



УДК 577.156.1+591.181.3+547.963.32

ДЕЙСТВИЕ ТРИПСИНА НА РЕГУЛЯЦИЮ  
β-АДРЕНЕРГИЧЕСКИХ РЕЦЕПТОРОВ  
ГУАНИЛОВЫМИ НУКЛЕОТИДАМИ

*Воейков В. Л.*

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

*Гуревич В. В.*

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

Обработка трипсином мембран ретикулоцитов крыс, но не целых клеток приводит к частичному снижению специфического связывания [<sup>3</sup>H]дигидроальпренолола с β-адренергическими рецепторами без изменения  $K_{дис}$ . Трипсин нарушает регуляцию GTP сродства рецепторов к агонистам при концентрации >5 мкг/мл в отсутствие и при концентрации 75 нг/мл в присутствии GTP в среде. В результате протеолиза снижается сродство рецепторов к агонисту, однако при обработке трипсином мембран, инкубированных с изопротеренолом, количество рецепторов, связавших агонист с высоким сродством, увеличивается, а GTP и местный анестетик дибуканин в этом случае не уменьшают сродство рецепторов к изопротеренолу. Одновременное присутствие GTP и изопротеренола снижает чувствительность процесса регуляции к трипсину. Клострипанин и термолизин, но не папанин и α-химотрипсин частично имитируют действие трипсина. Аналогично трипсин действует на β-адренергические рецепторы синаптических мембран мозжечка быка. Таким образом, характер действия трипсина и эффективность его действия зависят от функционального состояния рецепторов и регуляторных N-белков; мишень трипсина, по-видимому, экспонирована на цитоплазматической поверхности мембраны.

Стимулируемые гормонами аденилатциклазные системы состоят по меньшей мере из трех компонентов: рецептора гормона, аденилатциклазы и GTP-связывающего регуляторного белка (N-белка) [1]. В процессе функционирования аденилатциклазной системы все ее компоненты закономерно переходят из одного функционального состояния в другое. При связывании гуаниловых нуклеотидов с N-белком сродство рецепторов к гормонам и другим агонистам снижается. Агонисты, связываясь с рецептором, способствуют обмену GDP на GTP на N-белке [2].

Можно ожидать, что изменения функциональных свойств рецепторов и N-белков отражают достаточно глубокие структурные изменения этих молекул. Одним из подходов к анализу таких изменений в белках является изучение действия на них экзогенных протеиназ на разных этапах функционирования белков. Недавно установлено, что трипсин по-разному влияет на способность α-адренорецепторов связывать агонисты и антагонисты [3], а химотрипсин устраняет регуляцию сродства этих рецепторов к агонистам гуаниловыми нуклеотидами [4]. Однако анализа действия протеиназ на рецепторные системы в зависимости от функционального состояния компонентов систем в этих работах проведено не было.

Цель данной работы — изучить действие трипсина и других протеиназ на β-адренергические рецепторы ретикулоцитов крыс, на регуляцию рецепторов гуаниловыми нуклеотидами и выяснить, зависит ли действие трипсина на систему от функционального состояния ее компонентов.

При инкубации мембран ретикулоцитов крыс с трипсином связывание [<sup>3</sup>H]дигидроальпренолола с мембранами уменьшается в диапазоне

концентрации трипсина 0,5–2,5 мкг/мл. При дальнейшем увеличении концентрации трипсина связывание антагониста остается на постоянном уровне (рис. 1). По результатам 20 опытов после инкубации мембран с трипсином в концентрациях 5–10 мкг/мл связывание [<sup>3</sup>H]дигидроальпренолола составляет  $75,9 \pm 4,4\%$  ( $p < 0,01$ ) от исходного. Антагонисты  $\beta$ -адренергических рецепторов (альпренолол и пропранолол) в концентрациях до 10 мкМ не защищали рецепторы от действия трипсина. Анализ по Скотчарду [5] связывания [<sup>3</sup>H]дигидроальпренолола с мембранами показал, что трипсин инактивирует до 30% центров связывания антагониста и не влияет на сродство к нему остающихся рецепторов. В контрольных мембранах число центров связывания антагониста составляет  $0,45 \pm 0,01$  пмоль/мг мембранного белка,  $K_{дис}$   $0,37 \pm 0,02$  нМ, а в мембранах, обработанных трипсином 15 или 60 мин при его максимальной концентрации (10 мкг/мл), —  $0,32 \pm 0,02$  пмоль/мг мембранного белка,  $K_{дис}$   $0,41 \pm 0,03$  нМ (рис. 2).

