

ЛЕКЦИИ
В ЖУРНАЛЕ

УДК 581.1:576.312:577.1

АНАЛИЗ ГОРМОН-РЕЦЕПТОРНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

© 2008 г. С. Н. Ломин*, Г. А. Романов*,**

*Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва

**Институт физико-химической биологии Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва

Поступила в редакцию 23.04.2007 г.

Подробно проанализированы современные методические подходы, кратко представлены как теоретические предпосылки исследования гормон-рецепторного взаимодействия, так и конкретные практические рекомендации планирования и проведения эксперимента. Рассмотрены методики определения базовых характеристик взаимодействия низкомолекулярных лигандов с рецепторами: специфического (неспецифического) связывания, типа взаимодействия, констант сродства, количества рецепторов, их лигандной специфичности. Многочисленные примеры теоретических зависимостей и экспериментальных результатов представлены в виде наглядных построений. Лекция предназначена как специалистам, непосредственно занимающимся молекулярной рецепцией и сигналингом гормонов, так и широкому кругу читателей, интересующихся проблемами гормональной регуляции у эукариот.

Ключевые слова: растение – гормон – лиганд – рецептор – гормон-рецепторное взаимодействие – константы сродства – лигандная специфичность – радиолигандный метод.

ВВЕДЕНИЕ

Каждая клетка многоклеточного организма окружена многокомпонентным раствором, содержащим микро- и макромолекулы. Определенные вещества этого раствора способны в ничтожных концентрациях существенно влиять на функциональное состояние клетки. Это так называемые гормоны – органические соединения, образуемые в одних частях организма и действующие на другие его части как сигналы для включения или выключения определенных метаболических программ. Но почему одни вещества производят такой сильный эффект на клетку, а другие, даже близкие по структуре, – нет? Дело в том, что клетки заранее настроены (компетентны) для восприятия тех или иных конкретных химических соединений в качестве сигнальных молекул. Компетентные клетки воспринимают гормональные соединения как

определенный сигнал и проводят его до первичных внутриклеточных мишеней, которыми чаще всего бывают гены первичного ответа или ферменты метаболизма.

Первым этапом процесса восприятия клеткой сигнала является его рецепция. Для этого служат специальные белки-рецепторы. Рецепторы состоят из функциональных частей (доменов), из которых особую значимость имеет лиганд-связывающий домен, а также эффекторный домен, ответственный за включение/выключение сигнальной трансдукции (рис. 1). Ассоциация гормона с лиганд-связывающим доменом приводит к изменению конформации и функционального состояния эффекторного участка (его активации или, реже,

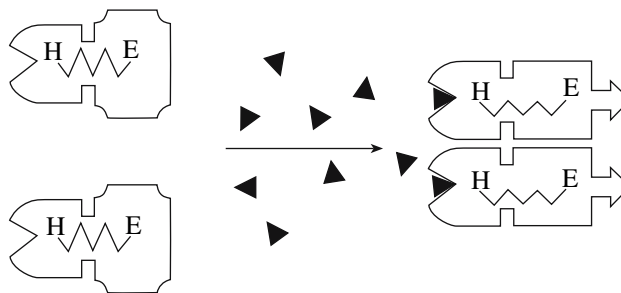


Рис. 1. Схема действия типичного рецептора гормона. Н – гормон-связывающий домен; Е – эффекторный домен. Темные треугольники обозначают гормоны.

Сокращения: L (U , F) – несвязанный (свободный) лиганд (гормон); L^* – меченый лиганд; R – рецептор; $[L_T]$, $[R_T]$ – общие концентрации лиганда и рецепторных сайтов связывания; LR (B) – лиганд-рецепторный комплекс (связанный гормон); B_S – специфическое связывание; B_T – тотальное связывание; B_{NS} – неспецифическое связывание; IC_{50} – концентрация немеченого лиганда, ингибирующая связывание меченого лиганда на 50%; K_D – равновесная константа диссоциации; K_A – равновесная константа ассоциации; K_I – равновесная константа ингибирования.

Адрес для корреспонденции: Романов Георгий Александрович, 127276 Москва, Ботаническая ул., 35. Институт физиологии растений РАН. Электронная почта: gar@ippras.ru

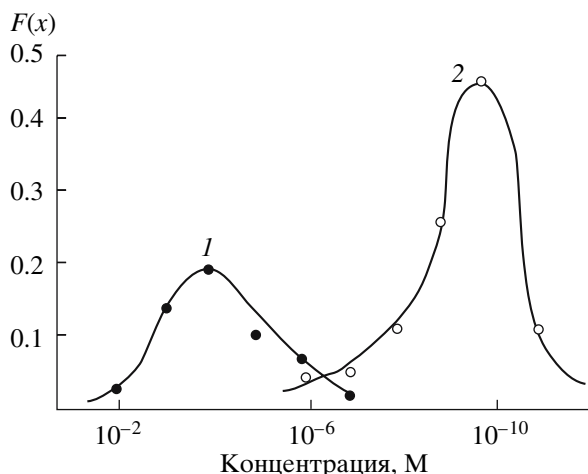


Рис. 2. Различие констант связывания ферментативного и рецепторного взаимодействия (по [11]).

1 – распределение значений констант Михаэлиса (K_M) фермент-субстрат; 2 – распределение значений констант диссоциации (K_D) гормон-рецептор. По оси ординат – количество белков (отн. ед.) с константами в данном диапазоне значений.

инактивации). Таким образом, рецепторы – это белки, которые “переключают” внешний, химический сигнал на внутриклеточный, биохимический сигнал (активность определенных регуляторных белков). От режима работы рецептора во многом зависит характер передачи сигнала и, соответственно, клеточный ответ. Отличительной чертой рецептора является его способность узнавать и избирательно связывать конкретные химические лиганды, в том числе гормоны. Рецептор связывает гормон с высоким сродством, практически всегда обратимо, не производя химических изменений гормона [1; 2, с. 8; 3]. Этими особенностями взаимодействие гормона с рецептором отличается от взаимодействия гормона с другими белками, например, ферментами метаболизма. Рецепторы могут находиться как внутри клетки, так и ассоциироваться с клеточной мембраной. После связывания гормона рецепторы часто объединяются в димеры, причем такая димерная форма и служит активной формой рецепторов (рис. 1) [4, 5].

Изучение рецепторов имеет долгую историю. Еще в 1878 г. Langley [6] на примере действия атропина и пилокарпина на секрецию слюнных желез, а также никотина и кураре на сокращение поперечно-полосатых мышц показал существование клеточных механизмов узнавания химических соединений. Тогда же возникло предположение о присутствии в клетке неких субстанций, ответственных за этот процесс. В начале XX в. Эрлихом и Мечниковым была предложена теория “боковых цепей” (Нобелевская премия 1908 г.). Они предположили, что “боковые цепи” на поверхности клеток распознают химические соединения и

взаимодействуют с ними. Эрлих назвал эти “боковые цепи” рецепторами (от лат. *recipere* – узнавать, распознавать) (цит. по [7; 8; 9, с. 335–496; 10]). В начале XX в. изучение рецепторов базировалось на косвенных, фармакологических данных: изучали зависимость клеточного ответа от концентрации введенного гормона. Первое количественное описание этой зависимости было предложено Кларком в 1926 г. Он заметил, что зависимости клеточного ответа от концентрации индуктора очень напоминают уже известные к тому времени зависимости из ферментативной кинетики. Кларк предложил описывать взаимодействие лиганд (L)–рецептор (R) как обратимую реакцию:



где LR – комплекс лиганда с рецептором, а k_{+1} и k_{-1} – константы скоростей ассоциации и диссоциации лиганд-рецепторных комплексов. В условиях равновесия по закону действующих масс равновесная константа диссоциации (K_D) для этой системы определяется как

$$K_D = \frac{1}{K_A} = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{[L][R]}{[LR]}. \quad (2)$$

Так как этап взаимодействия лиганда с рецептором во многом определяет последующий клеточный ответ, характеристики этого процесса представляют существенный интерес. Равновесная константа диссоциации K_D (или обратная ей константа ассоциации K_A) является одной из таких важнейших характеристик, отражающей степень сродства рецептора к гормону. По сравнению с другими гормон-связывающими белками рецепторы обладают наивысшим сродством к своим лигандам, диапазон K_D от 10^{-7} до 10^{-12} М (рис. 2 [11]) или, если выразить в величинах K_A , то диапазон K_A от 10^7 до 10^{12} М⁻¹. Такие большие величины констант ассоциации соответствуют большим изменениям свободной энергии взаимодействия, соответственно от 9,5 до 16,3 ккал/моль (в стандартных условиях при 25°C). Эта высвобождающаяся химическая энергия как раз и расходуется на изменение конформации рецепторного белка.

Другой важнейшей характеристикой рецептора является лигандная специфичность связывания. Как правило, каждый рецептор может связать очень ограниченное число химически сходных лигандов, при этом степень сродства рецептора к лиганду варьирует в зависимости от структуры последнего. Информация о лигандной специфичности рецептора в сочетании с данными о его локализации позволяет оценить действенность той или иной формы гормона и его аналогов для органа или ткани живого организма. Знание параметров взаимодействия гормонов с рецепторами позволяет ответить и на ряд других вопросов, возникающих в ходе изучения молекулярных механизмов

сигналинга гормонов. Установленный факт высокоаффинного и высокоспецифичного связывания гормона с определенным белком часто позволяет однозначно идентифицировать новый рецепторный белок либо подтвердить рецепторную функцию известного белка – вероятного кандидата на роль рецептора. Количественный анализ параметров связывания позволяет определить долю рецепторов от суммарного белка и количество рецепторов в расчете на клетку. Эти сведения являются решающими для постановки правильного диагноза при различных гормональных патологиях, в том числе у человека. Изучение взаимодействия гормонов с рецепторами позволяет выявить механизм этого взаимодействия (простое, кооперативное, анти-кооперативное), оценить влияние условий среды на характеристики ассоциации гормонов с рецепторами и многое другое. Однако далеко не всегда такие исследования проводятся, анализируются и интерпретируются достаточно корректно.

