

УДК 577.176.6; 577.354.9; 577.112.4

**СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ
β-АДРЕНЕРГИЧЕСКИХ РЕЦЕПТОРОВ**

ВОЕЙКОВ В. Л.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

В обзоре рассмотрены современные представления о молекулярном строении β-адренергических рецепторов. Обсуждается роль отдельных аминокислотных остатков и участков первичной последовательности этих белков в их функционировании: способности специфично связывать лиганды и передавать сигнал о взаимодействии с агонистом на сопряженный G-белок. Приведены данные о молекулярных механизмах десенситизации рецепторов.

Эффекты, индуцируемые адреналином и норадреналином в нервных клетках и клетках периферических тканей, опосредуются адренергическими рецепторами (АР). Еще в 1948 г. Ahlquist, исходя из эффективности действия адреналина и норадреналина на различные ткани, разделял АР на 2 класса: α-адренергические, на которые норадреналин действует эффективнее, чем адреналин, и β-адренергические, эффективнее взаимодействующие с адреналином [1]. Позднее более тщательный фармакологический анализ позволил разделить основные типы АР, по меньшей мере, на 2 подтипа: α₁/α₂ [2] и β₁/β₂ [3]. Некоторые лиганды обладают выраженной селективностью в отношении α₁- или α₂-рецепторов. Например, сродство у α₁-рецепторов к празозину в 1000—10 000 раз выше, чем у α₂-рецепторов [4], а йохимбин гораздо эффективнее блокирует локализованные в основном пресинаптически α₁-рецепторы, чем постсинаптические α₂-рецепторы [5]. Подтипы адренорецепторов β₁ и β₂ различаются по характеру сродства к агонистам в ряду: изопротеренол > норадреналин = адреналин (для β₁-АР) и изопротеренол > адреналин > норадреналин (для β₂-АР) [3].

АР относятся к обширному семейству рецепторных молекул, которые передают в клетку сигнал о взаимодействии с ними агониста через GTP-связывающие белки (G-белки). Процесс трансмембранной передачи сигнала в этом случае имеет характерный сценарий, первым этапом которого является связывание агониста со специфическим рецептором, находящимся в плазматической мембране клетки. Активированный агонистом рецептор взаимодействует с соответствующим G-белком и вызывает на нем обмен GDP на GTP в нуклеотидсвязы-

вающем центре, GTP-связанная форма G-белка диссоциирует из комплекса с рецептором и активирует эффекторный белок, модулируя тем самым внутриклеточный уровень «вторичного посланника» [6].

Различные подтипы AP передают в клетки разные сигналы. Так, β_1 - и β_2 -AP взаимодействуют с G_s -белком, который передает активирующий сигнал на аденилатциклазу. α_2 -AP ингибирует аденилатциклазу через другой GTP-связывающий G-белок (G_i). α_2 -AP может также стимулировать Na^+/H^+ -канал [7], однако G-белок, участвующий в этом процессе, точно неизвестен. α_1 -AP активирует фосфолипазу C через пока еще плохо охарактеризованный G-белок и, в конечном итоге, обеспечивает кальциевую регуляцию внутриклеточных процессов [8].

Таким образом, AP, как и любые другие рецепторные молекулы, выполняют 2 основные функции: дискриминирующую и транслирующую. Подтипы AP способны различать как лиганды—адреналин и норадреналин, так и G-белки. При взаимодействии с агонистом они транслируют сигнал об этом на G-белок. Сигнал передается и в обратную сторону: при связывании GTP с G-белком, находящимся в комплексе с рецептором, сродство последнего к агонисту снижается [9]. Известны и другие механизмы регуляции активности рецепторов, главным из которых является десенситизация, то есть потеря чувствительности рецептора к взаимодействующему с ним агонисту.

Все эти функции детерминированы в структуре рецепторов. В последнее время, благодаря успехам в клонировании генов многочисленных сопряженных с G-белками рецепторов (а таких молекул насчитывается в настоящее время более 50), удалось выявить общие черты и отличия в их строении. Конструирование мутантных и химерных генов рецепторов, их экспрессия в культивируемых животных клетках позволила локализовать отдельные участки молекул AP, отвечающие за выполнение ими перечисленных выше функций.