Связывание изопротеренола с рецепторами зависит от присутствия в среде GTP (рис. 3). В отсутствие GTP изопротеренол вытесняет 50% связанного [<sup>3</sup>H]дигидроальпренолола в концентрации 0,17 мкМ (кривая 1), а в присутствии GTP — в концентрации 0,9 мкМ (кривая 2). В присутствии GTP кривая вытеснения не только сдвигается вправо, но увеличивается ее наклон (коэффициент Хилла для кривой 1 составляет 0,68, а для кривой 2 — 0,97). На связывание изопротеренола влияли также GDP и негидролизуемый аналог GTP, GppNHp. После инкубации мембран с трипсином при его концентрации 0,5 мг/мл кривая вытеснения сдвигается вправо даже в отсутствие GTP (рис. 3, 3; табл. 1). Такой сдвиг указывает на то, что часть рецепторов теряет способность связывать агонист с высоким сродством. Однако GTP еще способен снижать сродство рецепторов к изопротеренолу, и кривая вытеснения в его присутствии сближается с кривой 2 на рис. 3. При увеличении концентрации трипсина до 2,5–10 мкг/мл эффект GTP исчезает (табл. 1).

Целью последующих экспериментов было выяснение характера действия трипсина на рецепторы, находящиеся в состоянии высокого сродства к агонисту. Если трипсин добавляли в инкубационные пробы, содержащие изопротеренол в различных концентрациях, кривая вытеснения сдвигалась несколько влево от контрольной кривой (рис. 4), т.е. трипсин в этих условиях увеличивал кажущееся сродство рецепторов к изопротеренолу. После предварительной инкубации мембран с изопротеренолом и трипсином GTP терял способность переводить рецепторы в состояние низкого сродства к агонисту (рис. 5).

Ранее было показано [6], что местные анестетики подобно гуаниловым нуклеотидам, но по другому механизму разрушают прочный комплекс агониста [<sup>3</sup>H]оксипбензил изопротеренола с  $\beta$ -адренергическими рецепторами эритроцитов лягушки. Аналогичное действие местный анестетик дибуканин оказывает и на рецепторную систему ретикулоцитов. В концентрации 2 мМ дибуканин способствовал диссоциации прочно связанного рецепторами изопротеренола (рис. 5). После обработки мембран трипсином эффект дибуканина не проявлялся (рис. 5). Аналогичные данные получены с другим местным анестетиком — тетракаином. Таким образом, не только гуаниловые нуклеотиды, но и местные анестетики не способны разрушать комплекс агонист–рецептор после обработки мембран трипсином. Трипсин действовал на процесс регуляции рецепторов, находящихся в прочном комплексе с агонистом, в более низких концентрациях, чем на процесс регуляции свободных рецепторов. После инкубации мембран с изопротеренолом (0,1 мМ), обработки их трипсином (0,5 мкг/мл) и отмывки GTP освобождал только 25% прочно связанного агониста. При концентрации трипсина 1 мкг/мл GTP терял способность освобождать изопротеренол (табл. 2). Было обнаружено еще одно отличие в действии трипсина на рецепторы в присутствии и в отсутствие изопротеренола. В первом случае уже при концентрации трипсина 0,5 мкг/мл содержание свободных от изопротеренола центров связывания [<sup>3</sup>H]дигидроальпренолола в отмытых после инкубации

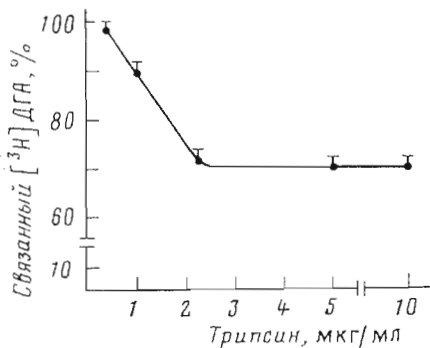


Рис. 1

Рис. 1. Концентрационная зависимость действия трипсина на связывание  $[^3\text{H}]$ дигидроальпренолола с мембранами ретикулоцитов. Мембраны (1,3 мг/мл белка) инкубировали с трипсином 30 мин при  $25^\circ\text{C}$ . В пробу вносили ингибитор трипсина из бобов сои и определяли связывание антагониста при концентрации 1 нМ. Каждая точка — усреднение трех параллельных опытов  $\pm$  среднеквадратичное отклонение

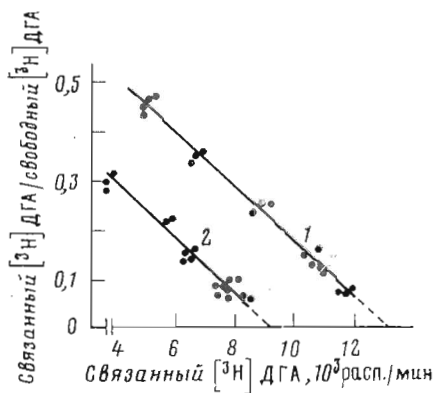


Рис. 2

Рис. 2. Графики Скетчарда для связывания  $[^3\text{H}]$ дигидроальпренолола ( $[^3\text{H}]$ ДГА) с контрольными мембранами (1) и мембранами, инкубированными с трипсином (10 мкг/мл) 15 мин при  $25^\circ\text{C}$  (2). Содержание белка при определении связывания 0,3 мг/мл