В настоящем обзоре мы остановимся на универсальных количественных методах анализа гормон-рецепторного взаимодействия, широко применяемых в настоящее время при изучении рецепторов у животных, растений и микроорганизмов. Мы рассмотрим здесь как теоретические предпосылки, так и конкретные практические рекомендации планирования, проведения опытов и анализа их результатов.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АФФИННОСТИ И КОНЦЕНТРАЦИИ РЕЦЕПТОРОВ

Исходя из простых уравнений (1) и (2), можно построить теоретические кривые дозовой зависимости связывания гормона с рецептором. В условиях равновесия в присутствии постоянной концентрации рецептора связывание гормона в линейных координатах описывается гиперболической функцией с асимптотой, определяемой общим количеством рецептора (рис. 3а). Сколько бы мы ни прибавляли гормона к фиксированному пулу рецептора, специфическое связывание гормона будет ограничено числом имеющихся гормон-связывающих сайтов (R_T). Чаще всего на одну молекулу рецепторного белка приходится один гормон-связывающий участок, поэтому положение асимптоты связывания обычно показывает общее количество рецепторов в пробе (рис. 3а).

Зная положение асимптоты, по кривым связывания гормона с рецептором можно определить также значение K_D . K_D выражается в единицах концентрации гормона и соответствует той его концентрации, при которой занятой оказывается ровно половина гормон-связывающих сайтов. На рис. 3а видно, как выглядит ход кривых связывания для гормонов, сродство которых к рецептору различается на порядок. Отметим, что представление кри-

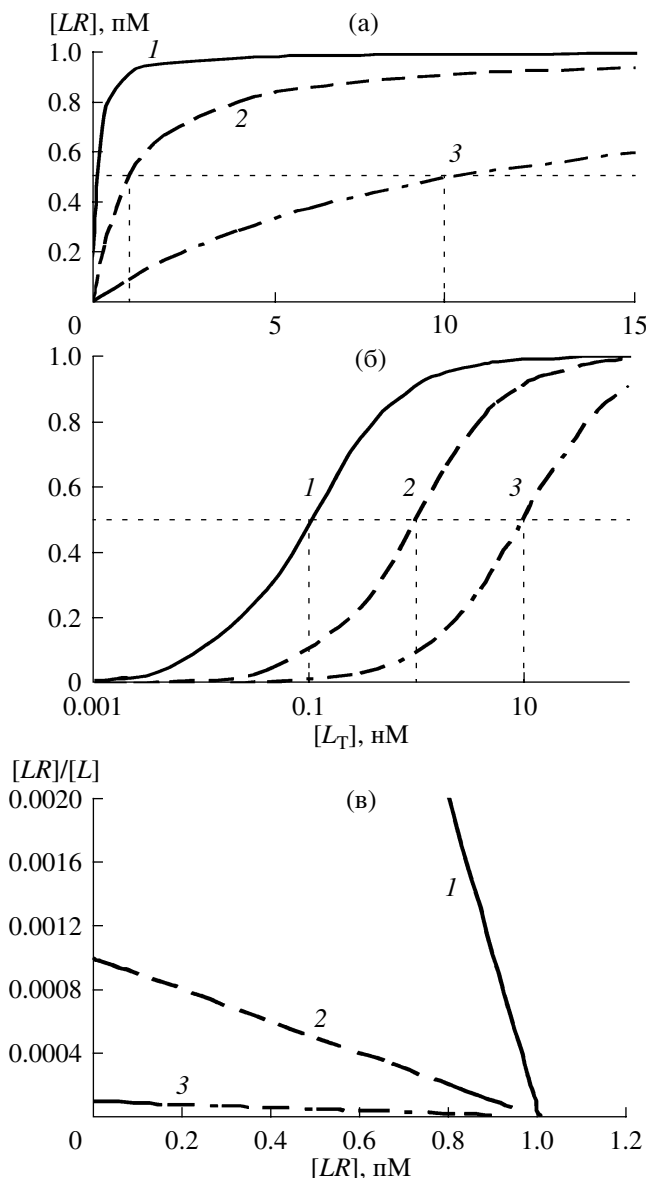


Рис. 3. Способы представления результатов анализа связывания гормона (лиганда) с рецептором.

Концентрационная зависимость образования гормон-рецепторных комплексов в линейных (а), полулогарифмических (б) координатах и в координатах Скэтчарда (в) [12]. Концентрация лиганд-рецепторных комплексов $[LR]$ зависит от K_D : для кривых 1–3 K_D равны соответственно 0.1, 1 и 10 нМ. Концентрация сайтов связывания лиганда принята за 1 пМ. $[L_T]$ – общая концентрация лиганда (гормона). Значения K_D соответствуют концентрации лиганда, при которой занято 50% связывающих сайтов (мелкий пунктир).

вых насыщения в линейных координатах не всегда удобно, так как обычно гормоны испытывают в концентрациях, различающихся на много порядков.

Более удобно и наглядно представлять концентрационные зависимости связывания в полулогарифмических координатах, где по оси абсцисс от-

ложены логарифмы концентраций гормонов. При этом кривые насыщения приобретают S-образную форму, где значение K_D находится в квазилинейной центральной области и соответствует точке перегиба кривой (рис. 3б). Однако и такое представление далеко не всегда дает возможность графического нахождения значений K_D и R_T . Определить эти параметры наиболее точно оказалось возможным при линеаризации кривой насыщения.

Задачу точного определения основных характеристик гормон-рецепторных взаимодействий на основе дозовых зависимостей связывания гормона теоретически решил в 1949 г. физико-химик Scatchard [12]. На основе простых преобразований уравнения (2) он вывел следующее уравнение:

$$\frac{1}{K_D}[R_T] - \frac{1}{K_D}[LR] = \frac{[LR]}{[L]}. \quad (3)$$

Уравнение (3) является линейным типа $y = ax + b$, если за y принять соотношение $[LR]/[L]$, а за x – величину $[LR]$. Зависимость в этих координатах (обычно называемых координатами Скэтчарда) имеет вид прямой с тангенсом угла наклона, равным $-1/K_D$, а место пересечения этой прямой с осью абсцисс соответствует общей концентрации рецепторов (занятых + свободных) $[R_T]$ (рис. 3в). Скэтчардовские координаты до сих пор широко используются для расчета параметров связывания и представления результатов экспериментов, хотя для той же цели в настоящее время имеется большое число специализированных компьютерных программ.

Для корректного определения равновесных характеристик гормон-рецепторного взаимодействия, независимо от системы вычислений, необходимо выполнение определенных условий:

- 1) широкий диапазон концентраций лиганда, включающих концентрации, во много раз превышающие концентрации рецепторов;
- 2) стабильное равновесие в пробах, где концентрация всех компонентов (связанного и свободного лиганда и рецептора) остается неизменной;
- 3) одинаковая доступность всех рецепторов для лиганда.

Однако даже при соблюдении всех необходимых условий на практике редко удается получить в координатах Скэтчарда линейную зависимость непосредственно по данным эксперимента. Поэтому следующие главы обзора посвящены объяснению того, как грамотно планировать и проводить эксперименты по связыванию гормонов с рецепторами (binding assays) и как рассчитывать параметры взаимодействия, несмотря на возможные отклонения от “классической” теоретической модели.

РАДИОЛИГАНДНЫЙ (РАДИОРЕЦЕПТОРНЫЙ) МЕТОД

Исходя из уравнения (3), для расчета характеристик взаимодействия гормон-рецептор необходимо знание концентрации в пробе лиганд-рецепторных комплексов $[LR]$ и соотношения концентраций LR и свободного лиганда L ($[LR]/[L]$). Для этой цели применяется радиолигандный метод, который является наиболее популярным методом исследования гормон-связывающих свойств рецепторов (иногда этот метод называют также радиорецепторным). Метод основан на использовании меченого гормона, что позволяет следить за количеством лиганд-рецепторных комплексов LR по количеству связанной метки. Зная количество помещенного в пробу меченого гормона, можно, если потребуется, без труда рассчитать и вторую переменную уравнения (3), а именно концентрацию свободного лиганда $[L]$. Однако в типичных случаях, когда концентрация добавленного в пробу лиганда (гормона) на несколько порядков превышает концентрацию рецепторов, вместо концентрации свободного лиганда $[L]$ вполне можно ставить общую концентрацию свободного лиганда $[L_T]$. В радиолигандных исследованиях обычно используют радиоактивные лиганды, выпускаемые в готовом виде различными биомедицинскими фирмами. Лиганды, как правило, меченные тритием (3H) или йодом (^{125}I), должны удовлетворять ряду требований. В частности, они должны обладать: 1) идентичностью немеченому двойнику по параметрам взаимодействия с рецептором; 2) высокой удельной радиоактивностью, желательно не ниже 750 ГБк/ммоль или 20 Ки/ммоль; 3) высоким сродством к рецептору, с константой диссоциации на уровне нМ или ниже; 4) высокой специфичностью связывания в отношении изучаемого рецептора; 5) высокой степенью чистоты (особенно радиохимической), причем метка не должна диссоциировать от лиганда в ходе эксперимента.

В принципе, вместо радиоактивной метки можно использовать иную метку, но при условии, что она не изменит биологическую активность лиганда и позволит его количественно обнаружить с высокой чувствительностью. Такой меткой может быть, например, флуоресцентная, позволяющая количественно определять уровень флуоресценции образца. Такие метки имеют преимущества по сравнению с радиоактивными, так как они более безопасны для человека и среды его обитания. Однако на практике чаще всего используют именно радиоактивные лиганды, поэтому мы рассмотрим проблему исследования гормон-рецепторного взаимодействия на примере радиолигандного метода. Необходимо подчеркнуть, что все основные подходы и закономерности радиолигандного метода полностью применимы и к случаям мечения лиганда иными способами.

Типичный радиолигандный (радиорецепторный) эксперимент состоит из 4 основных стадий:

I. инкубация образца с радиоактивным лигандом до достижения равновесия;

II. разделение свободной и связанной радиоактивности;

III. измерение количества связанной радиоактивности;

IV. математический, графический или компьютерный анализ результатов.

Остановимся на каждой из этих стадий подробнее.

Стадия I. Радиолигандные исследования традиционно проводят *in vitro* на объектах различной природы при температуре 0–4°C, 20–25°C или (реже) 37°C, что зависит от особенностей изучаемого рецептора [2; 13, с. 79–126; 14–18]. Растворимые ядерно-цитоплазматические рецепторы в составе цитозоля или (частично) очищенные инкубируют с гормоном в составе гомогенного раствора (иногда рецепторы иммобилизуют на аффинных матриксах, см. ниже). Для мембранных рецепторов требуется предварительное выделение соответствующих мембран. Далее с гормоном инкубируют суспензию выделенных мембран (микросом). В случае суспензий необходимо соблюдение условия гомогенности, иначе не все рецепторы будут одинаково доступны для гормонов. К счастью, кинетические скорости взаимодействия (ассоциации и диссоциации) гормонов с рецепторами достаточно высоки (равновесие обычно достигается в течение минут или десятков минут), в связи с чем микросомы не успевают заметно агрегировать в ходе инкубации. Иногда для анализа берут живые объекты, например, интактные клетки или срезы тканей.

