



УДК 576.3+577.3

© 2008

В. В. Жирнов, С. В. Хижняк, В. М. Войцицкий, Е. А. Лапоша

**Структурное состояние мембранных белков
эритроцитов человека при взаимодействии
с лигандами β_1 -адренорецепторов — добутамином
и атенололом**

(Представлено академиком НАН Украины В. П. Кухарем)

Interaction of β_1 -adrenoreceptor ligands, dobutamine and atenolol, with human erythrocyte membranes by acrylamide quenching the intrinsic protein fluorescence has been investigated. It is shown that, by binding with membranes, these ligands form protein conformations having different efficiencies and availabilities for the quenching by acrylamide. The findings allow us to assume that atenolol is an inversion antagonist of human β_1 -adrenoreceptors, i. e. it is capable to inhibit the basal activity of these receptors shifting the equilibrium between active and nonactive conformations toward the last.

β -Адренергические рецепторы (β -АР) принадлежат к семейству мембранных рецепторов, сопряженных с G-протеинами, через которые они передают внеклеточные сигналы внутрь клетки, и играют ведущую роль в реакции организма на стресс. Эти рецепторы активируются эндогенными катехоламинами — адреналином и норадреналином, и являются мишенью действия около 30% фармпрепаратов, используемых в медицинской практике. Мембранные рецепторы могут существовать в “активной” и “неактивной” конформациях, и способность лигандов стабилизировать конкретную конформацию рецептора лежит в основе их разделения на агонисты, антагонисты и инверсные агонисты. Показано, что при связывании агонистов с рецептором образуются структуры, характерные для конкретного лиганда, отображая отличия в структурных состояниях рецептора, производимых процессом связывания, что может указывать на различие в местах их связывания с β -АР [1]. В настоящее время считается, что β_1 -адренорецепторы существуют в двух различных активных конформациях [2]. Хотя молекулярная природа этих структур неизвестна, они различимы по их фармакологическим свойствам. Добутамин, агонист β_1 -адренорецепторов, преимущественно взаимодействует с высокоаффинным катехоламиновым сайтом β_1 -адренорецепторов, этот процесс эффективно ингибируется атенололом — классическим β_1 -антагонистом. Однако атенолол мало влияет на взаимодействие добутамина с низкоаффинным

сайтом β_1 -адренорецепторов [3]. Часто взаимодействие антагониста с рецептором изучается в присутствии соответствующего агониста, т. е. с уже модифицированной агонистом конформацией рецептора. При этом теряется часть информации, касающаяся особенностей взаимодействия антагонистов с нативными конформациями рецептора. Как известно, флуоресцентная спектроскопия является одним из главных методов в изучении организации и динамики биологических мембран вследствие адекватного временного масштаба, минимального возмущения исследуемых структур, неагрессивной природы и высокой чувствительности. Нами этот метод использован для исследования особенностей взаимодействия лигандов β_1 -АР, добутамина и атенолола, с мембранами эритроцитов человека.

В исследованиях использовали плазматические мембраны эритроцитов крови доноров. Концентрацию белка определяли по методу Лоури и соавт. [4]. В суспензию плазматических мембран вносили атенолол и добутамин в диапазоне концентраций от $1 \cdot 10^{-8}$ до $1 \cdot 10^{-4}$ М. Время инкубации — 20 мин. Все измерения проводили при комнатной температуре на спектрофлуориметре “Shimadzu-RF510” (Япония). Среда для измерений содержала 0,1 М КСl и 5 мМ *трис*-НСl (рН 7,0). Интенсивность флуоресценции триптофановых остатков мембранных белков регистрировали при 338 нм, длина волны возбуждения — 296 нм [5]. При изучении гашения флуоресценции триптофановых остатков белков мембран эритроцитов как тушитель использовали акриламид. Суспензию мембран (0,1 мг белка/мл) титровали 1 М раствором акриламида до конечной концентрации 0,4 М.

Гашение флуоресценции мембранных белков определяли согласно уравнению

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{\beta K_{SV}[Q]} + \frac{1}{\beta},$$

где F_0 и F — интенсивность флуоресценции в отсутствие и в присутствии тушителя; Q — концентрация тушителя; K_{SV} — константа гашения Штерна–Фольмера; β — доля триптофановых остатков, доступных гашению.

Данные по гашению представляли в модифицированных координатах Штерна–Фольмера ($F_0/(F_0 - F)$) от $1/[Q]$ [6].

Экспериментальные данные обрабатывали общепринятыми статистическими методами с помощью пакета программ Statistica 7.0 и представляли как среднее значение (M) \pm среднеквадратичная ошибка (m); n — объем выборки.