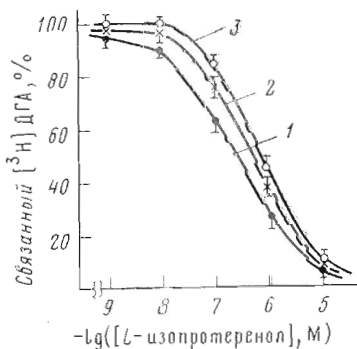


Рис. 3

Рис. 3. Кривые вытеснения изопроterenолом связанного рецепторами  $[^3\text{H}]$ дигидроальпренолола в контрольных мембранах в отсутствие (1) и в присутствии (2) 0,1 мМ ГТР, и в отсутствие ГТР в мембранах, обработанных трипсином в концентрации 0,5 мкг/мл (3)

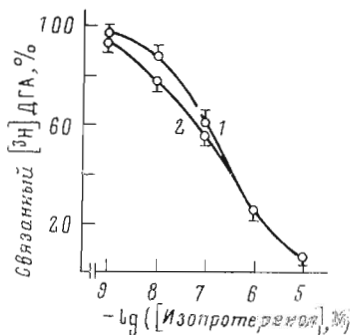


Рис. 4

Рис. 4. Кривые вытеснения изопроterenолом связанного рецепторами  $[^3\text{H}]$ дигидроальпренолола в отсутствие (1) и в присутствии (2) 0,5 мкг/мл трипсина в пробе

мембранах снизилось по сравнению с контролем на 43,6% (табл. 2). Во втором случае содержание рецепторов снизилось всего на 22,5% (табл. 2).

Трипсин заметно слабее действует на процесс регуляции рецепторов, если в среде инкубации присутствуют одновременно изопроterenол и ГТР. В концентрации 0,5 мкг/мл трипсина не влиял на регуляцию рецепторов, а в концентрации 2,5 мкг/мл лишь частично подавлял ее (табл. 3). Можно было предположить, что гуаниловые нуклеотиды каким-то образом защищают компоненты рецепторной системы от действия трипсина. Однако предварительная инкубация мембран с гуаниловыми нуклеотидами не только не ослабляла, а, напротив, резко усиливала действие трипсина. В присутствии ГТР или GDP (0,1 мМ) трипсин полностью подавлял регуляцию рецепторов в концентрации всего 75 мкг/мл (табл. 4). Эта концентрация сопоставима с концентрацией центров связывания  $[^3\text{H}]$ дигидроальпренолола в препарате. В этой концентрации трипсина не влиял на связывание антагониста с рецепторами.

Связывание [<sup>3</sup>H]дигидроальprenолола с мембранами (расп./мин) после инкубации мембран с трипсином

| Лиганды *          | Концентрация трипсина при обработке мембран, мкг/мл |                    |                     |                     |                     |
|--------------------|---|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|                    | 0   | 0,5                | 2,5                 | 5                   | 10                  |
| —                  | 8 459±372<br>(100)**                                | 8 036±117<br>(100) | 6 578±231<br>(100)  | 6 810±201<br>(100)  | 6 385±321<br>(100)  |
| Изопротеренол      | 3 875±223<br>(45,8)                                 | 4 982±90<br>(62,0) | 4 165±111<br>(63,3) | 3 972±148<br>(58,3) | 3 773±10<br>(59,1)  |
| Изопротеренол, GTP | 6 785±269<br>(79)                                   | 6 187±311<br>(77)  | 4 611±178<br>(70,1) | 4 197±319<br>(61,6) | 3 627±250<br>(56,8) |

\* Концентрация изопротеренола 0,2 мкМ, GTP — 0,1 мМ.

\*\* В скобках приведено связывание в присутствии изопротеренола и изопротеренола с GTP относительно контрольного связывания для данной серии мембран. Каждое значение связывания в расп./мин — среднее из трех параллельных опытов ± среднеквадратичное отклонение. Аналогичные данные получены в трех различных экспериментах.

