



УДК 576.314+591.181.3+547.963.32

ВЫДЕЛЕНИЕ МЕМБРАН РЕТИКУЛОЦИТОВ КРЫС,  
СОДЕРЖАЩИХ РЕГУЛИРУЕМЫЕ ГУАНИЛОВЫМИ  
НУКЛЕОТИДАМИ  
АДЕНИЛАТЦИКЛАЗУ И  $\beta$ -АДРЕНЕРГИЧЕСКИЕ РЕЦЕПТОРЫ

*Воейков В. Л., Виленская Н. Д.*

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,  
биологический факультет*

*Лукашев М. Е., Гуревич В. В.*

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва*

Описан метод выделения мембран ретикулоцитов крыс с целью их использования для изучения свойств аденилатциклазной системы. Выход мембран составлял 15–20 мг мембранного белка от одного животного. В полученных мембранных препаратах аденилатциклаза высоко чувствительна к гуаниловым нуклеотидам: GTP резко усиливает стимуляцию аденилатциклазы агонистами  $\beta$ -адренергических рецепторов и снижает сродство рецепторов к агонистам в 5–10 раз. Определены константы активации аденилатциклазы изопротеренолом, адреналином и норадреналином. Показано стимулирующее действие на аденилатциклазу холерного токсина. Определены параметры связывания с рецепторами антагониста  $\beta$ -адренергических рецепторов [ $^3\text{H}$ ]дигидроалprenолола:  $K_{\text{дис}} 0,41 \text{ нМ}$ ,  $V_{\text{макс}} 450 \text{ фмоль/мг}$  мембранного белка. Показано GTP-зависимое связывание с рецепторами меченого агониста  $\beta$ -адренергических рецепторов [ $^3\text{H}$ ]изопротеренола.

Аденилатциклазные комплексы животных клеток представляют собой многокомпонентные мембранные системы, обеспечивающие передачу сигнала о взаимодействии гормона с рецептором на фермент аденилатциклазу. Общие механизмы функционирования аденилатциклазных комплексов в клетках большинства тканей, по-видимому, одинаковы [1]. В последние годы знания о механизмах функционирования аденилатциклазных комплексов значительно углубились благодаря использованию простых клеточных систем, в частности культивируемых опухолевых клеток [1]. Однако эта модельная система, как и ряд других, например клетки печени, жировой ткани, имеет определенные недостатки, затрудняющие ее применение для выделения компонентов аденилатциклазного комплекса в индивидуальном состоянии в достаточных для их структурного анализа количествах.

С этой точки зрения значительный интерес представляют ретикулоциты крыс. Ретикулоциты могут быть получены в больших количествах, а выделение очищенных препаратов их мембран не требует длительных и сложных операций.

Аденилатциклазная система ретикулоцитов крыс была частично охарактеризована в работах Билезикяна и др. [2, 3]. Однако препараты, полученные ими, лишены многих свойств, присущих большинству аденилатциклазных систем.

Цель настоящей работы — получение препаратов мембран ретикулоцитов крыс, отвечающих таким требованиям, предъявляемым к модельным объектам, как простота выделения, высокая чувствительность аденилатциклазы и рецептора к гуаниловым нуклеотидам.

В предварительных экспериментах сравнивались различные методы выделения мембран ретикулоцитов: метод Билезикяна и др. [2], Лимбирд и др. [4], Доджа [5], разработанный для получения свободных от гемоглобина теней эритроцитов человека. При выделении мембран по методу [2]

## Активность аденилатциклазы в мембранах ретикулоцитов крыс

Лиганды *	Образование с АМР, пкмол/мг·мин **	
	очищенный АТР ***	коммерческий препарат АТР
—	1,1	2,9
ГТР	5,7	3,1
Изопротеренол	4,4	19,3
Изопротеренол, ГТР	23,2	20,6
GppNHp	21,7	17,4
Изопротеренол, GppNHp	82,6	78,5
NaF	114,4	106

\* Концентрации лигандов: ГТР — 0,1 мМ, изопротеренол — 10 мкМ, GppNHp — 0,1 мМ, NaF — 10 мМ.

\*\* Приведены усредненные данные двух экспериментов, каждый из которых включал три параллельных опыта.

\*\*\* См. «Экспериментальную часть».