В последние годы развивается метод связывания гормонов с микросегментами тканей (tissue segment binding method) [19], где для анализа используют маленькие кусочки живых тканей миллиметровых размеров в полноценном физиологическом растворе. В этом случае рецепторы находятся в условиях, близких к естественным, к тому же процедура существенно упрощается, так как не требуется предварительное фракционирование материала. Однако при этом не всегда возможно реализовать условие гомогенности инкубационной среды. Еще более существенным недостатком является то, что в ходе инкубации в живых клетках могут происходить процессы, влияющие на сами гормоны, рецепторы или их взаимодействие. К таким процессам относятся метаболизм и внутриклеточный транспорт меченого лиганда, протеолиз и/или интернализация рецептора и лиганд-рецепторного комплекса и другие. К тому же в клетке, как правило, присутствует несколько типов рецепторов к одному гормону, что затрудняет анализ свойств конкретного индивидуального рецептора. Еще одним недостатком гомологичных

живых систем является присутствие эндогенных гормонов, которые могут интерферировать с меченым лигандом при гормон-рецепторном взаимодействии и влиять на получаемые результаты.

Для того, чтобы обойти эти ограничения, недавно нами был предложен способ анализа гормон-связывающих свойств эукариотических рецепторов с использованием трансгенных бактерий, экспрессирующих индивидуальный рецепторный белок [20]. Бактерии не имеют ни аналогов большинства эукариотических гормонов, ни систем их синтеза или рецепции, что позволяет исключить влияние эндогенных аналогов на результаты опытов. Кроме того, при встраивании единственного целевого гена анализу подвергается конкретный индивидуальный рецепторный белок. Эукариотический рецептор, встроенный в бактериальную мембрану, обычно сохраняет полную функциональную активность, что можно проверять непосредственно на бактериальной тест-системе [21, 22]. В тех же случаях, когда для проявления биологической активности требуется определенная посттрансляционная модификация (гликозилирование, фосфорилирование и др.) рецептора, можно попробовать перенести в бактерию вместе с геном рецептора и ген модифицирующего фермента. Следует еще отметить, что используемая в опытах по связыванию суспензия бактерий достаточно гомогенна и ею можно манипулировать (переливать, аликвотировать, перемешивать), как истинным раствором.

Стадия II. Количественное определение связанного гормона является важнейшей частью эксперимента. Это определение можно проводить как с помощью равновесного диализа, так и физического разделения связанного и свободного гормона. Диализ проводят в перегородженной мембраной ячейке, в один отсек которой добавляют препарат рецептора, а в другой – меченый гормон. Затем инкубируют при постоянном вращении ячейки, а после достижения равновесия анализируют аликвоты из обоих отсеков. Этот способ является максимально равновесным и щадящим, однако требует длительного времени инкубации, специального оборудования и высокой точности счета радиоактивности. Физическое разделение более доступно, однако здесь важна особая тщательность исполнения. При выполнении этой операции необходимо соблюдение следующих условий:

1) разделение должно быть максимально щадящим и количественным, без взаимной контаминации фракций;

2) условия равновесия системы должны быть, по возможности, не нарушены, чтобы не вызвать дополнительной диссоциации лиганд-белковых комплексов.

Чаще всего при разделении связанной и свободной форм гормона используют методы центрифуги-

гирования или фильтрации. Суспензию микросом, клеток или фрагментов ткани можно осадить быстрым центрифугированием, тогда связанный меченый гормон окажется в осадке, а свободный – в надосадочной жидкости (супернатанте). Так как в ходе разделения все исходные компоненты остаются в контакте в том же объеме, сдвиг равновесия системы за время быстрого осаждения минимален. Для растворимых рецепторов отделение связанного гормона от свободного центрифугированием может быть достигнуто с помощью ряда приемов. Один из них – осаждение белков, в том числе связавших гормон, при их высаливании, например, высокими концентрациями сульфата аммония [23–26]. Осаждение белков может быть проведено и при добавлении к инкубационной смеси суспензии белок-связывающего сорбента, например, оксиапатита [23–27]. Во всех этих случаях связанный гормон переходит вместе с белком во фракцию осадка, а свободный остается в растворе (супернатанте). Альтернативной возможностью является применение активированного угля, способного необратимо сорбировать низкомолекулярные соединения (простые лиганды), но не белки [28; 29, с. 331–339; 30]. Кратковременное выдерживание инкубационного раствора с суспензией угля приводит к поглощению свободного гормона углем, тогда как связанный гормон остается в белковом растворе. Далее уголь с сорбированным гормоном осаждают, а измерение уровня связанного белками гормона проводят в аликвоте супернатанта.

Еще одним широко применяемым методом разделения свободного и связанного белком лиганда является мембранная фильтрация [14–18]. В настоящее время биомедицинские фирмы выпускают большой спектр различных типов мембранных фильтров, пригодных для задержки самых разных частиц, от микросом до целых эукариотических клеток. Но эти фильтры должны удовлетворять одному принципиальному условию: они не должны сорбировать меченый лиганд (L^*). Пропускание инкубационной суспензии через фильтр может быть проведено на специальной вакуумной установке очень быстро, всего за несколько секунд. При такой скорости гормон-рецепторные комплексы не успеют заметно диссоциировать. В результате весь связанный гормон задерживается на фильтре, к тому же, после высушивания фильтра его радиоактивность может быть непосредственно просчитана на сцинтилляционном счетчике.

Другие предложенные методы разделения свободного и связанного гормона, такие, как гель-фильтрация, ионообменная хроматография, электрофорез [29, с. 107–132], не получили широкого распространения из-за невозможности достижения равновесного состояния, т.е. из-за вероятности распада части комплексов.

Независимо от применяемого метода, всегда важно убедиться в том, что разделение фракций осуществляется строго количественно. Для этого ставят специальные контрольные пробы с инактивированным рецептором, с избытком немеченого лиганда, а также инструментально контролируют отсутствие микросом, клеток, угля или белка в супернатантах и/или фильтрах.

Развитие современных технологий рекомбинантных белков дало новые возможности для изучения гормон-рецепторных взаимодействий, в частности, для отделения гормон-рецепторных комплексов от несвязанного лиганда. При этом подходе методами генной инженерии объединяют кодирующую часть гена рецептора с последовательностью для пептида или полипептида, легко распознаваемых определенным сорбентом или антителом (affinity tag) [31, с. 124–132]. После или во время инкубации с гормоном такой рекомбинантный рецептор легко иммобилизовать с помощью аффинного матрикса или антител и определить количество связанного гормона. Важно только, чтобы “пришитые” к рецептору аффинные метки не влияли на гормон-связывающие свойства изучаемого рецептора.

Стадия III. Измерение радиоактивности связанного гормона проводят с помощью сцинтилляционного счетчика при добавлении соответствующей образцу сцинтилляционной жидкости, или, в случае ^{125}I , используют гамма-счетчик. Эффективность счета третины во много раз выше в гомогенном сцинтилляционном растворе, чем при анализе нерастворимых радиоактивных осадков. В этой связи, полезно экстрагировать радиоактивный гормон из осадков каким-либо элюентом, хорошо растворимым в сцинтилляционной жидкости и при этом мало влияющим на эффективность счета. Удачным примером такого растворителя для многих липофильных лигандов является этанол [20, 23–27]. Другим приемом достижения гомогенности при распределении радиоактивности является использование солюбилизаторов органических осадков, выпускаемых некоторыми биомедицинскими фирмами специально для сцинтилляционного счета. Ведь даже если лиганд сам по себе хорошо растворяется в сцинтилляционной жидкости, присутствие нерастворимой органической массы может сильно замедлить этот процесс и снизить общую эффективность счета. Для достижения большей точности необходимо подбирать длительность счета в зависимости от среднего уровня радиоактивности проб и соотношения радиоактивности в пробе и фоновой радиоактивности (сцинтиллятор с чистым растворителем). Уровень разброса величин оценивается с помощью независимых параллелей (повторностей), число которых должно быть достаточно для достижения средних значений с вероятным отклонением от среднего не более, чем на 3–5%. В связи с тем, что все важнейшие

параметры гормон-рецепторного взаимодействия (K_D , $[R_T]$) выражаются в единицах концентраций, желательно получать результаты счета в единицах dpm (распады/мин). Зная удельную радиоактивность лиганда, результаты в dpm легко пересчитать в величинах концентраций. В случае счета в единицах срт (импульсы/мин) необходимо определить эффективность счета в данных конкретных условиях.

Стадия IV. Как уже отмечалось, для определения параметров гормон-рецепторного взаимодействия проводят специальный анализ результатов радиоактивного счета. Для представления результатов опытов в координатах Скэтчарда необходимо для каждой пробы определить содержание связанного гормона и соотношение количества связанного гормона к количеству свободного. Концентрация связанного лиганда соответствует величине $[LR]$, а соотношение связанного и несвязанного гормона – соотношению $[LR]/[L]$ в формуле (3). Поэтому очень часто в исследованиях рецепторов гормонов формулу (3) записывают в виде

$$\frac{B}{U} = -\frac{1}{K_D}B + \frac{R_T}{K_D}. \quad (4)$$

Здесь B и U соответствуют концентрациям связанного и свободного (unbound) гормона, соответственно (иногда вместо U ставят символ F – free). Пример подобного представления показан на рис. 4 (кривая 1) [28]. В этом опыте определяли параметры связывания рецептором кортикостероидов печени крыс высокоочищенного синтетического глюкокортикоида, ^3H -дексаметазона. Видно, что в координатах Скэтчарда (B/U против B) кривая не линейна, а с перегибом на некотором расстоянии от оси абсцисс, и далее приближается к асимптоте, параллельной этой оси. Такой вид кривой в координатах Скэтчарда обычно указывает на присутствие сайтов неспецифического связывания лиганда, которые вносят свой вклад в величину измеряемой связанной радиоактивности.