Таблица 2

Влияние трипсина на рецепторы, находящиеся в прочном комплексе с изопротеренолом  
Приведено связывание [<sup>3</sup>H]дигидроальprenолола, расп./мин

| Лиганд       | Концентрация трипсина, мкг/мл                                  |                    |                    |                    |
|--------------|--|--------------------|--------------------|--------------------|
|              | 0  | 0,5                | 1                  | 2,5                |
| —            | Мембраны инкубировали с трипсином в присутствии изопротеренола |                    |                    |                    |
| —            | 8 598±3<br>(100)*  | 4 846±113<br>(100) | 4 659±169<br>(100) | 4 393±4<br>(100)   |
| GTP (0,1 мМ) | 12 195±127<br>(142)  | 5 330±18<br>(110)  | 4 554±93<br>(97)   | 4 524±211<br>(103) |
| —            | Мембраны инкубировали с трипсином в отсутствие изопротеренола  |                    |                    |                    |
| —            | 13 056±195   | 10 116±270         | 9 570±361          | 8 648±97           |

\* См. табл. 1. Мембраны инкубировали с изопротеренолом (10 мкМ) или без него 5 мин при 25° С, затем вносили в смесь трипсин в указанных концентрациях и инкубировали еще 30 мин при 25° С. После 4-кратной отмывки мембран теоретическая концентрация изопротеренола в среде снижалась до 10 нМ.

Кривая вытеснения изопротеренолом [<sup>3</sup>H]дигидроальprenолола совмещалась с кривой, полученной после обработки мембран трипсином без агониста и без гуаниловых нуклеотидов (рис. 2, 2).

Описанные выше эффекты трипсина могут быть связаны с повреждением им N-белка, ответственного за регуляторное действие гуаниловых нуклеотидов на рецептор. Для проверки этого предположения N-белок ковалентно модифицировали с помощью холерного токсина, который в присутствии NAD<sup>+</sup> ADP-рибозилирует важный для функционирования остаток (или остатки) аргинина в N-белке [7]. Полноту действия холерного токсина на целые клетки и изолированные мембраны оценивали по изменению активности аденилатциклазы в присутствии GTP или NaF. Предварительная обработка клеток или мембран холерным токсином не влияла на результаты обработки мембран трипсином.

Чтобы выяснить, действует ли трипсин на компоненты рецепторной системы, локализованные на внешней поверхности клеточной мембраны, интактные клетки инкубировали с трипсином, выделяли мембраны и анализировали свойства рецепторной системы. После обработки клеток трипсином в концентрациях до 50 мкг/мл ни содержание рецепторов, ни их регуляция гуаниловыми нуклеотидами достоверно не отличались от контроля (табл. 5). Эти результаты свидетельствуют о том, что мишень действия трипсина не локализована на наружной поверхности мембраны.

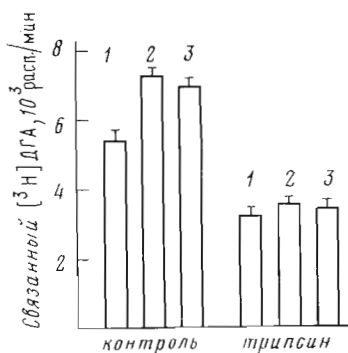


Рис. 5

Рис. 5. Действие трипсина на прочный комплекс рецептора с изопротеренолом. Мембраны (1,2 мг/мл белка) инкубировали с изопротеренолом (0,1 мкМ) 20 мин при 25° С, затем с трипсином (10 мкг/мл) или без него 30 мин при 25° С, отмывали 4 раза, инкубировали 15 мин при 25° С без добавок (1), с 2 мМ дибуканном (2) или 0,1 мМ ГТР (3) и после двух отмывок определяли связывание [<sup>3</sup>Н]дигидроальпренолола

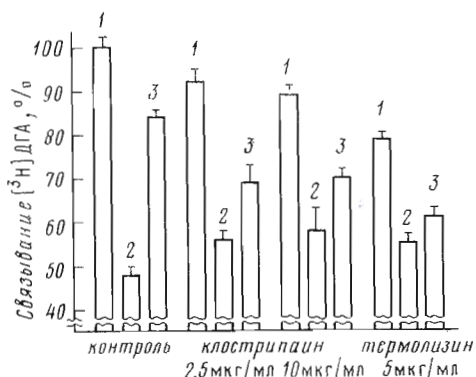


Рис. 6

Рис. 6. Действие клострипайна и термолизина на содержание рецепторов в мембранах и их регуляцию ГТР. Мембраны (1,4 мг/мл белка) инкубировали с протеиназами 30 мин при 25° С и определяли связывание [<sup>3</sup>Н]дигидроальпренолола в отсутствие (1) и в присутствии 0,2 мкМ изопротеренола (2) или изопротеренола и 0,1 мМ ГТР по отношению к данным контрольного опыта