Топография адренергических рецепторов

Первичная последовательность β_2 -AP была определена в 1986 г. на основе расшифрованной в лаборатории Р. Лефковича структуры гена этого рецептора, выделенного из геномного банка хомяка [10]. При анализе профиля гидрофильности-гидрофобности молекулы было предсказано, что полипептидная цепь рецептора имеет 7 участков длиной 20—25 аминокислотных остатков, которые, вероятно, образуют трансмембранные α -спирали. Предполагаемые трансмембранные домены разделяются 8-ью гидрофильными последовательностями к которым относятся локализованные по разные стороны мембраны N-концевой и C-концевой фрагменты, а также 6 петель, 3 из которых расположены по одну, а 3—по другую сторону мембраны. Модель укладки β_2 -AP в мембране оказалась аналогичной модели укладки бактериородопсина [11], а также зрительного родопсина [12]. Более

того, выявилась значительная гомология между молекулами β_2 -АР и родопсин, а также наличие β_2 -АР консенсусной для гликозилирования последовательности вблизи от N-конца молекулы. На основании всех этих данных было высказано предположение, что N-конец β_2 -АР экопонирован на внеклеточной стороне мембраны, а С-конец обращен в цитоплазму. Схема организации β_2 -АР в мембране представлена на рисунке.

Позднее были получены экспериментальные доказательства такой модели укладки β_2 -АР. Dohlman и соавт. [13], используя ограниченный протеолиз β_2 -АР из легких хомяка, находящегося в искусст-

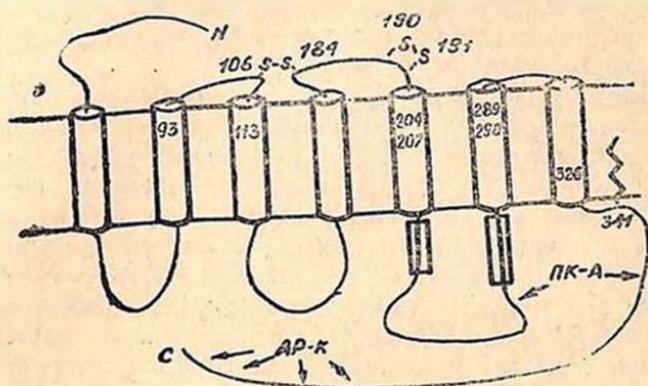


Рис. Схема организации β_2 -адренергического рецептора человека. Цифрами отмечены аминокислотные остатки, участвующие в связывании лиганда. Участки третьей цитоплазматической петли, ответственные за взаимодействие с G-белком заключены в прямоугольники. ПК-А—протеникиназа А, АР-К—киназа β -адренергического рецептора. Стрелками указаны места локализации фосфорилируемых остатков. 341—пальмитолированный остаток Cys-341

венной и естественной мембранах, подтвердили, что β_2 -АР имеет характерную «родопсиноподобную» структуру, включая расположение пронизывающих мембрану районов, а также области гликозилирования на внеклеточном N-концевом домене. Как известно, β_2 -АР являются субстратами различных протеникиназ, и фосфорилирование рецепторов играет важную роль в их функционировании (см. ниже). Было показано, что фосфоэпептиды β_2 -АР локализованы также на участках рецептора, обращенных в цитоплазму [13]. Предсказанная укладка β_2 -АР в мембранах была независимо подтверждена и с использованием специфических кроличьих антител к II синтетическим пептидам для каждой из гидрофильных последовательностей β_2 -АР хомяка [14].

Доступность нуклеотидной последовательности к ДНК β_2 -АР хомяка открыла широкие возможности для молекулярного клонирования других адренорецепторов. За 1—2 года были определены первичные структуры α_1 -АР, α_2 -АР, β_1 -АР и β_2 -АР из других объектов

[15—17], M_1 — M_4 -мускариновых холинэргических рецепторов [18—21], серотониновых рецепторов 5-НТ—1а и 5-НТ—1с [22, 23], рецептора субстанции К [24], продукта гена *mas*, который, как выяснилось позднее, является ангиотензиновым рецептором [25, 26].

Стало очевидным, что β_2 -АР являются членами большого семейства рецепторных белков, осуществляющих свои функции через G-белки [27]. Эксперименты по перекрестной гибридизации с уже клонированными генами рецепторов или их фрагментами во многих случаях выявляют существование неизвестных ранее подтипов рецепторов. Например, обнаружены по крайней мере 4 новых подтипа мускариновых рецепторов и 3 подтипа α_2 -АР, трудно отличимых фармакологически от известных белков [21, 28].

Как уже отмечалось ранее, аминокислотные последовательности β_2 -АР и родосина имеют значительные области гомологии. Однако примеры консерватизма отдельных участков структуры характерны для всего семейства белков, сопряженных с G-белками. При сравнении аминокислотных последовательностей различных рецепторов выяснилось, что при среднем уровне гомологии 45—50% сходство первичных структур мембранных участков у адренергических и родственных им рецепторов достигает 70—85%. Из гидрофильных петель наиболее консервативны первая и вторая цитоплазматические петли. Внеклеточные домены, третья цитоплазматическая петля и С-концевая область являются наиболее вариабельными участками рецепторов [29].