Таблица 2

## Активность аденилатциклазы после обработки мембран холерным токсином

Лиганды *	Образование с АМР, пкмол/мг·мин **		
	Контроль	Токсин	Токсин, факторы цитоплазмы ***
—	1,8	7,4	8
ГТР	3,2	32	30,5
Изопротеренол, ГТР	20,1	74,1	76,1
NaF	87,4	22,7	21,9

\* Концентрации лигандов: ГТР — 0,1 мМ, изопротеренол — 10 мкМ, NaF — 10 мМ.

\*\* Приведены усредненные данные двух экспериментов, каждый из которых включал три параллельных опыта.

\*\*\* См. «Экспериментальную часть».

выход чистых мембран был довольно низок (0,5—1 мг мембранного белка из 1 мл упакованных клеток). Значительная часть осадка после лизиса клеток представляла собой плотный, плохо суспендируемый осадок красного цвета. Это указывает на высокое содержание гемоглобина в препарате. В таких препаратах, как и в препаратах, полученных Билезикьяном и др. [3], ГТР не влиял на сродство рецепторов к изопротеренолу и на стимуляцию аденилатциклазы изопротеренолом. В препаратах, полученных по методу [4], доля плотного красного осадка была тоже велика. Поэтому для увеличения выхода чистых мембран мы использовали в своей работе метод [5], в который внесли небольшую модификацию: отмывку мембран в 0,25 М сахарозе (буфер Г) после двух отмывок в фосфатном буфере (буфер В). При такой отмывке мембраны очищаются от гемоглобина практически полностью. По неясным причинам в растворе сахарозы мембраны оседали при центрифугировании значительно быстрее, чем в фосфатном буфере. Выход очищенных мембран при использовании этого метода составляет 5—7 мг мембранного белка из 1 мл упакованных клеток.

Удельная активность полученной аденилатциклазы не зависела от концентрации мембранного белка до 5 мг/мл и от времени до 25 мин при 37° С. Аденилатциклаза в мембранах ретикулоцитов крыс обладает низкой базальной активностью, ее стимулируют изопротеренол, ГТР, GppNHp и NaF (табл. 1). Стимуляция аденилатциклазы ГТР наблюдалась только тогда, когда в качестве субстрата использовали АТР, очищенный от ГТР. При использовании очищенного АТР изопротеренол в отсутствие ГТР стимулирует аденилатциклазу значительно слабее, чем в присутствии неочищенного АТР. Зависимость активности аденилатциклазы в присутствии и в отсутствие изопротеренола от концентрации ГТР в среде (рис. 1)

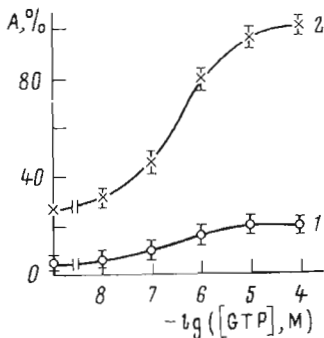


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость активности аденилатциклазы от концентрации ГТР в отсутствие (1) и в присутствии (2) 0,1 мМ изопротеренола. Каждая точка — усреднение трех параллельных опытов  $\pm$  среднее квадратичное отклонение

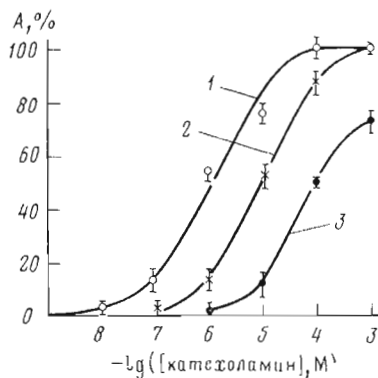


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость активности аденилатциклазы в присутствии 0,1 мМ ГТР от концентраций изопротеренола (1), адреналина (2) и норадреналина (3). Каждая точка — усреднение трех параллельных опытов  $\pm$  среднее квадратичное отклонение

указывает на то, что содержание эндогенного ГТР в пробе для определения активности ниже 0,1 мкМ.

Способность агонистов адренергических рецепторов стимулировать аденилатциклазу ретикулоцитов убывает в ряду изопротеренол > адреналин > норадреналин. Последний является частичным агонистом (рис. 2). Это позволяет отнести рецепторы к типу  $\beta_2$ , что согласуется с данными работ [4, 6]. Константы активации этими агентами аденилатциклазы составляют соответственно 1,3; 10 и 45 мкМ в присутствии 0,1 мМ ГТР.