Исследование действия других протеиназ на регуляцию рецепторов показало, что химотрипсин и папаин в концентрациях 5–10 мкг/мл снижали связывание с мембранами [<sup>3</sup>Н]дигидроальпренолола на 30–35%, но не влияли на регуляцию гуаниловыми нуклеотидами средства рецепторов к изопротеренолу. Термолизин и клострипайн также уменьшали связывание [<sup>3</sup>Н]антагониста и, кроме того, заметно влияли на регуляцию рецепторов (рис. 6). После обработки мембран термолизинном (5 мкг/мл) и клострипайном (2,5–10 мкг/мл) кривые вытеснения [<sup>3</sup>Н]дигидроальпренолола изопротеренолом были идентичны кривым, полученным после действия на мембраны трипсина в низких концентрациях (рис. 3). В отличие от трипсина клострипайн даже в концентрации 10 мкг/мл не подавлял способности ГТР далее снижать средство рецепторов к изопротеренолу. Химотрипсин в концентрации 25 мкг/мл на 30% снижал содержание рецепторов в мембранах, выделенных из обработанных им клеток, но не влиял на регуляцию оставшихся рецепторов. В мембранах клеток, обработанных папаином, термолизинном и клострипайном (25 мкг/мл), свойства рецепторов не отличались от контроля.

Для выяснения того, являются ли эффекты протеиназ на регуляцию β-адренергических рецепторов тканево- и видоспецифичными, было изучено действие трипсина и других протеиназ на связывание [<sup>3</sup>Н]дигидроальпренолола и регуляцию гуаниловыми нуклеотидами средства рецепторов к агонисту в синаптических мембранах мозжечка крупного рогатого скота. Трипсин, химотрипсин, термолизин и папаин в концентрациях 2,5–10 мкг/мл снижали связывание антагониста с рецепторами на 26–30%. Способность ГТР регулировать рецепторы подавлялась трипсином, но не другими протеиназами. После инкубации мембран с изопротеренолом, а затем с трипсином ГТР терял способность освобождать изопротеренол из прочного комплекса с рецепторами. Другие протеиназы такого действия не оказывали.

Представленные выше данные указывают на то, что характер действия трипсина на β-адренергические рецепторы и их регуляцию гуаниловыми нуклеотидами, а также чувствительность к трипсину рецепторной системы зависят от агонистов и/или гуаниловых нуклеотидов. В присутствии ГТР трипсин нарушает регуляцию рецепторов гуаниловыми нуклеотидами в чрезвычайно низкой концентрации (75 нг/мл). В отсутствие экзогенных лигандов трипсин оказывает такое же действие в кон-

Влияние способа инкубации мембран с GTP на действие трипсина  
Приведено связывание [<sup>3</sup>H]дигидроальпренолола, % от связывания без  
изопротеренола \*

| Мембраны **   | Концентрация трипсина,<br>мкг/мл |          |          |
|---|----------------------------------|----------|----------|
|   | 0                                | 0,5      | 2,5      |
| Изопротеренол   | 71,9±2,1                         | 67±1,7   | 66,2±2,9 |
| Изопротеренол. GTP  | 92,5±3,2                         | 94,9±0,4 | 80,1±4,3 |
| Изопротеренол (20 мин при 25° С), затем<br>GTP (10 мин при 25° С) | 89,4±1,3                         | 75,1±0,4 | 69±3,3   |

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

\*\* Концентрация изопротеренола 20 нМ, GTP — 0,1 мМ.

Таблица 4

Усиление гуаниловыми нуклеотидами действия трипсина  
Приведено количество связанного [<sup>3</sup>H]дигидроальпренолола, расп./мин

| Мембраны *                 | Добавки в среду преинкубации мембран ** |                       |                     |  |                     |  |
|----------------------------|---|-----------------------|---------------------|--|---------------------|--|
|                            | —                                       | трипсин<br>(75 нг/мл) | GTP (0,1 мМ)        | GTP (0,1 мМ),<br>трипсин<br>(75 нг/мл) | GDP (0,1 мМ)        | GDP (0,1 мМ),<br>трипсин<br>(75 нг/мл) |
| —                          | 11 809±550<br>(100)***                  | 11 511±336<br>(100)   | 12 073±478<br>(100) | 11 977±346<br>(100)                    | 11 760±211<br>(100) | 12 003±432<br>(100)                    |
| Изопро-<br>теренол         | 5 042±300<br>(42,6)                     | 5 448±366<br>(47,3)   | 5 762±243<br>(47,7) | 6 555±112<br>(54,7)                    | 5 280±397<br>(44,9) | 6 637±304<br>(55,3)                    |
| Изопро-<br>теренол,<br>GTP | 7 634±260<br>(65,4)                     | 7 383±245<br>(64,1)   | 7 765±294<br>(64,3) | 6 788±97<br>(56,6)                     | 7 644±30<br>(65)    | 6 577±289<br>(54,8)                    |

\* Концентрация изопротеренола 0,2 мкМ, GTP — 0,1 мМ.