Интересные корреляции обнаружены между размерами третьей цитоплазматической петли и С-концевой области с функциями рецепторов. Все β -АР (напомним, что они взаимодействуют с G_s -белками) имеют достаточно короткую третью петлю (54—57 аминокислотных остатка) и длинную С-концевую область (84—137 аминокислотных остатка). В то же время все рецепторы, взаимодействующие с G_i -подобными белками, имеют длинную третью петлю (151—181 аминокислотных остатка) и короткую С-концевую область (21—39 аминокислотных остатка). Возможно, что эти особенности могут помочь при определении природы клонированных неизвестных рецепторов и подсказать вероятный механизм их действия [27].

Участки связывания лигандов

Лиганды АР—гидрофильные молекулы, поэтому можно было предположить, что лигандсвязывающий центр рецептора локализован во внеклеточном домене рецептора. Однако протеолитическое удаление внеклеточных участков рецептора не препятствует связыванию лигандов [30, 31]. В то же время направленные точечные мутации аминокислотных остатков в трансмембранных областях существенно влияют на лигандсвязывающие свойства рецепторов.

Адренергические лиганды содержат протонированную аминогруппу. Было логично предположить, что центр связывания лигандов рецептора должен содержать кислые аминокислотные остатки, необ-

ходимые для взаимодействия с аминокруппой лиганда. Действительно, было показано, что замена Asp-113 на Asp приводит практически к полной потере рецепторами способности связывать как агонисты, так и антагонисты [32]. С другой стороны, мутации по остаткам Asp-79 и Asp-318 приводят к резкому ухудшению сродства β_2 -АР к агонистам без изменения сродства к антагонистам [33]. При этом было также показано, что ни одна из этих замен не влияла на характер встраивания белка в плазматическую мембрану и на способность рецептора гликозилироваться. Замена Asp-113 на остаток Glu незначительно меняет геометрию лигандсвязывающего «кармана», однако приводит к тому, что классические антагонисты β_2 -АР, альпренолол и пропранолол, начинают частично активировать рецептор. При этом сродство мутантного рецептора к агонистам снижается на 2—4 порядка [32]. Интересно отметить, что остаток Asp-113 консервативен и у других рецепторов биогенных аминов: α -АР, муокарниновых, дофаминовых и серотониновых рецепторов, но отсутствует у сходных с ними рецепторов вещества К и ангиотензина [34].

Анализируя структуры известных адренергических лигандов, Main и соавт. предположили, что в лигандсвязывающих центрах адренергических рецепторов должны присутствовать аминокислотные остатки, способные стабилизировать ароматическое кольцо катехоламинов [35]. На эту роль были выбраны несколько консервативных для сопряженных с G-белками рецепторов остатков Ser и Thr, гидроксильные группы которых могут образовывать водородные связи с гидроксильными группами катехоламинов. Было показано, что замены Ser-204 и Ser-207 в пятой трансмембранной спирали и Ser-319 в седьмой трансмембранной спирали влияют на связывание агонистов. Параметры их связывания при этом не изменяются [36]. Эффекты замены остатков Ser-204 и Ser-207 на связывание агонистов воспроизводились, если анализировали связывание с рецепторами дикого типа лигандов с удаленными гидроксильными группами в *n*- и *m*-положениях соответственно. Эти данные свидетельствуют о том, что указанные остатки Ser участвуют в образовании водородных связей с гидроксильными группами катехола. Выяснилось также, что особая роль во взаимодействии с ароматическими кольцами лигандов принадлежит остаткам гидрофобных аминокислот Phe-289, Phe-290 в шестой спирали и Tyr-326 в седьмой трансмембранной спирали. Их мутации значительно снижают способность рецепторов связывать агонисты. Кроме того, с использованием фотоактивируемого антагониста β_2 -АР *n*-(бромацетатамидо)бензил-1-[¹²⁵I]-йодокаразолола было показано, что и вторая трансмембранная спираль приближена к карману, в который погружается лиганд. При засвечивании препарата фотоактивируемый антагонист ковалентно взаимодействует с остатком His-93 β_2 -АР [13, 27].

Следовательно, для связывания лиганда существенны аминокислотные остатки, входящие во второй, третий, пятый, шестой и седьмой трансмембранные домены. Вероятно, для формирования лигандсвязыва-

вающего «кармана» они должны быть характерным образом сближены друг с другом. Однако для связывания лигандов необходимы не только аминокислотные остатки, локализованные в трансмембранных сегментах рецептора. При замене одного из двух рядом расположенных во второй внеклеточной петле остатка Cys-190 и Cys-191 на остаток Ser резко снижается сродство β_2 -АР к агонистам и антагонистам, а при замене обоих остатков β_2 -АР теряет способность связывать лиганд [37]. Недавно с использованием другого подхода эти данные были не только подтверждены, но и дополнены. Оказалось, что дитиотреитол выступает в роли «конкурентного» ингибитора связывания агонистов с β_2 -АР [38]. Это может свидетельствовать о том, что дисульфидные связи принимают участие в формировании связывающего центра рецептора. Поскольку эффект дитиотреитола носил двухфазный характер, сделан вывод, что для связывания лиганда требуется целостность двух дисульфидных связей. Помимо S-S-мостика между Cys-190 и Cys-191 в β_2 -АР имеется дисульфидный мостик между Cys-106 (С-конец первой внеклеточной петли) и Cys-184 (середина второй внеклеточной петли) [39]. Интересно отметить, что все эти остатки Cys высоко консервативны у очень многих сопряженных с G-белками рецепторов.