Собственную флуоресценцию белков при возбуждении в ультрафиолетовой области спектра обуславливает наличие триптофановых, тирозиновых и фенилаланиновых остатков. Однако доминирующий вклад в интенсивность флуоресценции при $\lambda_{вб} = 340$ нм вносят триптофановые остатки белков. Лиганд, связываясь с белком, может непосредственно влиять на свечение остатков триптофана, действуя как тушитель, или физически взаимодействовать с флуорофором и таким образом изменять полярность его окружения и/или его доступность к растворителю. Альтернативно, лиганд может связываться с сайтом, удаленным от триптофанового остатка, и индуцировать изменение конформации белка, которое изменяет микроокружение триптофана. Интенсивность триптофановой флуоресценции — один из основных спектральных показателей, который характеризует конформационное состояние белковой молекулы, поскольку максимум и интенсивность флуоресценции отдельных триптофановых остатков отличаются в зависимости от их расположения в белковой молекуле и, соответственно, от окружения.

Установлено, что в результате действия добутамина при концентрациях $< 1 \cdot 10^{-5}$ М интенсивность триптофановых остатков белковых молекул мембраны эритроцитов незна-

чительно, но устойчиво снижается относительно контроля (табл. 1). Как известно, эритроциты содержат как α_1 -АР, так и β -АР. Максимальное количество мест связывания в эритроцитах для α_1 -АР более чем в 4 раза ($V_{\text{макс}} = 847$ фмоль/мг белка) выше, чем для β -АР ($V_{\text{макс}} = 195$ фмоль/мг белка) [7, 8]. Используемый нами добутамин является смесью, состоящей как из (+), так и (-) изомеров в соотношении 1 : 1. (+)-Добутамин является мощным агонистом β_1 -АР, а (-)-добутамин — агонистом α_1 -АР. При этом (+)-добутамин является на порядок более активным агонистом, чем (-)-изомер. Добутамин также обладает умеренной стимулирующей активностью и по отношению к β_2 -АР, которая проявляется только при высоких (субмиллимолярных) концентрациях. Поэтому эффекты добутамина в концентрации 1 мкМ и ниже можно рассматривать как связанные преимущественно с активацией β_1 -АР.

Как уже указывалось, адренорецепторы могут существовать, по крайней мере, в двух конформационных состояниях — не связанном и связанном с лигандом. При этом предполагается, что существует динамическое равновесие между неактивным (R) и активным (R*) состояниями рецептора и что клеточная реакция определяется внутренней способностью лиганда изменять общее равновесие между двумя состояниями рецептора [9]. Согласно этой модели флуоресцентные свойства свободного рецептора представляют средние флуоресцентные свойства рецепторов в состояниях R и R*. Флуоресцентные свойства состояния R можно наблюдать только при связывании рецептора с инверсным агонистом, тогда как состояние R* реализуется только в присутствии полного агониста. Следовательно, снижение свечения триптофанов можно интерпретировать как смещение равновесия конформации рецептора в направлении R*. Однако эти данные не противоречат и модели с множественными активными конформационными состояниями рецептора, в которой биологическая эффективность агониста может являться следствием множественных конформационных изменений в рецепторе, а не только смещением равновесия между двумя состояниями. Следует отметить, что без анализа флуоресцентно меченого рецептора в системе, которая предусматривает реконструкцию вместе с соответствующим G-белком, нельзя исключить возможность, что изменение в свечении, вызванное агонистом, отражает и структурные изменения, прямо связанные с активацией АР соответствующих G-белков. На это косвенно указывает отсутствие взаимосвязи между собственной активностью агониста и изменениями флуоресценции. Такая реакция возможна в том случае, если конформационные изменения G-белков, приводящие к их активации, дают обратный флуоресцентный ответ. В любом случае, полученные данные свидетельствуют о том, что наблюдаемые изменения интенсивности флуоресценции фактически описывают конформационные перестройки в рецепторе, которые приводят к активации протеина G.

Вызванное агонистом уменьшение в свечении рецептора может быть следствием изменений в структуре рецепторов, которые изменяют доступность триптофанов белка к водно-

Таблица 1. Параметры тушения акриламидом триптофановой флуоресценции мембран эритроцитов при действии добутамина ($M \pm m$, $n = 15$)

Показатель	Контроль	Концентрация добутамина, М			
		$1 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-4}$
F_0 , отн. ед.	$1,00 \pm 0,03$	$0,92 \pm 0,02$	$0,94 \pm 0,04$	$1,03 \pm 0,03$	$1,34 \pm 0,07^*$
K_{SV} , М ⁻¹	$4,28 \pm 0,40$	$4,83 \pm 0,70$	$3,13 \pm 0,50^*$	$1,98 \pm 0,91^*$	$1,41 \pm 0,21^*$
β , отн. ед.	$0,42 \pm 0,03$	$0,35 \pm 0,03$	$0,45 \pm 0,07$	$0,57 \pm 0,12^*$	$0,77 \pm 0,04^*$

* $p \leq 0,05$ относительно контроля.