\*\* Мембраны инкубировали 6 мин при 25° С с гуаниловыми нуклеотидами, затем в инкубационную смесь вносили трипсин и продолжали инкубацию еще 30 мин. После 4-кратной отмывки мембран теоретическая концентрация гуаниловых нуклеотидов в среде снизилась до 0,1 нМ.

\*\*\* См. табл. 1.

центрациях, в 50—100 раз более высоких. Чувствительность системы регуляции рецепторов к трипсину минимальна, когда во время обработки им мембран в среде присутствуют изопротеренол и GTP. В этих условиях происходит обмен агониста на рецепторе, а гуаниловых нуклеотидов — на N-белке, т. е. компоненты рецепторной системы постоянно переходят из одного функционального состояния в другое [2].

Действие трипсина во всех изученных случаях приводит к одному результату: кривая вытеснения изопротеренолом связанного рецепторами [<sup>3</sup>H]дигидроальпренолола занимает промежуточное положение между кривыми, отражающими связывание агониста в отсутствие и в присутствии GTP. Если исходить из разработанных в лаборатории Лефковича и широко распространенных методов анализа такого рода кривых [8, 9], то действие трипсина на ход кривой вытеснения можно интерпретировать следующим образом: трипсин нарушает способность определенной части рецепторов связывать агонист с высоким сродством; оставшаяся часть рецепторов сохраняет способность прочно связывать изопротеренол, но GTP уже не снижает их сродства к агонисту.

Когда мембраны обрабатывали трипсином после предварительной инкубации их с изопротеренолом, наблюдалась другая картина. Кажущееся сродство рецепторов к агонисту несколько увеличивалось по сравнению с контролем в отсутствие GTP. Нуклеотид и местные анестетики уже не влияли на связывание изопротеренола. Следует отметить, что изопротеренол увеличивает чувствительность системы регуляции рецепторов к действию трипсина.

Действие трипсина несколько отличается от действия других агентов, нарушающих процесс регуляции рецепторов гуаниловыми нуклеоти-

Связывание [<sup>3</sup>H]дигидроальprenолола (расп./мин) с мембранами, выделенными из клеток, инкубированных с трипсином

| Лиганды *          | Концентрация трипсина при инкубации клеток, мкг/мл |                     |                     |                     |
|--------------------|--|---------------------|---------------------|---------------------|
|                    | 0  | 5                   | 25                  | 50                  |
| —                  | 11 045±386<br>(100)**                              | 11 856±428<br>(100) | 12 815±973<br>(100) | 11 885±258<br>(100) |
| Изопротеренол      | 5 375±378<br>(48,6)                                | 5 736±229<br>(48,3) | 6 508±146<br>(50,7) | 6 288±376<br>(52,9) |
| Изопротеренол. GTP | 8 279±759<br>(75,0)                                | 9 192±511<br>(77,5) | 9 809±351<br>(76,5) | 8 762±47<br>(73,7)  |

\* Концентрация изопротеренола 0,2 мкМ, GTP — 0,1 мМ.  
\*\* См. табл. 1.

дами: местных анестетиков [6], филипина, N-этилмаленимида [10] и фенилглиноксаля [11]. Все эти агенты разобщают рецепторы и N-белки. В результате рецепторы связывают агонист с низким сродством уже в отсутствие гуаниловых нуклеотидов. Имеющиеся данные [12, 13] свидетельствуют о том, что для прочного связывания агониста с рецептором необходимо образование прочного комплекса последнего с N-белком, который в этом случае свободен от гуаниловых нуклеотидов [14].

Полученные нами результаты позволяют предположить, что вследствие протеолитической модификации одного из компонентов рецепторной системы образуется (в присутствии гуаниловых нуклеотидов или в отсутствие агониста) или закрепляется (в присутствии агониста) прочный комплекс рецептора и N-белка. Гуаниловые нуклеотиды и местные анестетики уже не способны вызывать диссоциацию модифицированного комплекса. Влияние изопротеренола или GTP на чувствительность системы к действию трипсина может объясняться тем, что доступность поражаемого компонента зависит от его функционального состояния. Субстрат трипсина локализован, по-видимому, на внутренней поверхности клеточной мембраны. На это указывает полное отсутствие действия трипсина даже в очень высоких концентрациях на интактные клетки, когда внутренняя поверхность клеточной мембраны недоступна для протеиназы.

Наши данные не позволяют дать ответа на вопрос, повреждает ли трипсин расположенный на этой поверхности N-белок, или обращенный внутрь клетки гипотетический участок молекулы рецептора, если рецептор вообще пронизывает мембрану, или какой-либо еще, неизвестный пока компонент системы, необходимый для регуляции рецепторов. Недавно, однако, было показано, что трипсин гидролизует N-белок в мембранах эритроцитов голубя и что характер его действия зависит от наличия и структуры связанного с N-белком гуанилового нуклеотида [15].