Как уже отмечалось, фармакологические различия между β_1 -АР и β_2 -АР сводятся к тому, что β_2 -АР более эффективно взаимодействует с адреналином, чем с норадреналином. При фармакологическом анализе химерных рецепторов, у которых часть полипептидной цепи отвечала структуре β_1 -АР, а часть — β_2 -АР, было установлено, что химерная молекула, в которой β_1 -АР принадлежали только трансмембранные спирали 4 и 5, обладала специфичностью β_1 -АР. Менее существенные замены трансмембранных спиральных участков и отдельные аминокислотные замены у β_2 -АР не меняли его фармакологической специфичности [39], из чего можно заключить, что фармакологическая специфичность β -АР определяется не отдельными аминокислотными остатками, а общей конформацией рецептора, на которую влияют аминокислотные последовательности, входящие в состав 4- и 5-й трансмембранных спиралей.

Участки взаимодействия с G-белками

Поскольку G-белки не являются интегральными трансмембранными белками и относительно гидрофильны [6], с ними, вероятнее всего, контактируют обращенные в цитоплазму участки рецепторов. Из экспериментов по реконструкции очищенных рецепторов с G-белками, известно, что многие, если не все рецепторы, способны взаимодействовать не с одним, а с несколькими видами G-белков, хотя и с разной эффективностью [40, 41]. Очевидно, специфичность взаимодействия определяется не консервативными участками цитоплазматических областей структуры рецепторов, как, впрочем и других ре-

цепей этого семейства, являются первые две цитоплазматические петли, а наиболее вариабельна третья цитоплазматическая петля.

Действительно, Dixon и соавт. путем создания делеций в третьей цитоплазматической петле β_2 -АР хомяка обнаружили, что мутантные β_2 -АР с делециями остатков 222—229 и 258—270 не способны активировать аденилатциклазу [31, 42], то есть взаимодействовать с G_s -белками. Интересно, то мутант с делецией фрагмента 230—257 не теряет своей активности.

Такие же выводы были сделаны на основании экспериментов с химерными АР, часть полипептидной цепи которых принадлежала взаимодействующему с G_s -белком β_2 -АР, а часть—взаимодействующему с G_i -белком α_2 -АР [43]. Химера, у которой третья цитоплазматическая петля и шестой трансмембранный домен принадлежали β_2 -АР, а остальная структура— α_2 -АР, связывала агонисты α_2 -АР, но активировала аденилатциклазу, то есть взаимодействовала не с G_i , а с G_s -белком. Если третья цитоплазматическая петля играет важную роль в обеспечении специфичности, то прочность связывания, как было показано O' Douc и соавт., определяется второй цитоплазматической петлей и консервативным остатком Cys-341 [44]. Позже выяснилось, что Cys-341 молекулы β_2 -АР модифицирован остатком пальмитиновой кислоты, который дополнительно закрепляет С-концевой домен рецептора в мембране. Направленная замена Cys-341 на остаток Gly или Ala нарушает способность рецептора активировать аденилатциклазу [45].

Подробности молекулярного механизма активации рецептором G-белка остаются пока неясными. Появление новых подходов к решению этой проблемы вызвало открытие уникального действия на клетки мастопарана 14-членного пептида из яда осы, который способен, подобно рецепторам, активировать некоторые G-белки. При этом гомологи мастопарана с известными рецепторами обнаружено не было [46, 47]. Было показано, что мастопаран особенно эффективно взаимодействует с G-белками, встроенными в фосфолипидные везикулы. Он не только увеличивает связывание G-белком негидролизуемого аналога GTP, гуанозин-5-(γ -тио) трифосфата, гидролиз GTP, ускоряет GTP-GDP обмен, но и препятствует ADP-рибозилированию G-белка коклюшным токсином [48]. На поверхности раздела липид-вода мастопаран сворачивается в амфипатическую спираль. Интересно, что N- и С-концевые участки третьей цитоплазматической петли адренорецепторов, согласно расчетам, также имеют α -спиральную структуру с аналогичным (но не идентичным) расположением заряженных аминокислотных остатков [39].