Неспецифическое связывание. Экспериментальная практика показывает, что в опытах по связыванию меченые гормоны самой разной структуры связываются не только с рецепторами (специфическое связывание), но с некоторой вероятностью и с другими компонентами системы: белками, мембранами, фрагментами клеток, другими высокополимерными субстанциями, а также стенками пробирок (так называемое неспецифическое связывание). Это неспецифическое связывание бывает настолько значительным, что может быть принято неопытным исследователем за истинное связывание с рецептором. Однако специфический и неспецифический типы связывания обладают рядом отличительных свойств, что позволяет их четко дифференцировать.

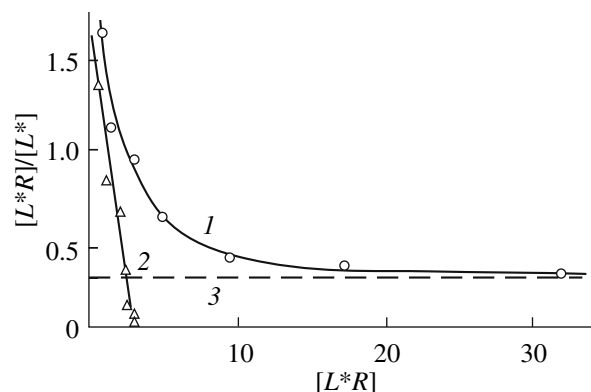


Рис. 4. Пример разложения в координатах Скэтчарда кривой общего связывания гормона на составляющие специфического и неспецифического связывания, согласно Rosenthal [32].

1 – кривая тотального связывания ^3H -дексаметазона в цитозоле печени крыс; 2 – специфическое связывание, 3 – неспецифическое связывание. $[L^*R]$ – концентрация связанного гормона (B), выраженная в молях $\times 10^{-13}/\text{мг}$ цитозольного белка; $[L^*]$ – концентрация несвязанного (свободного) гормона (U или F) (по [28]).

Число мест специфического связывания гормона с рецептором ограничено, а сродство гормона к рецептору очень высоко. При неспецифическом же связывании оказываются задействованы случайные сайты низкого сродства, число которых огромно. Если переписать уравнение (4) как $B/U = K_A (R_T - B)$, то в случае большого избытка концентрации сайтов связывания над концентрацией добавленного гормона (т.е. когда $R_T \gg L_T > B$) это равенство приобретает вид [13]:

$$\frac{B}{U} = K_A R_T. \quad (5)$$

На графике Скэтчарда зависимость (5) неспецифического связывания выражается прямой, параллельной оси абсцисс и пересекающей ось ординат в точке $K_A R_T$ (здесь R обозначает нерепеторные сайты).

В реальных условиях количественно оценить вклад неспецифического связывания возможно, если смешать радиоактивный гормон с большим избытком (100–10000-кратным) его немеченого двойника. Так как количество высокоаффинных рецепторных сайтов сравнительно мало, избыток немеченого гормона вытеснит практически весь меченый гормон из этих сайтов. С другой стороны, количество неспецифических сайтов очень велико, и добавленный в указанных пределах избыток немеченого гормона практически не скажется на величине неспецифического связывания меченого лиганда. Поэтому в экспериментальных пробах, где к меченому гормону добавлен большой избыток того же, но немеченого гормона, будет измеряться уровень именно неспецифического связывания.

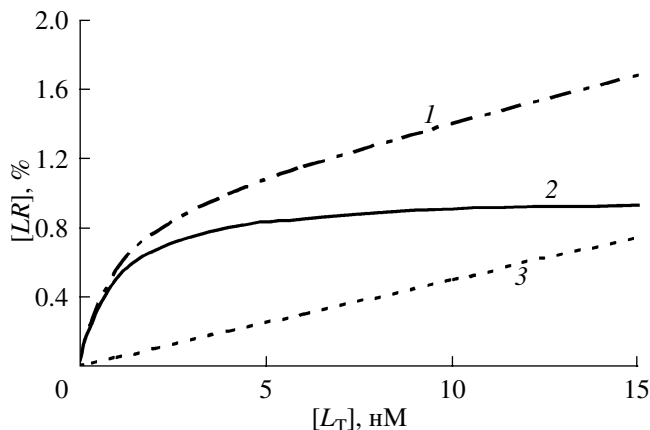


Рис. 5. Концентрационные зависимости связывания гормона при тотальном (1), специфическом (2) и неспецифическом (3) связывании.

[LR] — концентрация связанного гормона (B); [LT] — общая концентрация гормона.

Характер зависимостей уровней тотального, неспецифического и специфического связывания от дозы добавленного меченого гормона показан на рис. 5. Неспецифическое связывание линейно зависит от дозы гормона, тогда как кривая тотального связывания, хотя также растет, имеет явный изгиб, т.е. отклоняется от линейности. Общее связывание лиганда (B_T , кривая 1) складывается из специфического (B_S , кривая 2) и неспецифического (B_{NS} , кривая 3) типов связывания. Поэтому для того, чтобы определить величину специфического связывания, достаточно вычесть из общего связывания неспецифическое:

$$B_S = B_T - B_{NS}. \quad (6)$$

Вычет значений B_{NS} из величин B_T дает типичную гиперболическую кривую насыщения рецепторов гормоном (рис. 5, кривая 2), характерную для специфического связывания. Аналогично, если величины общего связывания B на рис. 4 заменить расчетными (теоретическими) величинами специфического связывания B_S , то вместо вогнутой кривой получится теоретически ожидаемая [12] прямая, по которой легко определить K_D и R_T (рис. 4, кривая 2). Такое преобразование зависимостей можно провести графически по методу Rosenthal [32] или аналитически. На практике для большей точности определения параметров гормон-рецепторного взаимодействия надо стараться минимизировать неспецифическое связывание. Желательно, чтобы его уровень не превышал 20–30% от тотального. Это можно сделать путем снижения дозы меченого гормона, так как с ее уменьшением доля неспецифического связывания от тотального падает (рис. 5). С другой стороны, уже сам факт достоверного различия между общим и неспецифическим связыванием прямо свидетель-

ствует о присутствии специфических сайтов связывания данного лиганда. Поэтому пилотные эксперименты по сравнению тотального и неспецифического связывания в однотипных пробах следует ставить в самом начале исследований гормон-рецепторного взаимодействия, чтобы убедиться в наличии высокоаффинных сайтов и корректности выбранного метода тестирования.

Рекомендации по постановке опытов. После того, как пилотные опыты покажут присутствие сайтов специфического связывания данного лиганда, необходимо установить время достижения равновесия в системе. На практике это время определяется по выходу уровня связанного гормона на безусловное плато. Следует учитывать, что скорость химических реакций зависит от концентраций взаимодействующих веществ, поэтому время достижения равновесия должно быть определено при минимальной используемой концентрации лиганда. При изучении дозовой зависимости связывания желательно, чтобы уровень максимального связывания (B_S) был в пределах от 1000 до 10000 dpm. Меньшие значения связывания могут не обеспечить требуемой точности счета, большие приведут к избыточному расходу радиоактивных изотопов и/или препарата рецептора. Достоверное определение параметров связывания требует испытания не менее 5–7 концентраций меченого лиганда (L^*), причем для каждой концентрации рекомендуется ставить по 4 параллели (повторности): 2 для тотального связывания и 2 для неспецифического. Впрочем, неспецифическое связывание, линейно зависящее от концентрации метки, можно измерять при меньшем числе концентраций (на практике достаточно трех–четырех). Одна из концентраций лиганда должна быть близка к ожидаемой K_D , при этом достигается максимальная точность анализа [9, 14]. Остальные концентрации должны составить последовательный ряд в обе стороны от K_D , где каждая последующая концентрация в 2–3 раза выше/ниже, чем предыдущая. Достаточно, чтобы крайние концентрации меченого лиганда отличались от K_D примерно на 1–1.5 порядка. Рецепторы же рекомендуется использовать в концентрации, по крайней мере, на порядок меньшей, чем K_D [33].

Выбор метода измерения связывания гормона во многом зависит от природы испытуемого материала. Для повышения чувствительности опытов по насыщению полезно следовать выработанным рекомендациям [9, 34]. Под чувствительностью радиолигандного анализа понимают наименьшую концентрацию немеченого лиганда $[L]_{\min}$, при которой измеряемое различие между общим связыванием и связыванием в присутствии немеченого лиганда еще статистически значимо. Расчеты показали, что чувствительность возрастает с (1) уменьшением ошибки определения радиоактивности; (2) уменьшением величины $[L^*]/K_D$, следова-

тельно, целесообразно проводить радиорецепторные исследования при относительно низких концентрациях меченого гормона; (3) уменьшением уровня неспецифического связывания; (4) увеличением объема реакционной смеси, что ограничивает постановку опытов в сверхмалых объемах. Чувствительность также прямо пропорциональна сродству немеченого лиганда к рецептору, поэтому связывание желательно проводить в условиях, оптимальных для связывания лиганда.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НЕСКОЛЬКИХ ЛИГАНДОВ С ОДНИМ САЙТОМ. КОНКУРЕНТНОЕ СВЯЗЫВАНИЕ

Ранее мы отмечали, что лигандная специфичность связывания является одной из важнейших характеристик рецептора. Анализ лигандной специфичности дает представление о том, какие из структурно близких природных соединений выполняют функции гормонов в данной системе восприятия сигнала. Конечно, каждое из испытуемых соединений можно попытаться пометить радиоактивным изотопом и провести тестирование, аналогичное описанному выше. Однако такой подход был бы слишком затратным как финансово, так и экологически; к тому же не все соединения доступны в виде меченых форм. В настоящее время практикуется иная стратегия, а именно анализ вытеснения радиомеченого гормона из комплекса с рецептором немечеными лигандами.

Предположим, что тест-система содержит два лиганда, один из которых – меченый, а второй – нет. Если эти лиганды конкурируют за один и тот же сайт связывания и количество лигандов больше, чем рецепторов, то в присутствии второго лиганда уровень связывания меченого лиганда будет ниже, так как второй лиганд замещает первый в комплексе с рецептором. Можно охарактеризовать дозовую зависимость вытеснения метки, если провести эксперимент по связыванию при фиксированной концентрации первого лиганда в присутствии различных концентраций немеченого лиганда (рис. 6). Очевидно, что чем больше сродство к рецепторам немеченого лиганда (гормона), тем при более низких концентрациях этот лиганд будет замещать меченый. Следовательно, кривые вытеснения для более аффинных лигандов будут смещены в область меньших концентраций конкурента по сравнению с аналогичными кривыми для низкоаффинных лигандов. Эксперименты этого типа называются конкурентными; они позволяют оценивать сродство к рецепторам различных немеченых лигандов по концентрационной зависимости вытеснения ими меченого гормона.