Помимо подавления процесса регуляции трипсин уменьшает также и общее количество центров связывания [<sup>3</sup>H]дигидроальprenолола в мембранах. Эти два эффекта не связаны непосредственно друг с другом, поскольку в присутствии GTP, когда трипсин полностью ингибировал действие нуклеотида, количество центров связывания антагониста в мембранах не изменялось. Интересно, что снижение его связывания наблюдалось только при действии трипсина на мембраны, но не на целые клетки, хотя центры связывания лигандов локализованы на наружной поверхности клеточной мембраны. Трипсин и другие протеиназы в отсутствие гуаниловых нуклеотидов и изопротеренола снижали связывание [<sup>3</sup>H]дигидроальprenолола лишь до некоторого предела (на 25—30%). Это указывает на определенную гетерогенность популяции рецепторов. Из других протеиназ, использованных в данной работе, во многом подобное, но не аналогичное действие оказывал кlostрипанн, обладающий более узкой специфичностью, чем трипсин, и гидролизующий полипептидные

цепи преимущественно по остаткам аргинина. Его действие было более ограничено, чем действие трипсина, в частности клострипанин не подавлял регуляции рецепторов GTP, хотя снижал их сродство к изопротеренолу.

Недавно были опубликованы данные о действии протеиназ, в том числе и трипсина, на  $\alpha$ -адренергические рецепторы в мембранах клеток печени [3, 4]. Обе группы авторов установили, что после протеолиза увеличивается связывание с рецепторами агониста, а в работе [4] показано, что протеолиз нарушает способность гуаниловых нуклеотидов регулировать сродство  $\alpha$ -адренергических рецепторов к агонистам. Таким образом, действие трипсина на  $\beta$ -адренергические рецепторы имеет определенное сходство с его действием на  $\alpha$ -адренергические рецепторы.

Ранее нами было показано, что в синаптических мембранах мозжечка, выделенных в отсутствие ингибиторов протеиназ, агонисты связываются с рецептором с высоким сродством, а гуаниловые нуклеотиды не регулируют рецепторы [16]. Это говорит о присутствии в клетках эндогенных протеиназ, действующих подобно трипсину. Эти результаты, а также чрезвычайно высокая чувствительность процесса регуляции рецепторов к действию протеиназ и определенная однородность оказываемого ими действия не только на рецепторы разных тканей и видов животных, но и на различные фармакологические классы адренергических рецепторов позволяют предположить, что подобный протеолиз может происходить *in vivo* и играть важную физиологическую роль.

### Экспериментальная часть

В работе использовали следующие реактивы: трипсин, обработанный 1-(тозиламидо-2-фенил)этилхлорметилкетонем, клострипанин (Worthington, США), папаин (Merck, ФРГ), термолизин (тип X), ингибитор трипсина из бобов сои, дибукаин и тетракаин (Sigma, США). Источники других реактивов приведены в работе [17].

Индукцию ретикулоцитоза у крыс, выделение мембран ретикулоцитов, определение связывания [ $^3\text{H}$ ]дигидроальprenолола с мембранами, определение активности аденилатциклазы, интоксикацию мембран холерным токсином проводили так, как описано в работе [17]. Синаптические мембраны мозжечка крупного рогатого скота получали из серого вещества мозжечка по методу [18]. Интоксикацию ретикулоцитов холерным токсином осуществляли по методу Лимбирд и др. [19].

Мембраны с протеиназами инкубировали 30 мин при 25° С. Мембраны, хранившиеся при -60° С, оттаивали, разбавляли в 4 раза буфером, содержащим 10 мМ трис-HCl (pH 7,5), 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,5 мг/мл аскорбиновой кислоты (буфер В). Концентрация мембранного белка при инкубации мембран с протеиназами варьировала в пределах 1,2—1,6 мг/мл. По окончании инкубации мембраны отмывали от протеиназ, суспендируя их в том же буфере и осаждая центрифугированием при 45 000g. Действие трипсина прекращали, добавляя в инкубационную смесь ингибитор трипсина из бобов сои в 10-кратном по отношению к трипсицу избытке. Клострипанин перед использованием активировали в среде, содержащей 1 мМ ацетат кальция и 2,5 мМ дигиотрент. Активацию проводили 12 ч при 4° С. Концентрация клострипанина в активационной среде составляла 2 мг/мл.