му растворителю. Такую информацию можно получить с помощью тушителей триптофановой флуоресценции, тушащая эффективность которых напрямую связана с полярностью окружения триптофановых остатков. Поэтому тушение триптофановой флуоресценции часто используется для получения информации об изменениях локального окружения триптофанилов при связывании лиганда. Для оценки конформационных изменений мембранных белков при действии исследуемых веществ изучали тушение триптофановой флуоресценции плазматической мембраны эритроцитов акриламидом. Акриламид является нейтральным тушителем. Как неионный тушитель он позволяет получить информацию об экспонированных гидрофобных поверхностях, проникая внутрь гидрофобного интерьера белков. Однако главным преимуществом акриламида как тушителя является то, что он существенно не взаимодействует с протеинами.

По углу наклона прямых, построенных в модифицированных координатах Штерна–Фольмера, рассчитана динамическая константа тушения (K_{SV}). Установлено, что значение K_{SV} для препаратов плазматической мембраны эритроцитов дозозависимо уменьшается при действии добутамина в диапазоне концентраций $1 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-4}$ М относительно контроля (см. табл. 1). Как известно, в белке полностью экспонированные остатки триптофана имеют значения $K_{SV} = 8$ – 9 M^{-1} , тогда как для экранированных, или недоступных, триптофанилов значения K_{SV} снижаются и могут приближаться к нулю. Из этого следует, что агонист добутамин при связывании с рецептором, вызывая конформационный переход $R \rightarrow R^*(i)$, повышает экранированность триптофанилов и, следовательно, снижает эффективность их тушения акриламидом, что указывает на стабилизацию белковой конформации за счет гидрофобных взаимодействий. Однако при этом количество доступных для акриламида триптофанилов дозозависимо увеличивается в том же диапазоне концентраций добутамина с 45 до 77% (см. табл. 1). Обратное взаимоотношение между эффективностью тушения и доступностью триптофанилов косвенно свидетельствует о стерических ограничениях доступности триптофанилов рецептора в состоянии R для тушителя, которые частично снимаются агонистом. Хотя, опять-таки, нельзя исключить возможный вклад от флуоресценции триптофанилов G-белков, активируемых рецептором.

Кроме того, следует учитывать, что (+)-добутамина в низких концентрациях стимулирует β_1 -адренорецепторы, а в высоких — как β_1 -, так и β_2 -адренорецепторы [10]. В мембранах эритроцитов человека соотношение этих рецепторов составляет 1 : 2, а избирательность — 20 : 1 соответственно [11]. Поскольку EC_{50} для эффектов добутамина, опосредуемых β_1 -адренорецепторами, лежит в диапазоне микромолярных концентраций [12], то вышеописанные изменения можно с достаточным основанием рассматривать как результат взаимодействия добутамина преимущественно с β_1 -адренорецепторами. По-видимому, именно взаимодействием с β_2 -адренорецепторами можно объяснить существенное повышение флуоресценции мембран эритроцитов, вызываемое максимальной концентрацией добутамина (см. табл. 1). Интересно, что повышение флуоресценции триптофана является единственным отличием флуоресцентного ответа клетки на добутамина в высокой концентрации от такового в низкой. Это указывает на различное молекулярное окружение флуорофора и, возможно, является результатом взаимодействия остатков триптофана с различными соседями.

Избирательный антагонист β_1 -АР, атенолол, не вызывает достоверных изменений триптофановой флуоресценции (табл. 2). Однако, в отличие от агониста, снижение эффективности тушения акриламидом является дозозависимым, наблюдается во всем диапазоне концентраций и при высоких концентрациях (10 и 100 мкМ) значительно менее выраже-

Таблица 2. Параметры тушения акриламидом триптофановой флуоресценции мембран эритроцитов при действии атенолола ($M \pm m$, $n = 15$)

Показатель	Контроль	Концентрация атенолола, М			
		$1 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-4}$
F_0 , отн. ед.	$1,00 \pm 0,03$	$0,98 \pm 0,04$	$0,95 \pm 0,06$	$1,0 \pm 0,04$	$1,03 \pm 0,05$
K_{SV} , M^{-1}	$4,37 \pm 0,60$	$3,08 \pm 0,24^*$	$3,02 \pm 0,50^*$	$3,2 \pm 0,71^*$	$3,42 \pm 0,09^*$
β , отн. ед.	$0,43 \pm 0,04$	$0,40 \pm 0,01$	$0,32 \pm 0,05^*$	$0,37 \pm 0,02$	$0,36 \pm 0,01^*$

* $p \leq 0,05$ относительно контроля.