Для количественной оценки сродства проводят анализ кривых вытеснения меченого лиганда немечеными. На основе этих кривых определяют концентрацию немеченого гормона, при которой

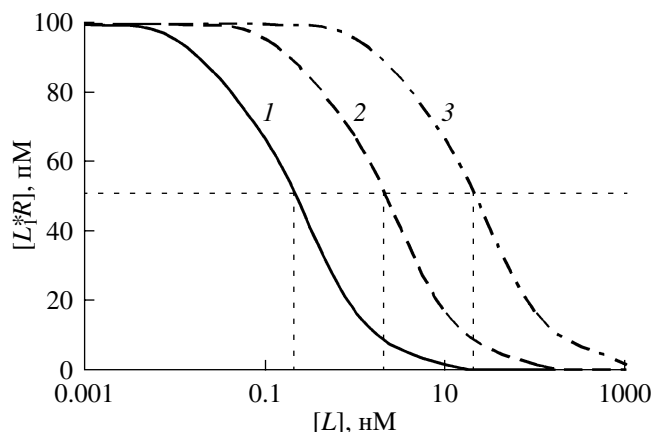


Рис. 6. Кривые вытеснения фиксированной концентрации меченого гормона различными концентрациями немеченых гормонов, различающихся по сродству к рецептору.

Величины K_D для кривых 1–3 соответствуют 0.1, 1 и 10 нМ. Концентрация лиганд-связывающих сайтов принята за 0.01 нМ, концентрация меченого гормона – за 0.1 нМ. $[L^*R]$ – концентрация связанного рецептором меченого гормона; $[L]$ – концентрация немеченого гормона. По оси ординат отложена доля рецепторов, связанных с меченым гормоном. Мелким пунктиром обозначены IC_{50} .

вытесняется ровно половина меченого гормона (IC_{50} , рис. 6). Для достаточно точной оценки IC_{50} важно, чтобы на квазилинейный центральный участок кривой конкуренции немеченого лиганда (интервал от ~25% до ~75% вытеснения) приходилось бы, по крайней мере, 3 концентрационные точки. Удобно определять IC_{50} при logit-преобразовании оси ординат, при этом большая часть конкурентной кривой спрямляется. Концентрацию радиоактивного лиганда подбирают таким образом, чтобы она примерно соответствовала или была меньше его K_D с рецептором, но так, чтобы обеспечить достоверность при счете метки. В конкурентных опытах обязательно включают пробы для неспецифического связывания, чтобы отсечь фон связанной радиоактивности, не относящийся к взаимодействию с рецептором. Все операции эксперимента (инкубация до достижения равновесия, разделение связанного и свободного гормонов, счет радиоактивности связанного гормона) проводят так же, как в опытах по насыщению. Константа ингибирования K_I немеченого лиганда, соответствующая его K_D взаимодействия с рецептором, определяется по формуле [35]:

$$K_I = K_D = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L^*]_0}{K_D}}. \quad (7)$$

Здесь $[L^*]_0$ и K_D^* обозначают соответственно фиксированную концентрацию меченого лиганда

и его сродство к рецептору. Если $[L^*]_0$ много меньше K_D^* , тогда K_I становится примерно равной IC_{50} и часто называется *кажущейся* константой ингибирования или диссоциации (*apparent binding constant*). Если $[L^*]_0$ в точности равна K_D^* , тогда величина K_I равна половине значения IC_{50} . Для корректности расчетов K_I по формуле (7) важно, чтобы конкурентный анализ проводили в тех же условиях (состав среды, температура, время), в каких была определена K_D^* .

Еще более простой способ определения K_I основан на том, что соотношение IC_{50} (или, в общем случае, IC_N) для различных лигандов соответствует соотношению констант их сродства к рецептору. В связи с этим, полезно в конкурентных опытах определять кривую вытеснения для немеченого двойника меченого лиганда. Как правило, введение радиоактивной метки в молекулу гормона заметно не влияет на параметры его взаимодействия с рецептором. Поэтому, если значение K_D^* ранее было известно из опытов по насыщению, рассчитать K_D любого конкурентного лиганда можно по отношению его IC_{50} к IC_{50} для немеченого двойника радиолганда. Однако знание даже исходного значения K_D^* при такой постановке необязательно, так как его можно определить непосредственно по кривой вытеснения меченого гормона немеченым гомологом. Для этого анализ связывания проводят в координатах Скэтчарда. Значения B/U по оси ординат (точнее, B_S/U) определяют, исходя из соотношений для меченого лиганда за вычетом неспецифического связывания. Брать в расчет при этом суммарное количество лиганда в инкубационной смеси необязательно, так как соотношение B/U по метке равно соотношению B/U для общего количества того же лиганда. Но для значений концентрации связанного лиганда B_S (ось абсцисс) необходимо вычислить именно его суммарное количество, т.е. сумму меченого и немеченого. Ориентиром служит количество специфически связанной метки, которое умножается на коэффициент, равный отношению в пробе немеченого гормона к меченому.

Условием корректности расчета констант по соотношению значений IC_{50} является относительно низкий уровень связанной радиоактивности (не более 20% в отсутствие конкурента) по отношению к тотальной метке [36]. При правильной постановке опыта и адекватных вычислениях в координатах Скэтчарда получается прямая с параметрами, близкими к тем, какие могут быть установлены в опытах по насыщению радиолганда.

Предложены и другие способы определения характеристик связывания немеченого лиганда на основе вытеснения меченого гормона из ком-

плекса с рецептором [7–9, 37], однако в связи с большей сложностью представления и анализа они не нашли широкого применения.

Выше был рассмотрен случай, когда все лиганды взаимодействуют с одним сайтом конкретного рецепторного белка. Этот случай наиболее типичен, однако в принципе и в реальности разные лиганды могут взаимодействовать с различными участками рецептора. Поэтому выделяют три возможных типа связывания пары лигандов [9]: 1) конкурентное связывание, когда оба лиганда связываются с одним и тем же сайтом на рецепторе; 2) неконкурентное связывание, когда лиганды связываются с различными сайтами на одном и том же белке; 3) бесконкурентное связывание, когда лиганд второго типа взаимодействует не с рецепторами, а с комплексами, образованными лигандом первого типа с рецептором (наиболее редкий тип).

Чтобы дифференцировать типы связывания разных лигандов и доказать, например, именно конкурентный характер связывания в изучаемой тест-системе, проводят равновесные опыты с меченым и немечеными лигандами. Получают несколько кривых насыщения для меченого лиганда, одна из которых – обычная кривая насыщения; в остальных случаях опыты ставят аналогично с той лишь разницей, что в растворе присутствует определенная постоянная концентрация немеченого лиганда. Используемые постоянные концентрации должны заметно (на 25–80%), но не полностью вытеснять меченый лиганд. Связывание анализируют в двойных обратных координатах $1/[LR]$ и $1/L$.

Принцип анализа можно рассмотреть на примере конкурентного связывания. В условиях равновесия при отсутствии конкурента концентрация лиганд-рецепторных комплексов описывается следующим уравнением:

$$[LR] = \frac{[L][R_T]}{[L] + K_D}. \quad (8)$$

От уравнения (8) легко перейти к уравнению для величины $1/[LR]$, которое записывается следующим образом:

$$\frac{1}{[LR]} = \frac{1}{[R_T]} + \frac{1}{[L]} \frac{K_D}{[R_T]}. \quad (9)$$

Видно, что эта зависимость в координатах $1/[LR]$ и $1/[L]$ является линейной. В присутствии немеченого лиганда количество лиганд-рецепторных комплексов с меченым гормоном описывается следующим уравнением:

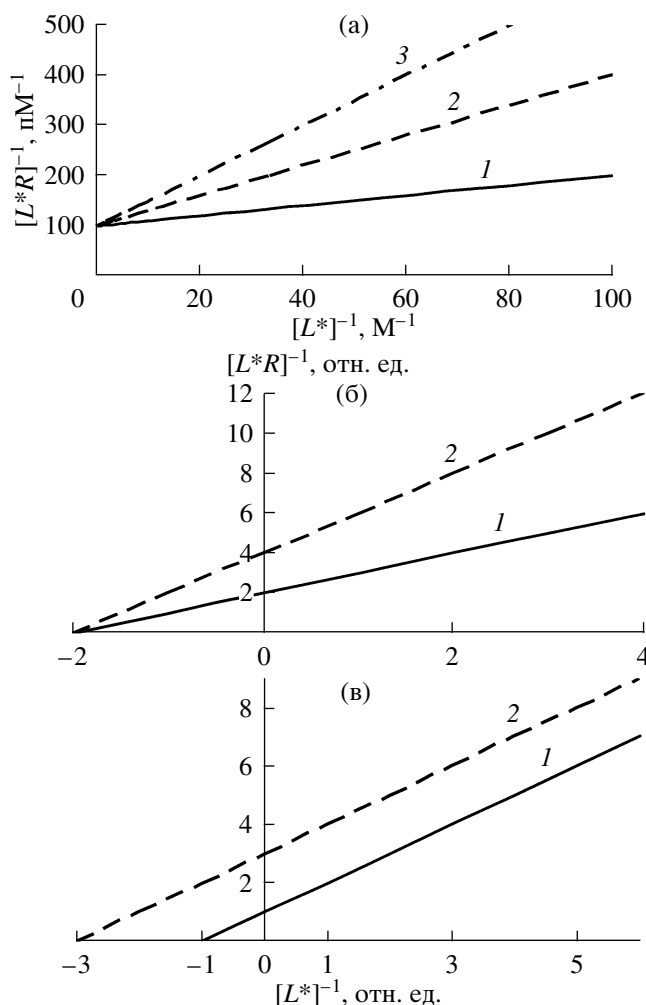


Рис. 7. Примеры опытов, представленных в двойных обратных координатах, по связыванию меченого гормона в присутствии немеченого гормона иной структуры.