Одним из важных инструментов изучения аденилатциклазной системы является холерный токсин — белок, катализирующий расщепление  $NAD^+$  и перенос остатка ADP-рибозы на субъединицу с молекулярной массой 42 000, входящую в состав N-белка [7]. После инкубации мембран с холерным токсином в присутствии  $NAD^+$  и ГТР резко возрастает базальная активность аденилатциклазы и ее чувствительность к агонисту и ГТР, в то же время чувствительность к фториду снижается (табл. 2), что хорошо согласуется с данными о действии холерного токсина на аденилатциклазные системы ретикулоцитов и других клеток [8]. Некоторые авторы отмечают, что для действия холерного токсина абсолютно необходимо присутствие в среде термостабильных цитоплазматических факторов, по-видимому, полипептидной природы [9]. Однако в нашем случае действие холерного токсина в присутствии цитозоля из мозжечка крупного рогатого скота и ретикулоцитов не отличалось от его действия в их отсутствие. Лимбирд с соавт. обрабатывали холерным токсином мембраны ретикулоцитов в присутствии цитозоля эритроцитов индюка [4], однако в их работе не представлены данные о необходимости его добавления.

Для изучения центров связывания катехоламинов были использованы антагонист  $\beta$ -адренергических рецепторов [ $^3H$ ]дигидроальprenолол и агонист [ $^3H$ ]изопротеренол. Кинетика связывания [ $^3H$ ]дигидроальprenолола с рецепторами при 25°С представлена на рис. 3. Связывание достигает равновесия после 20 мин инкубации. В последующих опытах инкубацию мембран с [ $^3H$ ]дигидроальprenололом проводили 25–30 мин при 25°С. Равновесные константы связывания определяли из графика Скетчарда [10] (рис. 4). По результатам четырех опытов  $K_{дис}$  для этого антагониста составляет  $0,41 \pm 0,05$  нМ при концентрации центров связывания  $450 \pm \pm 43$  фмоль/мг мембранного белка, что хорошо согласуется с данными работы [4]. Кривые вытеснения изопротеренолом связанного с рецепторами [ $^3H$ ]дигидроальprenолола представлены на рис. 5. Связывание аго-

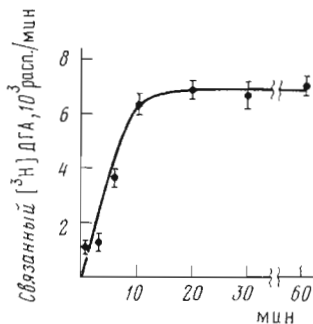


Рис. 3

Рис. 3. Кинетика связывания [<sup>3</sup>H]дигидроальпренолола (<sup>3</sup>H]ДГА) (2 нМ) β-адренергическими рецепторами мембран ретикулоцитов крысы при 25°С. Каждая точка — усреднение трех параллельных опытов ± среднее квадратичное отклонение

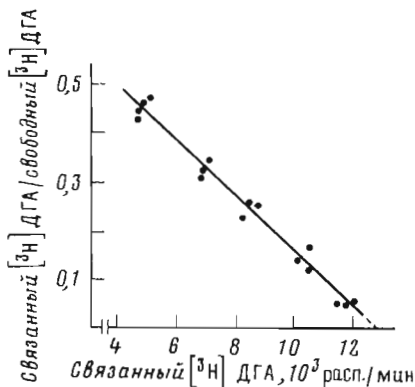


Рис. 4

Рис. 4. График Скетчарда для связывания [<sup>3</sup>H]дигидроальпренолола с β-адренергическими рецепторами в мембранах ретикулоцитов. Содержание мембранного белка в пробе составляет ~0,6 мг/мл

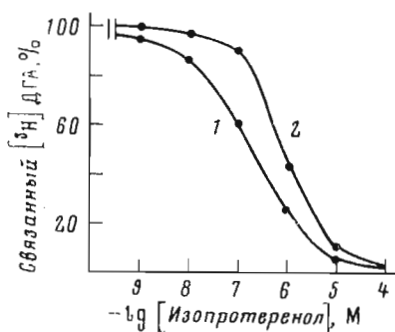


Рис. 5

Рис. 5. Вытеснение связанного с мембранами [<sup>3</sup>H]дигидроальпренолола (1 нМ) изопротеренолом в отсутствие (1) и в присутствии (2) 0,1 мМ ГТР. Каждая точка — среднее из 6 экспериментов, выполненных по трем параллельным опытам каждый. Отклонение от среднего не превышает 5%