Способность мастопарана стимулировать G-белки показывает, во-первых, что центр, участвующий в активации G-белка, может быть ограниченной частью, состоящим из 15—20 аминокислотных остатков, и, во-вторых, что в принципе для активации G-белка важна определенная пространственная конформация, а аминокислотный состав при этом является вторичным фактором и может значительно варьиро-

вать. Однако совсем недавно было показано, что точечные консервативные замены в одном из этих важных для активации G-белка участков рецептора оказывают существенное влияние на эффективность стимуляции рецептором G-белка. Так, консервативные замены Ala-293 на Leu и Lys-290 на His в C-концевом фрагменте 3-й цитоплазматической петли α_1 -АР приводит к увеличению потенции норадреналина в стимуляции фосфолипазы C на 2 порядка [48]. Дополнительные сведения о роли этого участка во взаимодействии G-белка с рецепторами были получены при изучении свойств мутанта β_2 -АР с deletion в нем 7 аминокислотных остатков (267—273) [49]. Этот мутантный рецептор значительно слабее активировал аденилатциклазу, чем нативный, но не отличался от нативного по прочности взаимодействия с G-белком. Это выражалось в способности рецептора образовывать высокоаффинный тройной комплекс агонист-рецептор-G-белок. Следовательно, для физического сопряжения рецептора с G-белком и для его активации рецептором требуются различные молекулярные детерминанты рецептора.

Регуляция активности адренергических рецепторов

Адренергические рецепторы, служащие регуляторами клеточной активности, сами подвергаются регуляции со стороны клетки. Система трансмембранной передачи сигнала является каталитической с громадным коэффициентом усиления. В роли катализатора выступают все ее компоненты; при взаимодействии одной молекулы гормона с молекулой рецептора последний способен активировать до 20 молекул G-белков, каждая α -субъединица G-белка способна существенно увеличить активность аденилатциклазы, которая активно продуцирует сАМР до тех пор, пока GTP не будет гидролизован α -субъединицей до GDP [6]. В некоторых клетках уровень сАМР после нескольких секунд воздействия гормона возрастает до 400 раз по сравнению с исходным [50]. Клетка не может в течение длительного времени выдержать такого «давления» регуляторного сигнала, и в процессе эволюции появилось несколько механизмов, позволяющих ей отключаться от воздействия внешнего биорегулятора. Потеря клеткой способности реагировать на гормональные сигналы называется «десенситизацией» или «десенсбилизацией» [51].

Различают две формы десенсбилизации: гомологичную и гетерологичную. Гомологичная, или агонист-специфичная, десенсбилизация проявляется в уменьшении клеточного ответа только на десенсбилизирующий гормон, тогда как другие гормоны сохраняют способность действовать на клетку [52]. При гетерологичной, или агонист-неспецифичной, десенсбилизации клетка теряет чувствительность к целому ряду агонистов, взаимодействующих с разными рецепторами [53]. У многих клеток процесс десенсбилизации является двухэтапным. Например, через 5—30 мин после начала инкубации клеток астроциты с изопротеренолом чувствительность аденилатциклазы к агонистам β_2 -АР в их мембранах снижается на 50—60%. Количество ре-

цепторов на поверхности клетки при этом не меняется. Этот этап обратим: через 20 мин после удаления агониста из среды все свойства аденилатциклазной системы восстанавливаются. После 2—6 ч инкубации клеток с изопротеренолом содержание рецепторов на клеточной мембране снижается на 80%, и в такой же степени падает чувствительность аденилатциклазы к стимуляции. В этом случае свойства аденилатциклазной системы восстанавливаются лишь в результате синтеза и включения в мембрану новых молекул рецепторов [54].

Одной из основных молекулярных мишеней десенситизации являются рецепторы гормонов и нейромедиаторов. Рецепторы, выделенные из десенситизированных клеток, при реконструкции с G-белками не активировали их при добавлении агониста [55]. Было обнаружено, что эти рецепторы, в отличие от нативных, обладающих биологической активностью, фосфорилированы. AP являются субстратами различных протеникиназ. В серии работ, выполненных в лаборатории Р. Лефковича, было убедительно показано, что основной причиной гетерологичной десенситизации β_2 -AP является их фосфорилирование сАМР-зависимой протеникиназой (протеникиназой А) [56—58]. Эти результаты были получены, в основном, на клетках эритроцитов птиц. При активации аденилатциклазы в этих клетках различными гормонами или негормональным путем—за счет действия на клетки форсколина или проникающих аналогов сАМР происходило фосфорилирование их β -AP по остаткам серина и треонина (2—3 моля фосфата на 1 моль рецептора), и рецепторы теряли способность взаимодействовать с G-белками.