а – конкурентное связывание. Концентрации немеченого гормона: 0, 0.2 и 0.4 нМ, соответствуют прямым 1–3; K_D комплекса меченого гормона с рецептором равна 0.1 нМ; концентрация лиганд-связывающих сайтов равна 0.01 пМ; б – неконкурентное связывание без изменения аффинности. 1 – в отсутствие и 2 – в присутствии немеченого гормона; в – бесконкурентное связывание. 1 – в отсутствие и 2 – в присутствии немеченого гормона. $[L^*R]^{-1}$ и $[L^*]^{-1}$ – величины, обратные концентрации связанного с рецептором и несвязанного меченого гормона.

$$[L^*R] = \frac{[L^*][R_T]}{[L^*] + K_D \left(\frac{1 + [L]_0}{K_D} \right)}, \quad (10)$$

где L – концентрация немеченого гормона, K_D – его константа диссоциации. Величина $1/[L^*R]$ описывается уравнением:

$$\frac{1}{[L^*R]} = \frac{1}{[R_T]} + \frac{1}{[L^*]} \frac{K_D \left(1 + \frac{[L]_0}{K_D} \right)}{[R_T]}, \quad (11)$$

где $1 + [L]_0/K_D$ – это константа. В отсутствие немеченого гормона эта величина равна 1, и уравнение

(11) сводится к уравнению (9). Следовательно, в присутствии немеченого гормона зависимость в обратных координатах описывается также прямой линией, но с большим тангенсом угла наклона ($K_D(1 + [L]_0/K_D)/[R_T]$) по сравнению с тангенсом в отсутствие немеченого гормона ($K_D/[R_T]$).

Из уравнения (11) видно, что при условии $1/[L^*] = 0$ получим $1/[L^*R] = 1/[R_T]$. Следовательно, конкурентные прямые, полученные в присутствии или в отсутствие изучаемого немеченого лиганда, должны пересекаться в одной точке на оси ординат (рис. 7а). Если прямые не пересекаются на оси ординат, общее число доступных сайтов для меченого лиганда в присутствии немеченого как бы уменьшается, и, таким образом, связывание кон-

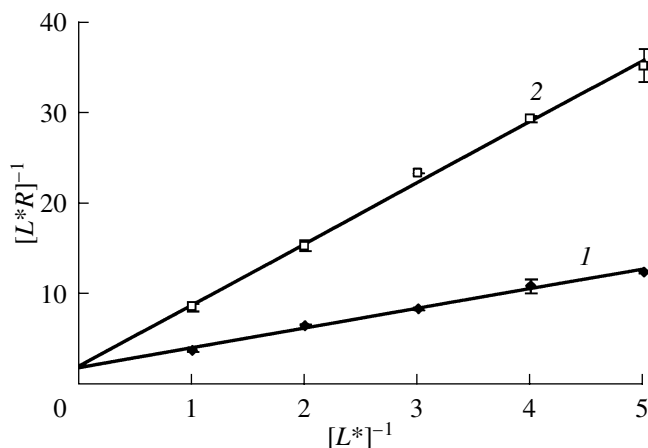


Рис. 8. Концентрационная зависимость связывания меченого тритием *транс*-зеатина рецептором цитокининов АНК4, представленная в двойных обратных координатах [38].

1 – в отсутствие и 2 – в присутствии 26 нМ тидиазурана. $[L^* R]^{-1}$ и $[L^*]^{-1}$ – величины, обратные концентрации соответственно связанного и несвязанного меченого *транс*-зеатина (L соответствует tZ по [38]).

курентным не является. При этом могут наблюдаться различные типы поведения прямых. Если связывание второго лиганда влияет на аффинность первого, то прямые пересекают ось абсцисс в разных местах, если нет – они пересекаются на оси абсцисс в одной точке (рис. 7б). В случае бесконкурентного связывания прямые идут параллельно друг другу (рис. 7в) [9]. В принципе, в обратных координатах можно также определять аффинность рецептора и количество сайтов связывания гормона, однако для этих целей они применяются редко из-за более высокой ошибки среднего при расчете обратных величин.

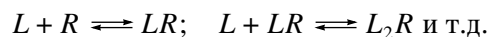
Приводим пример практического использования обратных координат. Тидиазурон является синтетическим цитокинином, резко отличающимся по структуре от природных фитогормонов этого класса (зеатина и др.). Для выяснения типа гормон-рецепторного взаимодействия для этой пары лигандов были проведены опыты по связыванию меченого *транс*-зеатина рецепторами цитокининов в присутствии (2) и отсутствии (1) тидиазурана (рис. 8, [38]). На графике обратных величин видно, что прямые пересекаются на оси ординат, и это свидетельствует о конкуренции *транс*-зеатина и тидиазурана за один и тот же сайт на рецепторе.

БОЛЕЕ СЛОЖНЫЕ ВАРИАНТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГОРМОНА С РЕЦЕПТОРАМИ

Случается, что зависимость связывания меченого лиганда в координатах Скэтчарда нелинейна, несмотря на идеальную постановку эксперимента и анализ результатов. Причиной таких отклонений может быть более сложный процесс гормон-

рецепторного взаимодействия. Если график Скэтчарда изгибается вниз (рис. 9а), это может означать наличие двух или более сайтов связывания гормона с различной аффинностью на одном рецепторе, либо наличие двух или более рецепторов. К такой кривой можно теоретически провести несколько условных асимптот, соответственно количеству различных сайтов связывания [9]. Две асимптоты на рис. 9а соответствуют двум сайтам связывания. Тангенс угла наклона асимптоты левой части кривой равен $-1/K_{D1} - 1/K_{D2}$, а точка пересечения с осью абсцисс соответствует $[R_{T1}]$. Тангенс угла наклона асимптоты правой части кривой соответствует $-1/K_{D2}$, а точка пересечения с осью абсцисс соответствует $[R_{T1}] + [R_{T2}]$. Более строго определить параметры каждого взаимодействия можно по методу Rosenthal [32] или с помощью компьютерных программ.

Однако подобного рода явление может вызываться и другими причинами. Представим себе, что поливалентный рецептор последовательно присоединяет лиганды по схеме:



Начальное связывание лигандов с рецептором может увеличивать (положительная кооперативность), либо снижать (отрицательная кооперативность) аффинность взаимодействия с ним последующих лигандов. В случае отрицательной кооперативности скэтчардовская кривая изогнута вниз (как и в случае наличия двух сайтов связывания), а в случае положительной кооперативности – вверх. Возникает проблема дискриминации случаев отрицательной кооперативности и нали-

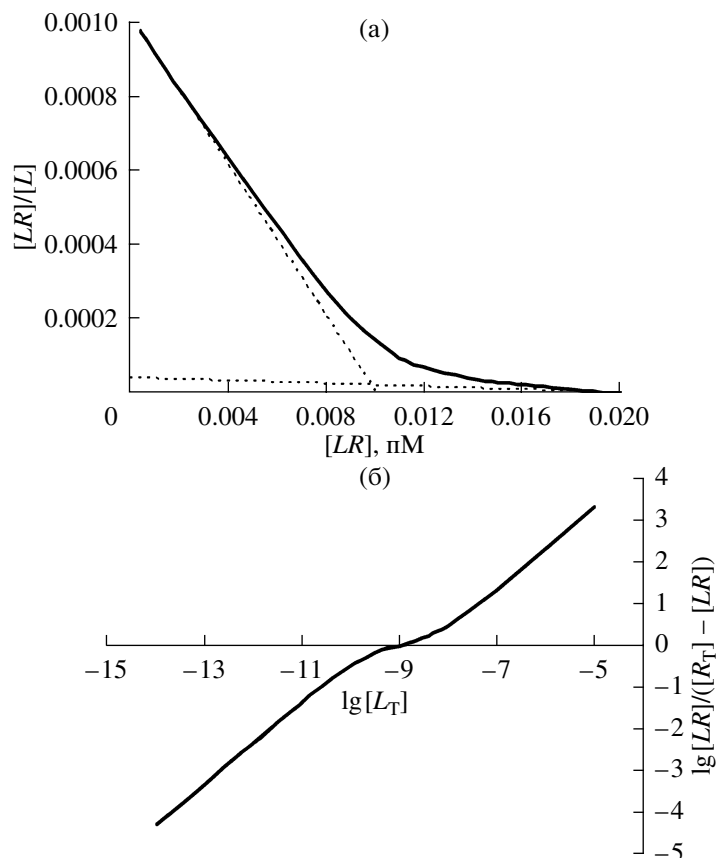
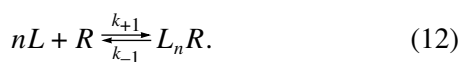


Рис. 9. Пример связывания гормона двумя рецепторными сайтами разной аффинности ($K_{D1} = 0.1$ нМ, $K_{D2} = 5$ нМ). а – данные по связыванию, представленные в координатах Скэтчарда. $[LR]$ ($[B]$) и $[L]$ ($[F]$) – концентрации связанного и несвязанного гормона, соответственно. Пунктиром обозначены асимптоты ветвей графика; б – данные по связыванию, представленные в координатах Хилла [39]. $[LR]$ ($[B]$) – концентрация связанного гормона, $[R_T]$ – концентрация лиганд-связывающих сайтов, $[L_T]$ – общая концентрация гормона.

чия несколько типов связывающих мест. Для этого существуют специальные методы анализа.