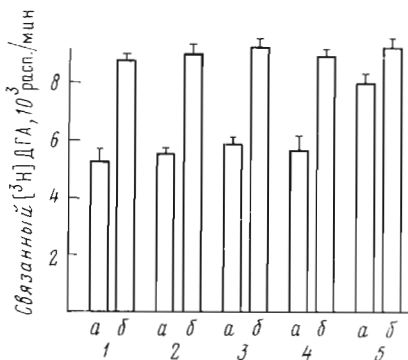


Рис. 6

Рис. 6. Влияние различных обработок мембран на стабильность прочного комплекса изопротеренола с рецептором. Мембраны инкубировали 30 мин при 25°С в стандартных условиях с изопротеренолом (10 мкМ), отмывали 4 раза в среде с 5 мМ MgCl<sub>2</sub> (1), в среде без MgCl<sub>2</sub>, содержащей 1 мМ EDTA (2), в буфере Г (см. «Экспериментальную часть»), содержащем 0,5 мг/мл аскорбата (буфер ГА), 4 раза, суспендировали в буфере ГА с 0,5 М сахарозой, осаждали и ресуспендировали в буфере ГА без сахарозы (осмотический шок) (3), отмывали в буфере ГА, замораживали и оттаивали (4), инкубировали после отмывок от изопротеренола в присутствии 2 мМ дибукaina 10 мин при 25°С и дважды отмывали (5). Затем определяли связывание [<sup>3</sup>H]дигидроальпренолола в отсутствие (а) и в присутствии (б) 0,1 мМ ГТР

ниста зависит от присутствия в среде гуаниловых нуклеотидов. В отсутствие ГТР изопротеренол вытесняет 50% связанного антагониста уже в концентрации 0,2 мкМ (EC<sub>50</sub>), а в присутствии ГТР — в концентрации 1 мкМ. Следует отметить, что, по данным Лимбирд и др. [4], изопротеренол оказывал такое же действие в концентрациях 1,9 и 15 мкМ соответственно, т. е. в наших препаратах сродство рецепторов к агонисту почти на порядок выше. По данным работы [3], ГТР практически не влияет на сродство рецепторов к изопротеренолу, а EC<sub>50</sub> для этого агониста составляет 0,1 мМ.

Сродство рецепторов к адреналину и норадреналину значительно ниже, чем к изопротеренолу, и также зависит от присутствия в среде гуаниловых нуклеотидов. Для адреналина EC<sub>50</sub> в присутствии и в отсутствие ГТР

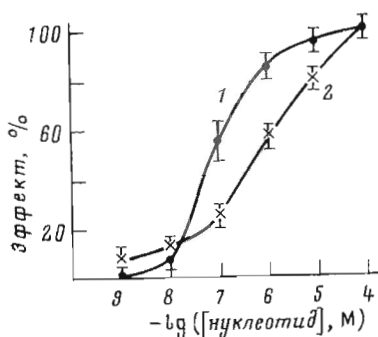


Рис. 7. Влияние гуаниловых нуклеотидов на средство рецепторов к изопротеренолу. Определяли связывание [ $^3\text{H}$ ]дигидроальпренолола (0,1 мМ) с мембранами в присутствии 0,2 мкМ изопротеренола и различных концентраций GTP (1) или GppNHp (2). В отсутствие гуаниловых нуклеотидов связывалось  $5749 \pm 289$  расп./мин [ $^3\text{H}$ ]дигидроальпренолола, при их максимальной концентрации  $10\,520 \pm 70$  имп/мин. Разность этих значений принята за максимальный эффект гуаниловых нуклеотидов. Каждая точка — среднее из трех параллельных опытов  $\pm$  среднеквадратичное отклонение