Участки фосфорилирования β_2 -AP протеникиназой А локализованы в С-концевой области 3-й цитоплазматической петли и в проксимальной части С-концевого «хвоста» рецептора, где содержатся консенсусные последовательности для фосфорилирования протеникиназой А: Arg-Arg-Ser-Ser [59]. Как было указано выше, оба места атаки протеникиназой А локализованы вблизи места взаимодействия β_2 -AP с G_s -белком. Мутантный β_2 -AP, у которых в консенсусном участке остатки Ser были заменены на Ala, не фосфорилировались при увеличении в клетках уровня сАМР и десенситизировались медленнее и менее полно, чем нативный [60]. Однако эти мутации не препятствовали быстрой интернализации β_2 -AP.

Протеникиназа С также фосфорилирует β_2 -AP *in vitro*, хотя и в меньшей степени, чем протеникиназа А [61]. Обработка интактных клеток форболовыми эфирами, которые активируют протеникиназу С, вызывает фосфорилирование и десенситизацию β_2 -AP [62, 63]. Это свидетельствует о том, что протеникиназа С, которая активируется в клетке диацилглицерином и Ca^{2+} , также может участвовать в фосфорилировании и гетерологичной десенситизации β_2 -AP.

Гомологичная десенситизация β_2 -AP также связана с их фосфорилированием [64]. Однако этот процесс катализируется не протеникиназой А. В частности, в мутантных линиях клеток лимфомы S49 штамма сус⁻, дефектных по G-белку, или штамма kin⁻, дефект-

ном по протеникиназе А, агонист индуцирует фосфорилирование рецептора [65]. Это свидетельствовало о присутствии в клетках особой формы протеникиназы, фосфорилирующей β_2 -АР. Такой фермент, названный киназой β -АР (β -АРК), был выделен из клеток S49 kip⁻ [66]. Он фосфорилирует только оккупированный агонистом рецептор. Свободный от лигандов β_2 -АР или рецептор, связавший антагонист, не являются субстратами β -АРК. β -АРК в отличие от других известных киназ, таких как сАМР-, сGMP-, Ca^{2+} -кальмодулин- и Ca^{2+} -фосфолипидзависимых протеникиназ, и не фосфорилирует такие «классические» субстраты киназ, как казеин и гистоны. В нестимулированных клетках β -АРК локализована в цитоплазме, но транслоцируется к занятому агонистом рецептору и фосфорилирует его [67]. Оккупированные агонистами мускариновые холинэргические рецепторы и α_2 -АР также являются субстратами β -АРК [68, 69]. Для действия β -АРК не требуется присутствия G_s -белка [70].

Многочисленные данные свидетельствуют, что остатки Ser и Thr, по которым β -АРК фосфорилирует β -АР, локализованы в богатых этими остатками С-конце β -АР. Так, удаление предполагаемых участков фосфорилирования β_2 -АР в С-концевой области с помощью направленного мутагенеза в значительной степени снижает эффект гомологичной десенситизации [70]. С другой стороны, если β -АР реконструировать в фосфолипидные пузырьки, а затем фосфорилировать β -АРК в присутствии агониста, то карбоксипептидаза А, последовательно отщепляющая аминокислоты с С-конца молекулы, постепенно снижает содержание в рецепторе радиоактивного фосфата [71].

Однако оказалось, что лишь фосфорилирование β -АР специфичной киназой недостаточно для утраты им способности передавать сигнал на G_s -белок [72], а необходим еще и растворимый белок, взаимодействующий с фосфорилированным β -АРК рецептором. Ген этого белка был выделен из библиотеки кДНК мозга быка и секвенирован [73]. Белок, кодируемый этим геном, на 59% гомологичен аррестину из сетчатки, который выполняет аналогичную функцию (ранее было показано, что зрительный родопсин десенситизируется в результате фосфорилирования родопсин-киназой и последующего связывания с ним белка аррестина [74], а аррестин способен, хотя и с низким сродством, взаимодействовать с фосфорилированным β -АРК β -адренэргическим рецептором и препятствовать его взаимодействию с G_s -белком [72]). Более того, клонированный белок, названный β -аррестином, имеет участки гомологии с α -субъединицами G_s , G_o и G_{12} -белков.

Недавно Lohse и соавт. удалось оценить вклад всех трех механизмов десенситизации β -АР в клетках эпидермоидной карциномы А431—гетерологичной десенситизации, индуцируемой протеникиназой А, гомологичной десенситизации, индуцируемой β -АРК и интернализации β -АР с клеточной поверхности—в суммарный процесс потери клетками чувствительности к агонистам [75]. Они использовали специфические ингибиторы обеих протеникиназ. Было показано, что

ингибирование каждой из протеникиназ снижает степень десенситизации на 40—50%, а интернализация рецепторов обеспечивает 20—30% десенситизации. Изопротеренол в диапазоне наномольных концентраций активировал только обеспечиваемый протеникиназой А механизм десенситизации. Десенситизация, связанная с фосфорилированием рецепторов β -АРК, проявлялась только при микромолярной концентрации агониста. Было высказано предположение, что десенситизация по механизму, связанному с протеникиназой А, затрагивает *in vivo* периферические рецепторы, реагирующие на наномолярные концентрации адреналина, а десенситизация рецепторов β -АРК имеет место в синапсах, где концентрация катехоламинов может достигать высоких величин [76].