Для получения мембран с  $\beta$ -адренергическими рецепторами в состоянии высокого сродства к агонисту мембраны разводили в 4 раза буфером В, добавляли *L*-изопротеренол до концентрации 100 мкМ и инкубировали 25—30 мин при 25° С. Затем мембраны отмывали от избытка изопротеренола 4-кратным центрифугированием при 4° С в буферном растворе, содержащем 50 мМ трис-HCl (pH 7,5), 0,25 М сахарозу, 0,5 мг/мл аскорбиновой кислоты.

В ряде опытов для анализа действия протеиназ на связывание и регуляцию рецепторов гуаниловыми нуклеотидами сравнивали связывание [ $^3\text{H}$ ]дигидроальprenолола в отсутствие и в присутствии изопротеренола в концентрации 0,1—0,2 мкМ вместе или без GTP (0,1 мМ). При такой



концентрации изопротеренола действие ГТР проявляется особенно ярко (рис. 3).

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. Limbird L. E. *Biochem. J.*, 1981, v. 195, № 1, p. 1–13.
3. El-Refai M. F., Exton J. N. *J. Biol. Chem.*, 1980, v. 255, № 12, p. 5853–5858.
4. Geynet P., Borsodi A., Ferry N., Hanoune J. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1980, v. 97, № 3, p. 947–954.
5. Scatchard G. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1949, v. 51, p. 660–672.
6. Voeikov V. L., Lefkowitz R. J. *Biöchim. et biophys. acta*, 1980, v. 629, № 2, p. 266–281.
7. Moss G., Vaughan M. *J. Biol. Chem.*, 1977, v. 252, № 7, p. 2455–2457.
8. De Lean A., Stadel J., Lefkowitz R. J. *J. Biol. Chem.*, 1980, v. 255, № 15, p. 7108–7117.
9. Kent R. S., De Lean A., Lefkowitz R. J. *Mol. Pharmacol.*, 1980, v. 17, № 1, p. 14–23.
10. Howlett A. C., Van Arsdale P. M., Gilman A. G. *Mol. Pharmacol.*, 1978, v. 14, № 5, p. 531–539.
11. Pike L. F., Lefkowitz R. J. *J. Biol. Chem.*, 1980, v. 255, № 14, p. 6860–6867.
12. Limbird L. E., Gill D. M., Lefkowitz R. J. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1980, v. 77, № 2, p. 775–779.
13. Michel T., Hoffman B. B., Lefkowitz R. J., Caron M. G. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1981, v. 100, № 3, p. 1131–1136.
14. Cassel D., Selinger Z. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1978, v. 75, № 11, p. 4155–4159.
15. Hudson T. M., Roeber G. F., Johnson G. L. *J. Biol. Chem.*, 1981, v. 256, № 3, p. 1459–1465.
16. Воейков В. Л., Виленская Н. Д., Гуревич В. В., Клименко А. С. VIII Всес. конф. по биохимии нервной системы. Тез. докл. Минск: Наука и техника, 1980, с. 110–111.
17. Воейков В. Л., Лукашев М. Е., Гуревич В. В., Виленская Н. Д. *Биооргани. химия*, 1982, т. 8, № 4, с. 524–531.
18. De Robertis E., Rodriguez De Lores Arnais G., Alberici M., Butcher R. W., Sutherland E. W. *J. Biol. Chem.*, 1967, v. 242, № 15, p. 3487–3493.
19. 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.

Поступила в редакцию  
3.XI.1981

#### EFFECTS OF TRYPSIN ON THE REGULATION OF $\beta$ -ADRENERGIC RECEPTORS BY GUANYL NUCLEOTIDES

VOEIKOV V. L., GUREVICH V. V.

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

Treatment of the rat reticulocyte membranes, but not of the intact cells with trypsin diminished the specific  $\beta$ -adrenergic receptor binding of ( $^3\text{H}$ )dihydroalprenolol with no change in the  $K_d$ . Trypsin abolished the effect of GTP on the affinity of the receptor for agonist in concentrations  $>5 \mu\text{g/ml}$  in the absence and  $75 \text{ ng/ml}$  in the presence of GTP, respectively. Trypsin decreased the receptor affinity for the agonist, but treatment of membranes after preincubation with isoproterenol increased the number of high affinity sites. Nucleotide and the local anesthetic dibucaine did not decrease affinity of the receptor for the agonist after such a treatment. Simultaneous presence of GTP and isoproterenol during trypsin treatment reduced efficiency of its action. Clostripain and thermolysin, in contrast to papain and  $\alpha$ -chymotrypsin, mimicked in part trypsin action. In the same manner trypsin acted upon the  $\beta$ -adrenergic receptors of bovine cerebellum synaptic membranes. Thus the mode and efficiency of trypsin action depend upon the functional state of the receptor and the regulatory N-protein; the target of trypsin action is exposed probably on the inner side of the cell membrane.