Первый из них представляет собой обработку результатов по связыванию в координатах Хилла (Hill, [39]), которая позволяет определить знак и степень кооперативности. Степень кооперативности показывает, во сколько раз увеличивается (или уменьшается) константа сродства для последующих лигандов по сравнению с начальным связыванием. Рассматривая систему с выраженной положительной кооперативностью, Hill представил взаимодействие поливалентного рецептора с лигандом в виде:



Для этой схемы уравнение для K_D записывается следующим образом:

$$K_D = \frac{[L]_n([R_T] - [L_nR])}{[L_nR]}. \quad (13)$$

После логарифмирования выражения (13) получаем следующую зависимость:

$$\lg \frac{[L_nR]}{[R_T] - [L_nR]} = n \lg [L] - \lg K_D. \quad (14)$$

График в координатах $\lg([L_nR]/[R_T] - [L_nR])$ и $\lg[L]$ (уравнение 14) представляет собой прямую линию с тангенсом угла наклона (n), отражающим степень кажущейся кооперативности (γ) (рис. 10). Значения $\gamma > 1$ свидетельствуют о положительной кооперативности, а $\gamma < 1$ – об отрицательной [9]. Если $\gamma \approx 1$, то заметная кооперативность отсутствует. Точка пересечения прямой с осью абсцисс соответствует $\lg K_D$. При этом для случая двухсайтового связывания прямая образу-

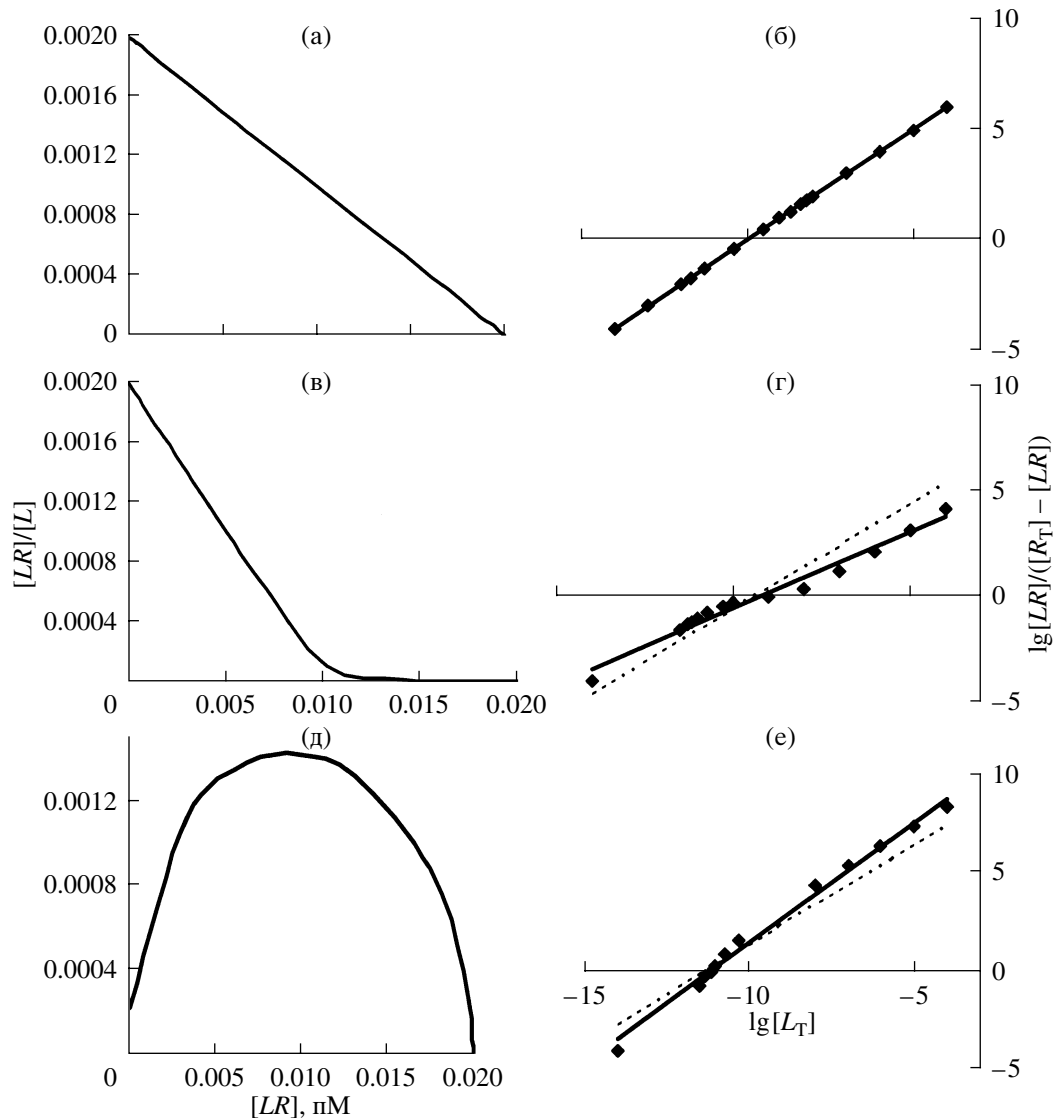


Рис. 10. Влияние кооперативности на связывание гормона рецептором.

а, б – в отсутствие кооперативности, в, г – при отрицательной кооперативности ($K_{D1} = 0.1$ нМ, $K_{D2} = 7$ нМ); д, е – при положительной кооперативности ($K_{D1} = 0.1$ нМ, $K_{D2} = 0.5$ пМ). а, в, д – результаты представлены в координатах Скэтчарда; б, г, е – результаты представлены в координатах Хилла. Обозначения, как на рис. 9. Пунктиром на (г) и (е) обозначена зависимость при отсутствии кооперативности.

ет некоторый перегиб у оси абсцисс (рис. 9б). На рис. 11 представлены данные по связыванию *транс*-зеатина рецептором цитокининов в координатах Хилла. Видно, что $\gamma \approx 1$, указывая на отсутствие какой-либо заметной кооперативности в этом взаимодействии.

Сделать выбор между отрицательной кооперативностью и наличием нескольких сайтов с различным сродством можно с помощью преобразования координат методом Бьеррума [9]. Так же, как и в предыдущих случаях, анализируются результаты опыта по насыщению рецептора лигандом. При условии равновесия в системе кон-

центрация лиганд-рецепторных комплексов описывается уравнением (8),

$$\text{откуда } \frac{[LR]}{[R_T]} = \frac{[L]}{K_D + [L]} = y \text{ и } K_D = \frac{[L](1-y)}{y}.$$

Логарифмируя данное выражение, приходим к следующему уравнению:

$$-\lg [L] = -\lg K_D + \lg \frac{1-y}{y}. \quad (15)$$

График строится в координатах y ; $\lg [L]$. Это нелинейная зависимость, а количество перегибов кривой в координатах Бьеррума соответствует количеству типов мест связывания в системе (рис. 12).

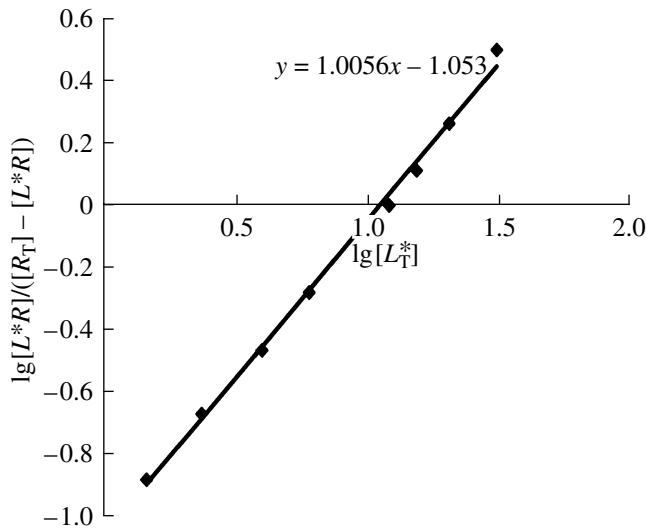


Рис. 11. Данные по связыванию меченого *транс*-зеатина рецептором цитокининов АНК4 в координатах Хилла.

$[L^*R]$ – концентрация связанного гормона, $[R_T]$ – концентрация лиганд-связывающих сайтов, $[L_T^*]$ – общая концентрация гормона. Приведена математическая функция, аппроксимирующая данную зависимость ($r = 0.9965$).

Абсцисса точки перегиба кривой соответствует $\lg K_D$. Этот метод позволяет идентифицировать два или более сайта связывания лиганда с рецептором, однако лишь в том случае, если различия констант достаточно велики (более, чем в 500 раз), а различия концентраций сайтов связывания – наоборот, малы (менее, чем в десять раз).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современная методология анализа гормон-рецепторного взаимодействия достаточно развита в теоретическом и практическом плане [1, 2, 7–9, 11–18, 32–37, 39–42], что открывает хорошие перспективы для изучения восприятия гормональных сигналов рецепторами эукариотических клеток. Настоящий краткий методический обзор дает теоретические основы и практические рекомендации для определения базовых характеристик взаимодействия лигандов с рецепторами, таких, как специфическое связывание, тип взаимодействия, константа сродства, количество рецепторов, лигандная специфичность.

Примерным алгоритмом для выполнения базового исследования может быть следующий. Проводят пилотный эксперимент по определению наличия/отсутствия специфического связывания в системе. В случае наличия специфического связывания делают попытки оптимизации его тестирования как путем подбора условий взаимодей-

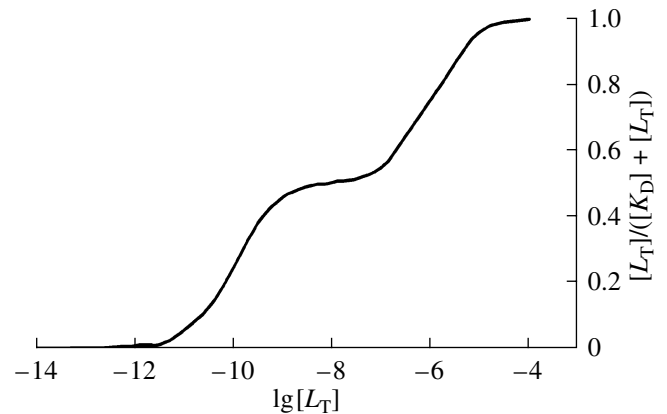


Рис. 12. Пример связывания гормона двумя рецепторными сайтами разной аффинности ($K_{D1} = 0.1$ нМ, $K_{D2} = 1$ мкМ), представленного в координатах Бьеррума [9]. $[L_T]$ – общая концентрация гормона.

ствия рецептора с гормоном, так и отделения образовавшихся гормон-рецепторных комплексов. Далее ставят кинетический эксперимент, по результатам которого определяют время установления равновесия в системе. Затем в условиях равновесия строят кривую насыщения рецептора гормоном. Результаты анализируют в координатах Скэтчарда. Если зависимость близка к линейной, то предполагают простой механизм “лиганд – один сайт связывания”. Это дает возможность прямого расчета K_D и количества сайтов связывания. Если зависимость отклоняется от прямой линии, то проводят анализ в координатах Хилла и Бьеррума. В случае изгиба кривой на графике Скэтчарда вниз и тангенс угла наклона графика в координатах Хилла, равном единице, делают вывод о наличии двух или более сайтов связывания с различным сродством. Если различие аффинности сайтов велико, проявится также перегиб кривой зависимости в координатах Бьеррума. Если для изогнутой вниз кривой в скэтчардовских координатах тангенс угла наклона в координатах Хилла оказывается меньше единицы, делают вывод об отрицательной кооперативности. Когда кривая в координатах Скэтчарда изгибается вверх, а тангенс угла наклона зависимости в координатах Хилла больше единицы – это однозначно указывает на положительную кооперативность. Определив тип и характер взаимодействия с рецептором меченого лиганда, можно затем провести опыты с его немечеными аналогами, структурными и/или функциональными, для определения лигандной специфичности рецептора. Анализ вытеснения меченого лиганда его немеченым гомологом позволит подтвердить или уточнить константу сродства, полученную ранее в опытах по насыщению. Вид кривых вытеснения и представление данных в системе обратных координат дадут необходимую информацию для определения типа взаимодействия меченого и немеченого лигандов на ре-

цепторе. В целом, результаты всей совокупности вышеописанных опытов дадут возможность достаточно полно и точно охарактеризовать взаимодействие изучаемого рецептора с его лигандами.

