы в высокоаффинном связывании энкефалина, то возникает вопрос: в состав какой молекулы (или остатка) входит эта группа? Это может быть фосфорилированный остаток серина или треонина высокоаффинного центра связывания энкефалина, и тогда появляется задача выяснения, как и с помощью каких протеинкиназ он фосфорилируется. Либо это фосфатная группа какого-либо нуклеотида (например, GTP или GDP), участвующего в системе передачи сигнала от рецептора. Либо, наконец, это полярная группа молекулы фосфолипида. Надо сказать, что участие липидов, и в частности фосфолипидов, в связывании опиоидных пептидов показано в целом ряде работ [11–13], и поэтому последнее предположение является в настоящее время наиболее обоснованным. Путем изменения pH среды в диапазоне 6,2–8,3 не удается обнаружить какие-либо ионогенные группы низкоаффинного центра связывания энкефалина. Следовательно, влияние катионов Mn^{2+} , Mg^{2+} и лантаноидов на этот центр обусловлено их связыванием с группами, ионизация которых не отражается на связывании лиганда, либо с группами, имеющими $pK_a < 6$, либо с группами неионогенной природы. Данные табл. 2 и рис. 7 показывают, что такими группами могут быть остатки имидазола и гистидина. На возможное участие остатка гистидина в структуре низкоаффинного центра связывания указывают результаты химической модификации мембранного препарата диэтилпирокарбонатом. Как видно из рис. 8, модификация приводит к потере низкоаффинным центром способности связывать [^3H]энкефалин. Следует отметить, что добавление к мембранному препарату перед обработкой диэтилпирокарбонатом [$D\text{-Ala}^2$, $D\text{-Leu}^5$]энкефалина защищает этот центр связывания от инактивации (рис. 8).

Таким образом, низкоаффинный центр связывания [^3H]энкефалина, по-видимому, содержит остаток гистидина, и свойства этого центра, в частности средство к энкефалину, зависят от присутствия в среде ионов Mg^{2+} ,

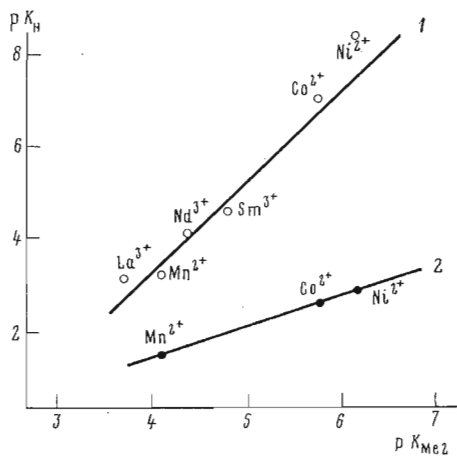


Рис. 7

Рис. 7. Графическое представление корреляционных зависимостей, связывающих значения констант диссоциации комплексов ионов металлов с низкоаффинным рецептором энкефалина (K_{Me2}) и констант нестойкости (K_N) комплексов ионов металлов с гистидином (1) и имидазолом (2)

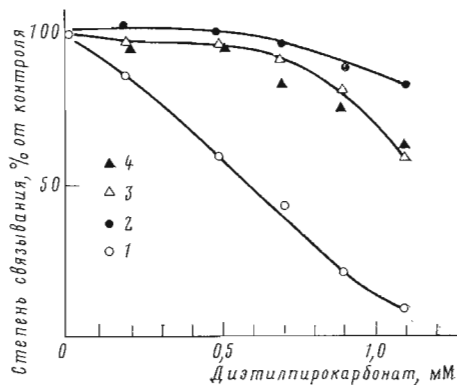


Рис. 8

Рис. 8. Влияние химической модификации мембран из головного мозга крыс (1,3 мг белка/мл) диэтилпирокарбонатом на связывание [3H]энкефалина с низкоаффинными (1, 3) и высокоаффинными (2, 4) рецепторами в отсутствие (1, 2) и в присутствии (3, 4) энкефалина (1 мкМ)

переходных металлов и лантаноидов. Можно предположить, что ионы таких металлов, как Ca, Mg, Mn, Ni, Co и др., являются эндогенными регуляторами функционирования энкефалиновых рецепторов в живом организме.

Экспериментальная часть

Выделение мембранного препарата из головного мозга крыс-самцов линии Wistar весом 150–200 г и изучение равновесного связывания [3H]Tyr¹, D-Ala², D-Leu⁵энкефалина (Amersham, Англия, 22 Ки/ммоль) проводили по методике, описанной в работе [1].

Концентрацию мембранно-связанного белка определяли спектрофотометрически с помощью кумасси (Sigma, США) по методу, описанному в работе [14].