составляют соответственно 60 и 2 мкМ, для норадреналина — 60 и 5 мкМ. В присутствии GTP увеличивается наклон кривой вытеснения [ $^3\text{H}$ ]дигидроальпренолола изопротеренолом. Коэффициент Хилла для кривой 1 на рис. 5 составляет 0,68, а для кривой 2 — 1,03. По существующим представлениям, пологий ход кривой 1 отражает связывание агониста с двумя субпопуляциями рецепторов (с высоким и низким сродством к агонисту), а нормальный ход кривой 2 в присутствии GTP — связывание с одним классом рецепторов (только с низким сродством) [11]. На рис. 6 представлены данные, свидетельствующие о высокой стабильности состояния, в котором рецепторы связывают агонист с высоким сродством. Комплексы с высоким сродством рецепторов к агонисту дестабилизируют только гуаниловые нуклеотиды и местный анестетик дибуканин. Такие воздействия, как замораживание-оттаивание, отмывки мембран в среде, не содержащей  $\text{Mg}^{2+}$  в присутствии EDTA, и осмотический шок, не влияют на стабильность этого комплекса. Интересно, что EDTA, хелатирующий свободные ионы  $\text{Mg}^{2+}$ , не влияет на сформированный комплекс агонист — рецептор, тогда как для образования такого комплекса магний совершенно необходим [12]. По нашим данным, после образования этого комплекса присутствие ионов магния уже несущественно для его стабильности. Освобождение изопротеренола из прочного комплекса с рецептором под действием дибуканина для данного объекта показано впервые. Ранее было обнаружено аналогичное действие местных анестетиков на  $\beta$ -адренергические рецепторы в мембранах эритроцитов лягушки [13].

GTP начинает действовать на связывание изопротеренола уже в концентрации 10 нМ (рис. 7). Полумаксимальный эффект GTP оказывает в концентрации 80 нМ. Следовательно, концентрация эндогенных гуаниловых нуклеотидов в среде ниже 10 нМ. Аналогичное действие на рецепторы оказывает GppNHp, но в более высокой концентрации, чем GTP, — полумаксимальный эффект достигается при его концентрации 0,6 мкМ. Это может быть результатом более низкого сродства N-белка к GppNHp, чем к GTP.

Прямые данные о связывании агонистов с  $\beta$ -адренергическими рецепторами могут быть получены с помощью радиоактивных агонистов. В настоящее время с этой целью в ряде лабораторий используются [ $^3\text{H}$ ]оксбензилизопротеренол [14] и [ $^3\text{H}$ ]адреналин [15]. К сожалению, первый реактив мало доступен, а [ $^3\text{H}$ ]адреналин связывается с рецепторами с довольно низким сродством. В данной работе был использован [ $^3\text{H}$ ]изопротеренол. Специфическое связывание [ $^3\text{H}$ ]изопротеренола с рецепторами зависит от его концентрации, уменьшается в присутствии GTP и в отсутствие  $\text{Mg}^{2+}$  (табл. 3), т. е. связывание агониста с рецепторами выявляет состояние высокого сродства рецепторов к изопротеренолу. Хотя доля специфического связывания агониста от его общего связывания значительно меньше, чем у антагониста (40 и 95% соответственно), GTP-зависимое связывание [ $^3\text{H}$ ]изопротеренола с рецепторами в мембранах ретикулоцитов крыс открывает дополнительные возможности для изучения этой рецепторной системы.

Таким образом, мембраны ретикулоцитов крыс представляют собой хороший модельный объект для изучения свойств аденилатциклазных си-

Связывание [<sup>3</sup>H]изопротеренола с мембранами

Концентрация [ <sup>3</sup> H]изопротеренола, пкМ	Связанный [ <sup>3</sup> H]изопротеренол, расп./мин *			
	Стандартная среда	Пропранолол (10 мкМ)	GTP (0,1 мМ)	Среда без Mg <sup>2+</sup> с EDTA (0,1 мМ)
10	1920±58	1171±57	1190±30	1385±96
20	3770±136	2646±133	2835±177	3058±10

\* Приведены усредненные данные трех параллельных опытов.

стем, стимулируемых гормонами. После 7-дневного индукционного периода до 95% красной крови крыс составляют ретикулоциты. Выделение ретикулоцитов и их мембран требует лишь сравнительно небольшого количества довольно простых и быстрых операций. От одного животного можно получить 15–20 мг мембранного белка. Все это позволяет рассматривать данный объект как перспективный в отношении препаративного выделения компонентов аденилатциклазной системы. Мембраны практически не содержат примесей эндогенных гуаниловых нуклеотидов. Аденилатциклаза в этих мембранах высоко чувствительна к агонистам β-адренергических рецепторов и к гуаниловым нуклеотидам. Кроме того, β-адренергические рецепторы ретикулоцитов также высоко чувствительны к гуаниловым нуклеотидам. Ретикулоциты крыс позволяют изучать широкий круг явлений на интактных клетках, например процессы десенситизации аденилатциклазной системы, регуляции внутриклеточного уровня сАМР и т. п., что считается важным достоинством клеточных культур, работа с которыми намного сложнее.