Безусловно, данная область знания в настоящее время настолько обширна, что не может быть полностью охвачена одной журнальной статьей. Поэтому мы намеренно не затрагивали, например, вопросы кинетических исследований, более сложных моделей взаимодействия лиганд–рецептор, иных графических форм анализа результатов, влияния на связывание эффекторов типа G-белков, особых типов взаимодействия агонистов и антагонистов и т.д. Эти более частные вопросы анализируются в специальной литературе, приводимой в списке ссылок [1, 2, 7–9, 11–18, 32–37, 39–42]. Кроме того, в последние годы активно развиваются новые методы физического анализа взаимодействующих макро- и молекул, такие, как позитронная томография (positron emission tomography), высокоэффективный анализ (high-throughput assay) с использованием биочипов (microarray), поверхностный плазмонный резонанс (surface plasmon resonance) и другие. Надо надеяться, что в ближайшие годы эти методы послужат хорошим дополнением или более безопасной и удобной заменой техники эксперимента, описанной нами. Однако, как бы ни развивалась методология тестирования взаимодействия гормона с рецептором, основные закономерности этого взаимодействия, рассмотренные нами на примере радиолигандного метода, сохраняют свое значение и в будущих исследованиях.

Выражаем благодарность проф. А.Н. Смирнову за конструктивный анализ обзора и ценные замечания.

Работа поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований (№№ 04-04-49120, 07-04-00331 и 07-04-91211-ЯФ).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cuatrecasas P. Criteria for and Pitfalls in the Identification of Receptors // *Adv. Cyclic Nucl. Res.* 1975. V. 5. P. 79–89.
2. Взаимодействие гормонов с рецепторами / Под ред. Леви Д.С. М.: изд-во Мир, 1979. 432 с.
3. Романов Г.А. Гормон-связывающие белки растений и проблема рецепции фитогормонов // *Физиология растений*. 1989. Т. 36. С. 166–177.
4. Романов Г.А. Рецепторы фитогормонов // *Физиология растений*. 2002. Т. 49. С. 615–625.
5. Смирнов А.Н. Элементы эндокринной регуляции. М: ГЭОТАР-Медиа, 2006. 351 с.
6. Langley J.N. On the Physiology of the Salivary Secretion. II. On the Mutual Antagonism of Atropine and Pilocarpin, Having Especial Reference to Their Relations in the Sub-Maximally Gland of the Cat // *J. Physiol.* 1878. V. 1. P. 339–369.
7. Галактионов С.Г., Голубович В.П., Шендерович М.Д., Ахрем А.А. Введение в теорию рецепторов. Минск: Наука и техника, 1986. 200 с.
8. Сергеев П.В., Шимановский Н.Л. Рецепторы физиологически активных веществ. М.: Медицина, 1987. 400 с.
9. Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. Биокинетика: Практический курс. М.: ФАИР-ПРЕСС, 1999. 716 с.
10. Gomperts B.D., Kramer I.M., Tatham P.E.R. Signal Transduction. San Diego: Academic, 2003. 426 p.
11. Варфоломеев С.Д., Зайцев С.В. Кинетические методы в биохимических исследованиях. М.: изд-во МГУ, 1982. 344 с.
12. Scatchard G. The Attraction of Protein for Small Molecules and Ions // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1949. V. 51. P. 660–672.
13. Розен В.Б., Смирнов А.Н. Рецепторы и стероидные гормоны. М.: изд-во МГУ, 1981. 312 с.
14. Bylund D.B., Yamamura K. Methods for Receptor Binding // *Methods in Neurotransmitter Receptor Analysis* / Eds Yamamura K. et al. New York: Raven Press, 1990. P. 1–35.
15. Receptor Biochemistry – a Practical Approach / Ed. Hulme E.C. Oxford: IRL Press. 1990. 326 p.
16. Bylund D.B., Toews M.L. Radioligand Binding Methods – Practical Guide and Tips // *Am. J. Physiol.* 1993. V. 265. P. L421–L429.
17. McKinney J. Practical Aspects of Radioligand Binding // *Current Protocols in Pharmacology* / Eds Enna S.J., Williams M. New York: John Wiley and Sons, 1998. P. 1.3.1–1.3.33.
18. Kenakin T. P. Pharmacologic Analysis of Drug-Receptor Interaction. New York: Raven Press, 1993. 483 p.
19. Muramatsu I., Tanaka T., Suzuki F., Li Z., Hiraizumi-Hiraoka Y., Anisuzzaman A.S.M., Yamamoto H., Horinouchi T., Morishima S. Quantifying Receptor Properties: The Tissue Segment Binding Method – a Powerful Tool for the Pharmacome Analysis of Native Receptors // *J. Pharmacol.* 2005. V. 98. P. 331–339.
20. Romanov G.A., Spichal L., Lomin S., Strnad M., Schmülling T. A Live Cell Hormone-Binding Assay on Transgenic Bacteria Expressing a Eukaryotic Receptor Protein // *Anal. Biochem.* 2005. V. 347. P. 129–134.
21. Yamada H., Suzuki T., Terada K., Takei K., Ishikawa K., Miwa K., Yamashino T., Mizuno T. The Arabidopsis AHK4 Histidine Kinase Is a Cytokinin-Binding Receptor That Transduces Cytokinin Signals Across the Membrane // *Plant Cell Physiol.* 2001. V. 42. P. 1017–1023.
22. Spichal L., Rakova N.Y., Riefler M., Mizuno T., Romanov G.A., Strnad M., Schmülling T. Two Cytokinin Receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, Differ in Their Ligand Specificity in a Bacterial Assay // *Plant Cell Physiol.* 2004. V. 45. P. 1299–1305.
23. Романова Н.А., Романов Г.А., Розен В.Б., Ванюшин Б.Ф. Характеристика взаимодействия дексаметазон-рецепторных комплексов печени крыс с ДНК // *Биохимия*. 1979. Т. 44. С. 529–542.
24. Romanov G.A., Vanyushin B.F. Cytosol Induces Apparent Selectivity of Glucocorticoid Receptor Binding to Nucleic Acids of Different Secondary Structure // *Biochim. Biophys. Acta.* 1982. V. 699. P. 53–59.

25. Романов Г.А., Горскова В.А. Очистка и сравнительное изучение свойств глюкокортикоид- и эстроген-рецепторных комплексов печени крыс // Биохимия. 1984. Т. 49. С. 3–11.
26. Romanov G.A., Taran V.Ya., Venis M.A. Cytokinin-Binding Protein from Maize Shoots // J. Plant Physiol. 1990. V. 136. P. 208–212.
27. Романов Г.А., Романова Н.А., Розен В.Б., Ванюшин Б.Ф. Глюкокортикоид-рецепторные комплексы печени крыс. I. Кинетические и равновесные параметры взаимодействия с ДНК: влияние ионной силы и температуры // Молекуляр. биология. 1981. Т. 15. С. 601–612.
28. Романов Г.А., Соколова Н.А., Розен В.Б., Ванюшин Б.Ф. Взаимодействие дексаметазон-рецепторных комплексов с ядрами печени крыс и с ДНК // Биохимия. 1976. Т. 41. С. 2140–2149.
29. Чард Т. Радиоиммунологические методы. М.: Мир, 1981. 246 с.
30. Большой практикум по физиологии человека и животных / Под ред. Кудряшова Б.А. М.: Высш. шк., 1984.
31. Патрушев Л.И. Искусственные генетические системы. Т. 1. М.: Наука, 2004. 527 с.
32. Rosenthal H.E. A Graphic Method for the Determination and Presentation of Binding Parameters in a Complex Systems // Anal. Biochem. 1967. V. 20. P. 525–532.
33. Chang K.J., Jacobs S., Cuatrecasas P. Quantitative Aspects of Hormone-Receptor Interactions of High Affinity. Effect of Receptor Concentration and Measurement of Dissociation Constants of Labeled and Unlabeled Hormones // Biochim. Biophys. Acta. 1975. V. 406. P. 294–303.
34. Зайцев С.В., Сергеева М.Г., Варфоломеев С.Д. Радиорецепторный анализ: теоретические основы метода // Биоорг. химия. 1985. Т. 11. С. 370–379.
35. Cheng Y.C., Prusoff W.H. Relationship between the Inhibitor Constant (K_i) and the Concentration of Inhibitor which Causes 50% Inhibition of an Enzymatic Reaction // Biochem. Pharmacol. Med. 1973. V. 22. P. 3099–3108.
36. Blondeau J.-P., Rocher P., Robel P. Competitive Inhibition of Specific Steroid-Protein Binding: Practical Use of Relative Ratios for the Derivation of Equilibrium Inhibition Constants // Steroids. 1978. V. 32. P. 563–575.
37. Dixon M. The Determination of the Enzyme Inhibitor Constants // Biochem. J. 1957. V. 55. P. 170–171.
38. Romanov G.A., Lomin S.N., Schmölling T. Biochemical Characteristics and Ligand-Binding Properties of *Arabidopsis* Cytokinin Receptor AHK3 Compared to CRE1/AHK4 as Revealed by a Direct Binding Assay // J. Exp. Bot. 2006. V. 57. P. 4051–4058.
39. Hill A.V. The Possible Effects of the Aggregation of the Molecules of Hemoglobin on Its Oxygen Dissociation Curve // J. Physiol. 1910. V. 40. P. IV–VII.
40. Receptor Classification / Eds. Trist D.G., Humphrey P.P.A., Leff P., Shankley N.P. New York: New York Acad. Sci., 1997. 244 p.
41. Гуревич К.Г. Определение равновесных и кинетических констант при изменении концентрации лиганда за счет лиганд-рецепторного взаимодействия // Биохимия. 1997. Т. 62. С. 1221–1224.
42. Bylund D.B., Murrin L.C. Radioligand Saturation Binding Experiments over Large Concentration Ranges // Life Sci. 2000. V. 67. P. 2897–2911.