В работе использовали $MnCl_2 \cdot 6H_2O$ (ос.ч.), $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (Merck, ФРГ), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (Merck, ФРГ), $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (х.ч.), $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ (х.ч.), $LaCl_3 \cdot 4H_2O$ (Sigma, США). Хлориды лантаноидов получали путем взаимодействия особо чистых оксидов лантаноидов с конц. HCl (ос.ч.).

[D-Ala², D-Leu⁵]энкефалин был любезно предоставлен заведующим лабораторией синтеза пептидов ИЭЖ ВКНЦ АМН СССР М. И. Титовым.

Концентрацию ионов металлов в среде инкубации оценивали по поглощению их комплексов с красителями арсеназо III (80 мкМ) и цинкон (0,5 мМ) (Sigma, США). Измерения выполнены на спектрофотометре Beckman DU-8 (США). С помощью арсеназо III определяли концентрацию ионов Mn^{2+} (621 нм), а также ионов Ca^{2+} , Mg^{2+} , La^{3+} и лантаноидов (654 нм). Краситель цинкон использовали для определения концентрации ионов Co^{2+} и Ni^{2+} (660 нм).

Методика инактивации рецепторов энкефалина с помощью диэтилпирокарбоната описана в работе [15]. Модификацию проводили при 0°С в течение 30 мин (концентрация реагента составляла 0,2–1 мМ). При изучении защитного действия [D-Ala², D-Leu⁵]энкефалина последний добавляли к мембранному препарату до инкубации с диэтилпирокарбонатом. Реакцию останавливали путем добавления 20 мМ гистидина, затем смесь центрифугировали и дважды промывали водой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Породенко Н. В., Зайцев С. В., Варфоломеев С. Д. Биоорг. химия, 1984, т. 10, № 7, с. 902–911.
2. Pasternak G. W., Snowman A. M., Snyder S. H. Mol. Pharmacol., 1975, v. 11, № 4, p. 735–744.
3. Kouakou Y., Zijac J. M., Moisand C., Mennier J. C. Mol. Pharmacol., 1982, v. 21, № 3, p. 564–569.
4. Курочкин И. Н., Громов А. И., Благоевещенский Ю. Н., Зайцев С. В., Варфоломеев С. Д., Березин И. В. Докл. АН СССР, 1984, т. 274, № 6, с. 1494–1497.
5. Silén L. G., Martell A. E. Stability constants of metal ion complexes, 1964, Spec. Publ. № 17, Chem. Soc.
6. Critical stability constants. Vol. 1 / Eds Martell A. E., Smith P. M. N. Y. – L.: Plenum Press, 1974.
7. Perrin D. D. Stability constants of metal ion complexes. N. Y. – L.: Pergamon Press, 1979.
8. Parsons S. M., Raftery M. A. Biochemistry, 1972, v. 11, № 9, p. 1623–1629.
9. Cogoli A., Semenza G. J. Biol. Chem., 1975, v. 250, № 12, p. 7802–7809.
10. Cohn E. J., Edsall J. T. Proteins, amino acids and peptides. N. Y.: Reinhold Publ. Corp., 1943.
11. Abood L. G., Hoss W. Eur. J. Pharmacol., 1975, v. 32, № 1, p. 66–75.
12. Abood L. G., Buttler M., Reynolds D. Mol. Pharmacol., 1980, v. 17, № 1, p. 290–294.
13. Abood L. G., Takeda F. Eur. J. Pharmacol., 1976, v. 32, № 1, p. 71–77.
14. Zuman Z., Verwilghen R. L. Anal. Biochem., 1980, v. 109, № 2, p. 454–459.
15. Roy B. P., Ng A. Y. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1982, v. 109, № 2, p. 518–526.

Поступила в редакцию
18.IV.1984

ON THE NATURE OF CATION-BINDING GROUPS IN THE BINDING SITES FOR [[³H]Tyr¹, D-Ala², D-Leu³] ENKEPHALIN

ZAITSEV S. V., PORODENKO N. V., VARFOLOMEEV S. D.

*A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic
Chemistry, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow*

The influence of pH on binding of labeled stable analog of enkephalin, [[³H]Tyr¹, D-Ala², D-Leu³]enkephalin, to high- and low-affinity receptors of rat brain membranes was studied. It was shown that alkali-earth metal ions combine with a deprotonated group (pK_a 7.0) of the high-affinity receptor, thereby activating the latter. The effect of cations on the low-affinity enkephalin binding is independent of pH. The presence of phosphate group in the high-affinity binding site, as well as of imidazole residue in the low-affinity binding site was surmised. The latter supposition was supported by data on chemical modification of the membrane preparation with the aid of diethylpyrocarbonate.