### Экспериментальная часть

В работе использованы следующие реактивы и материалы: сАМР, АДР, АТР, аденозин, GTP, гуанилилимидодифосфат (GppNHp) (Serva, ФРГ); EDTA, трис, дифенилоксазол (PPO), фосфоенолпируват, пируваткиназа, норадреналин, изопротеренол, пропранолол, холерный токсин, дибуканин, бычий сывороточный альбумин (Sigma, США); [<sup>32</sup>P]АТР, [<sup>3</sup>H]дигидроальпренолол, [<sup>3</sup>H]изопротеренол (Amersham, Великобритания), пластинки с тонким слоем PEI-целлюлозы (Merck, ФРГ), QAE-сефадекс А-25 (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция); фильтры из стекловолокна GF/C (Whatman, Великобритания); NAD<sup>+</sup>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> по Брокману II (Reanal, ВНР); гепарин (Spofa, ЧССР); дифенилоксазол-илбензол (POPOP), сахароза, фенилгидразин, аскорбиновая кислота, диоксан, сцинтилляционная жидкость ЖС-8, NaCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>, Ba(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, LiCl, ацетон («Союзреактив»).

Ретикулоцитоз у крыс индуцировали солянокислым фенилгидразином по методу [2]. В мазке крови, окрашенном изотоническим раствором метиленового синего, содержание ретикулоцитов составило 95% красной крови. Кровь забитых декапитацией животных собирали в стакан с охлажденным до 4°С буфером, содержащим 10 мМ трис-НСl (рН 7,6), 0,9% NaCl, 1% гепарина (буфер А), центрифугировали 5 мин при 1000g. Осажденные клетки промывали трижды буфером, содержащим 10 мМ трис-НСl (рН 7,6), 0,9% NaCl (буфер В). Мембраны ретикулоцитов выделяли по методу [5] с некоторыми модификациями. В части опытов мембраны выделяли по методам [2] и [4].

Отмытые ретикулоциты лизировали, суспендируя их в охлажденном до 4°С буфере, содержащем 6,6 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (рН 7,6), 1 мМ EDTA (буфер В) в объемном соотношении буфер — клетки, равном 10. Гемолиз проводили 30–40 мин при 4°С, затем мембраны осаждали центрифугированием при 45 000g в течение 20 мин. Плотный красный осадок, составлявший не более 10% общего объема осадка, отбрасывали, а лежащий над ним легкий, слабоокрашенный осадок мембран ретикулоцитов

промывали еще 2 раза буфером В, а затем 2 раза буфером Г, содержащим 50 мМ трис-НСl (рН 7,6) и 0,25 М сахарозу, тщательно суспендируя мембраны перед каждым центрифугированием. Осадок мембран суспендировали в буфере Г до исходного объема клеток (концентрация мембранного белка 5–7 мг/мл). Суспензию мембран замораживали и хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$ . Свойства аденилатциклазы и рецептора при хранении стабильны более 3 мес.

Активность аденилатциклазы определяли по методу Саломона и др. [16]. Стандартная реакционная смесь содержала 50 мМ трис-малеат (рН 7,7), 2,5 мМ сАМР, 15 мМ фосфосенолпирuvat, 120 мкг/мл пируваткиназы, 5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 1 мМ дитиотреит, 0,2 мМ АТР (0,4–0,7 мкКи [ $^{32}\text{P}$ ]АТР). Реакцию начинали внесением в реакционную пробу (общий объем 60 мкл) суспензии мембран, инкубацию проводили 15 мин при  $37^{\circ}\text{C}$ , затем добавляли в каждую пробу по 200 мкл 0,5 М НСl, прогревали пробы 8 мин при  $95^{\circ}\text{C}$  и доводили рН до 7,5–7,6, добавляя в пробы по 200 мкл 1,5 М имидазола. Пробы наносили на колонки, содержащие по  $1\text{ см}^3\text{ Al}_2\text{O}_3$ ; [ $^{32}\text{P}$ ]сАМР элюировали дистиллированной водой непосредственно во флаконы для сцинтилляционного счета, куда затем заливали по 11 мл сцинтилляционной жидкости, содержащей 4 г РРО и 200 мг РОРОР на 1 л очищенного от перекиси диоксиана. Пробы просчитывали в режиме счета импульсов в минуту.