но. Кроме того, атенолол, в отличие от добутамина, не увеличивает, а снижает количество недоступных для тушителя триптофанилов. Все это указывает на существенные различия между конформациями агонист- и антагонист-связанных АР.

Поскольку атенолол имеет сродство к β_1 -АР на три порядка большее, чем к β_2 -АР [13], и поэтому даже в высоких концентрациях не модифицирует эффект агонистов β_2 -АР [14], то можно с достаточным основанием считать, что наблюдаемые изменения флуоресцентных показателей, вызванные атенололом в мембранах эритроцитов, отражают свойства неактивной конформации β_1 -АР. Нейтральный антагонист, как известно, не смещает $R \leftrightarrow R^*$ равновесия. Отсюда следует, что β_1 -АР эритроцитов человека имеют конститутивную (базальную) активность, ранее это было показано для эритроцитов индюка [15].

Полученные результаты позволяют предположить, что атенолол является инверсным антагонистом β_1 -АР эритроцитов человека, т. е. способен ингибировать базальную активность этих рецепторов, смещая равновесие между активной и неактивной конформациями в сторону последней.

1. Devanathan S., Yao Z., Salamon Z. et al. Plasmon-Waveguide Resonance Studies of Ligand Binding to the Human β_2 - Adrenergic Receptor // Biochemistry. – 2004. – **43**, No 11. – P. 3280–3288.
2. Molenaar P. The “state” of beta-adrenoceptors // Brit. J. Pharmacol. – 2003. – **140**, No 1. – P. 1–2.
3. Baker J. G. Sites of action of β -ligands at the human β_1 -adrenoceptor // Ibid. – 2005. – **144**, No 3. – P. 317–322.
4. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – **193**, No 1. – P. 265–275.
5. Демченко А. П. Люминесценция и динамика структуры белков. – Киев: Наук. думка, 1988. – 280 с.
6. Lehrer S. S., Leavis P. C. Solution quenching of protein fluorescence // Meth. Enzymol. – 1978. – **49**. – P. 222–236.
7. Sundquist J., Blas S. D., Hogan J. E. et al. The alpha 1-adrenergic receptor in human erythrocyte membranes mediates interaction in vitro of epinephrine and thyroid hormone at the membrane $Ca(2+)$ - ATPase // Cell. Signal. – 1992. – **4**, No 6. – P. 795–999.
8. Dickinson K., Richardson A., Nahorski S. R. Homogeneity of Beta $_2$ - Adrenoceptors on Rat Erythrocytes and Reticulocytes. A Comparison with Heterogeneous Rat Lung Beta-Adrenoceptors // Mol. Pharmacol. – 1981. – **19**, No 2. – P. 194–204.
9. Gether U., Lin S., Kobilka B. K. Fluorescent Labeling of Purified β_2 - Adrenergic Receptor. Evidence for ligand-specific conformational changes // J. Biol. Chem. – 1995. – **270**, No 47. – P. 28268–28275.
10. Williams R. S., Bishop T. Selectivity of Dobutamine for Adrenergic Receptor Subtypes. In Vitro Analysis by Radioligand Binding // J. Clin. Invest. – 1981. – **67**, No 6. – P. 1703–1711.
11. Bree F., Gault I., d’Athis P., Tillement J. P. Beta adrenoceptors of human red blood cells, determination of their subtypes // Biochem. Pharmacol. – 1984. – **33**, No 24. – P. 4045–4050.
12. Brown L., Nábauer M., Erdmann E. Dobutamine: positive inotropy by nonselective adrenoceptor agonism in isolated guinea pig and human myocardium // Naunyn-Schmiedeberg’s Arch. Pharmakol. – 1987. – **335**, No 4. – P. 385–390.
13. Baker J. G. Site of action of β -ligands at the human β_1 -adrenoceptor // J. Pharmacol. and Exp. Ther. – 2005. – **313**, No 3. – P. 1163–1171.

14. *Horga J. F., Gisbert J., De Agustin J. C. et al.* Beta-2-Adrenergic Receptor Activates Adenylate Cyclase in Human Erythrocyte Membranes at Physiological Calcium Plasma Concentrations // *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. – 2000. – **26**, No 3. – P. 223–228.
15. *Gotze K., Jakobs K. H.* Unoccupied β -adrenoceptor-induced adenylyl-cyclase stimulation in turkey erythrocyte membranes // *Eur. J. Pharmacol.* – 1994. – **268**, No 2. – P. 151–158.

*Институт биоорганической химии
и нефтехимии НАН Украины, Киев
Киевский национальный университет
им. Тараса Шевченко*

Поступило в редакцию 18.02.2008