Судьба фосфорилированного рецептора в клетке может быть различна. В любом случае в фосфорилированном виде рецептор «исчезает» с клеточной поверхности (интернализуется), попадая в замкнутые внутриклеточные пузырьки. В дальнейшем он может либо подвергнуться дефосфорилированию, и, рано или поздно, рециркулировать в плазматическую мембрану [77], либо окончательно деградировать [78, 79]. Этот процесс называется «отрицательная регуляция».

Сведения о наличии у β_2 -АР какой-либо другой активности, помимо способности передавать сигнал на аденилатциклазу, в настоящее время отсутствуют. Однако нельзя исключить, что они проявляют и другие виды биологической активности. Например, общепринято, что рецепторы фактора роста эпидермиса передают сигнал в клетку за счет того, что являются тирозинкиназами [80]. Но появились данные, что они обладают и нуклеазной активностью [81].

Нами было обнаружено интересное свойство β_2 -АР мозжечка быка—их чувствительность к специфическим ингибиторам сериновых протеаз—диизопропилфторфосфату (ДФФ) и фенилметансульфонилфториду, модифицирующим остаток серина, и N- α -тозил-L-лизинхлорметилкетону, модифицирующему остаток гистидина в активном центре протеаз [82]. Ингибиторы снижали связывание как агониста, так и антагониста β_2 -АР в мембранах мозжечка и в мембранах эритроцитов лягушки, а также очищенного β_2 -АР, реконструированного в липосомы. Ингибиторы в большей мере снижали сродство рецепторов для агонистов, чем для антагонистов. Поскольку ингибиторы протеаз не действовали на β_2 -АР в интактных эритроцитах лягушки, сделан вывод, что модифицируемый участок локализован в цитоплазматическом домене β_2 -АР. Кроме того, было обнаружено, что [3 H]ДФФ стехиометрически включается в очищенный β_2 -АР, причем агонист полностью, а антагонист лишь частично блокирует меченые рецепторы ингибитором протеазы.

При сравнении первичных структур β_2 -АР и хмотрипсина было обнаружено три гомологичных участка, два из которых прилегают к остаткам Asp-102 и His-57, а третий включает в себя активный Ser-195 хмотрипсина, гомологичный Ser-401 β_2 -АР. Известно, что Asp-102, His-57 и Ser-195 хмотрипсина формируют его активный

протеолитический центр. В молекуле химотрипсина ДФФ ковалентно включается в остаток Ser-195 благодаря особым свойствам этого остатка. Относительно протяженные гомологичные участки локализованы во второй цитоплазматической петле β_2 -АР и в его С-концевой части, причем Ser-401 находится в районе, фосфорилируемом β_2 -АРК. Роль особого остатка Ser в молекуле β_2 -АР остается неясной, однако нельзя исключить, что он входит в состав центра, выполняющего неизвестную пока ферментативную функцию.

Таким образом, расшифровка первичной структуры АР не только существенно облегчила понимание механизмов преобразования ими химических сигналов, но и позволила поставить вопрос о том, не выполняет ли эта молекулярная машина и другие, ранее неизвестные функции.

STRUCTURE AND FUNCTION OF β -ADRENERGIC RECEPTORS

VOYEIKOV V. I.