Связывание [ $^3\text{H}$ ]дигидроальпренолола с рецепторами определяли по методу Лефковича и др. [17]. Стандартная проба содержала 10 мМ трис-НСl (рН 7,5), 5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 0,5 мг/мл аскорбиновой кислоты, 1,5–22 нМ [ $^3\text{H}$ ]дигидроальпренолола (42,5 Ки/ммоль). Объем пробы составлял 500 мкл. Инкубацию проводили 20 мин при  $25^{\circ}\text{C}$ . Неспецифическое связывание агониста, определяемое в присутствии 10 мкМ пропранолола, не превышало 5% от общего.

Связывание [ $^3\text{H}$ ]изопротеренола определяли по методу [15] с модификациями. Стандартная проба (0,5 мл) содержала 50 мМ трис-НСl (рН 7,6), 1 мг/мл аскорбиновой кислоты, 1 мМ пирокатехол, 10 мкМ дитиотреит, 0,1 мМ EDTA, 5 мМ  $\text{MgCl}_2$  (буфер Д) и 10–20 нМ [ $^3\text{H}$ ]изопротеренол (14,1 Ки/ммоль). Пробы инкубировали 20 мин при  $25^{\circ}\text{C}$ , разбавляли 5 мл охлажденного до  $4^{\circ}\text{C}$  буфера Д и фильтровали под вакуумом через фильтры GF/C, предварительно замоченные в 1 мМ пирокатехоле. Фильтры промывали 10 мл того же буфера и просчитывали в сцинтилляционной жидкости ЖС-8 в режиме счета распадов в минуту. Неспецифическое связывание, определяемое в присутствии 10 мкМ пропранолола, составляло  $\sim 60\%$  от общего.

Определение активности аденилатциклазы и связывания лигандов с рецепторами проводили только в стеклянных силиконированных пробирках.

Мембраны ретикулоцитов обрабатывали холерным токсином по модифицированной методике [18]. Холерный токсин преактивировали 15 мин при  $30^{\circ}\text{C}$  в среде, содержащей 2 мг/мл яичного альбумина и 20 мМ дитиотреит, при концентрации холерного токсина 0,2–0,5 мг/мл. Интоксикацию мембран проводили в среде, содержащей 50 мМ трис-НСl (рН 8,0), 1 мМ  $\text{NAD}^+$ , 10 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 100 мкМ GTP, в которую вносили 150 мкл на 1 мл среды для активации холерного токсина, содержащей активированный холерный токсин и, в ряде опытов, до 150 мкл цитозоля ретикулоцитов, полученного по методу [4]. Концентрация мембранного белка при обработке мембран холерным токсином составляла  $\sim 3$  мг/мл. Инкубацию проводили 30 мин при  $30^{\circ}\text{C}$ , затем мембраны отмывали в 10-кратном объеме буфера Г и суспендировали в этом же буфере до исходной концентрации.

АТР, используемый для определения активности аденилатциклазы, очищали от примесей с помощью ионообменной хроматографии: 200 мг АТР растворяли в минимальном объеме формиата аммония (0,5 М; рН 3,6) и наносили на колонку (2,5×30 см) с QAE-сефадексом А-25, уравновешенным 0,5 М формиатом аммония при  $4^{\circ}\text{C}$ . Колонку после напеснения АТР промывали двумя объемами того же буфера, а затем буфе-

ром с линейным градиентом концентрации формиата аммония (0,5–1,3 М), рН 3,6. Хроматографию проводили при 4°С. Фракции, содержащие АТР, объединяли, доводили рН до 9 триэтиламином и добавляли сухой ацетат бария до образования рыхлого белого осадка бариевой соли АТР. Осадок центрифугировали и промывали 5–7 раз деионизованной водой. Промытый осадок растворяли в минимальном объеме 0,1 М НСl и добавляли рассчитанное количество Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 моль на 1 моль АТР·Ba<sub>2</sub>). Образовавшийся при этом сульфат бария осаждали центрифугированием. К надосадочной жидкости при перемешивании приливали по каплям ацетон до помутнения раствора, затем добавляли еще 100 мкл ацетона и центрифугировали полученную суспензию. Осадок АТР промывали 3–5 раз сухим свеженеперегнанным ацетоном, высушивали в вакууме и хранили при –70°С. Полученный таким образом АТР был свободен от примесей гуаниловых нуклеотидов, ADP, AMP и аденозина по данным хроматографии в 0,5 М LiCl на пластинках с тонким слоем РЕI-целлюлозы. Выход АТР составлял 65–70%. В доступной нам литературе мы не смогли найти столь же быстрого и эффективного метода очистки АТР от примесей гуаниловых нуклеотидов. Широко используемый для этого метод [19], по нашему мнению, значительно более трудоемок.

Концентрацию белка определяли по методу Лоури [20], в качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин.

Авторы выражают глубокую благодарность акад. Ю. А. Овчинникову за ценные советы и большую помощь в выполнении этой работы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ross E. M., Gilman A. G. *Ann. Rev. Biochem.*, 1980, v. 49, p. 533–564.
2. Bilesikian J. P., Spiegel A. M., Brown E. M., Aurbach G. *Mol. Pharmacol.*, 1977, v. 13, № 5, p. 775–785.
3. Bilesikian J. P., Spiegel A. M., Gammon D. E., Aurbach G. *Mol. Pharmacol.*, 1977, v. 13, № 5, p. 786–795.
4. Limbird L. E., Gill D. M., Stadel J. M., Hickey A. R., Lefkowitz R. J. *J. Biol. Chem.*, 1980, v. 255, № 5, p. 1854–1861.
5. Dodge J. T., Mitchell C., Hanahan D. J. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1963, v. 100, № 1, p. 119–130.
6. Bilesikian J. P. *Biochim. et biophys. acta*, 1978, v. 542, № 3, p. 263–273.
7. Northup J. K., Sternweis P. C., Smigel M. D., Schleifer L. S., Ross E. M., Gilman A. G. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1980, v. 77, № 11, p. 6516–6520.
8. Cassel D., Selinger Z. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1977, v. 74, № 8, p. 3307–3311.
9. Enomoto K., Gill D. M. *J. Supramol. Struct.*, 1979, v. 10, № 1, p. 51–60.
10. Scatchard G. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1949, v. 51, p. 660–672.
11. Hancock A. A., De Lean A., Lefkowitz R. J. *Mol. Pharmacol.*, 1979, v. 16, № 1, p. 1–9.
12. Williams L. T., Mullikin D., Lefkowitz R. J. *J. Biol. Chem.*, 1978, v. 253, № 9, p. 2984–2989.
13. Voeikov V. L., Lefkowitz R. J. *Biochim. et biophys. acta*, 1980, v. 629, № 2, p. 266–281.
14. Lefkowitz R. J., Williams L. T. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1977, v. 74, № 2, p. 515–519.
15. U'Prichard D. C., Bylund D. B., Snyder S. H. *J. Biol. Chem.*, 1978, v. 253, № 14, p. 5090–5102.
16. Salomon Y., Londos C., Rodbell M. *Anal. Biochem.*, 1974, v. 58, № 2, p. 541–549.
17. Lefkowitz R. J., Mukherjee C., Coverstone M., Caron M. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1974, v. 60, № 2, p. 703–709.
18. Moss J., Vaughan M. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1977, v. 74, № 10, p. 4396–4400.
19. Kimura N., Nakane K., Nagata N. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1975, v. 70, № 4, p. 1250–1256.
20. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. *J. Biol. Chem.*, 1951, v. 193, № 1, p. 265–269.

Поступила в редакцию  
3.XI.1981



# ISOLATION OF RAT RETICULOCYTE MEMBRANES CONTAINING GUANYL NUCLEOTIDE SENSITIVE ADENYLATE CYCLASE AND $\beta$ -ADRENERGIC RECEPTORS

VOEIKOV V. L., VILENSKAYA N. D., LUKASHEV M. E., GUREVICH V. V.

*Biological Department, M. V. Lomonosov State University, Moscow;  
M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy  
of Sciences of the USSR, Moscow*

A method for the isolation of rat reticulocyte membranes is described allowing to obtain preparations useful in adenylate cyclase studies. The yield of reticulocyte membrane protein is 15–20 mg from one animal. Adenylate cyclase in these preparations is highly sensitive to guanyl nucleotides. GTP profoundly increases stimulation of adenylate cyclase by  $\beta$ -adrenergic receptor agonists and decreases  $\beta$ -adrenergic receptor affinity for agonists by 5–10 times.  $EC_{50}$  for adenylate cyclase activation by isoproterenol, adrenaline and noradrenaline in this preparation are 1,3; 10 and 45  $\mu$ M, respectively. Cholera toxin profoundly activates adenylate cyclase.  $\beta$ -adrenergic receptors in reticulocyte membranes bind antagonist [ $^3$ H]dihydroalprenolol with  $K_d$  0,41 nM and  $B_{max}$  450 fmol/mg membrane protein. Agonist of  $\beta$ -adrenergic receptors, [ $^3$ H]isoproterenol, binds with the receptors in a GTP — dependent manner.