M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

The modern ideas about β -adrenergic receptors structure are considered in the review. The role of separate amino acid residues and the sites of primary sequences of these proteins in their functioning, i. e. the ability to bind ligands specifically and transmit the signal about the interaction with agonist on the coupled G-protein are discussed. The data about the molecular mechanisms receptors desensitization are brought.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Altiquist R. P.* Amer. J. Physiol., v. 153, p. 586—600, 1948.
2. *Lands A. M., Groblewski G. E., Brown Jr. T. G.* Arch. Int. Pharmacodynamic Therap., v. 151, p. 68—75, 1966.
3. *Langer S. Z.* Biochem. Pharmacol., v. 23, p. 1793—1800, 1965.
4. *U'Prichard D. C., Eylund D. B., Snyder S. H.* J. Biol. Chem., v. 253, p. 5093—5102, 1978.
5. *Starke K., Borowski E., Endo T.* Eur. J. Biochem., v. 34, p. 359—388, 1975.
6. *Gilman A. G.* Ann. Rev. Biochem., v. 56, p. 615—624, 1987.
7. *Isom L. I., Cragoe E. G., Limbird L. E.* J. Biol. Chem., v. 262, p. 6750—6757, 1987.
8. *Berridge M. J., Irvine R.* Nature, v. 312, p. 315—321, 1984.
9. *Восойков В. Л.* Итоги науки и техники. Серия «Биоорганическая химия». Москва, ВИНТИ, т. 2, с. 49—53, 1984.
10. *Dixon R. A. F., Kobilka B. K., Strader B. J., Benovic J. L., Dohman H. G., Friel T., Bolanowski M. A., Bennet C. D., Fagan E., Dech R. E., Mumford R. A., Slaughter E. E., Sigal I. S., Caron M. G., Lefkowitz R. J., Strader C. D.* Nature, v. 321, p. 75—79, 1986.
11. *Henderson R., Unwin P. N.* Nature, v. 257, p. 28—32, 1975.
12. *Орчинников Ю. А.* FEBS Lett., v. 148, p. 179—191, 1982.
13. *Dohman H. G., Bouvier M., Benovic J. L., Caron M. G., Lefkowitz R. J.* J. Biol. Chem., v. 262, p. 14232—14288, 1987.
14. *Hsien-yu Wang, Lipfert L., Meibon C. C., Bachouh S. J.* J. Biol. Chem., v. 264, p. 14424—14431, 1989.

15. *Cotecchia S., Schwinn E. A., Randall R. R., Lefkowitz R. J., Caron M. G., Kobilka B. K.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 85, p. 7159—7163, 1988.
16. *Frielle T., Collins S., Dantel K. W., Caron M. G., Lefkowitz R. J., Kobilka B. K.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 84, p. 7920—7924, 1987.
17. *Kobilka B. K., Bolanowski M. A., Caron M. G., Dixon R. A. F., Dohman H. G., Francke U., Lefkowitz R. J., Sigal I. S., Yangteng T. L.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 84, p. 46—50, 1987.
18. *Kubo T., Maeda A., Sugimoto K., Akiba J., Mihuni A., Takahashi H., Haga K., Haga T., Ichiyama A., Kangawa K., Matsuo H., Hirose T., Numa S.* FEBS Lett., v. 209, p. 367—370, 1986.
19. *Ashkenazi A., Winslow J. W., Pralla E. G., Peterson G. L., Schimerlik M. I., Capon D. J., Ramachandran J.* Science, v. 239, p. 672—675, 1987.
20. *Kubo T., Fukuda K., Mikami A., Maeda A., Takahashi H., Mishina M., Haga K., Haga T., Ichiyama A., Kangawa K., Kojima M., Matsuo H., Hirose T., Numa S.* Nature, v. 323, p. 411—416, 1986.
21. *Pralla E. G., Ashkenazi A., Winslow J. W., Smith D. H., Ramachandran J., Capon D. J.* EMBO J., v. 6, p. 3023—3029, 1987.
22. *Fargis A., Raymond J. P., Lohse M. J., Kobilka B. K., Caron M. G., Lefkowitz R. J.* Nature, v. 335, p. 358—360, 1988.
23. *Juhasz D., MacDermott A. B., Axel R., Jessel T. M.* Science, v. 241, p. 558—564, 1988.
24. *Masu Y., Nakayama K., Tamaki H., Harada Y., Kuno M., Nakanishi S.* Nature, v. 229, p. 835—838, 1987.
25. *Young D., Waite G., Birchmeier C., Fasano O., Wigler M.* Cell., v. 45, p. 711—719, 1986.
26. *Jackson T. R., Blair L. A. C., Marshall J., Goedert M., Hanley M. R.* Nature, v. 335, p. 437—440, 1988.
27. *Lefkowitz R. J., Caron M. G.* J. Biol. Chem., v. 263, p. 4993—4996, 1988.
28. *Fagan J. W., Kobilka B. K., Yang-Feng T. L., Caron M. G., Lefkowitz R. J., Kobilka B. K.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 85, p. 6301—6305, 1988.
29. *O'Dowd P. F., Lefkowitz R. J., Caron M. G.* Ann. Rev. Neurosci., v. 12, p. 67—83, 1989.
30. *Rubinstein R. C., Wang S. K. F., Ross E. M.* J. Biol. Chem., v. 262, p. 16555—16562, 1987.
31. *Dixon R. A. F., Sigal I. S., Rands E., Register R. B., Blake A. D., Strader C. D.* Nature, v. 325, p. 73—77, 1987.
32. *Strader C. D., Candlore M. R., Hill W. S., Dixon R. A. F., Sigal I. S.* J. Biol. Chem., v. 264, p. 16470—16477, 1989.
33. *Strader C. D., Sigal I. S., Register R. B., Candlore M. R., Rands E., Dixon R. A. F.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 84, p. 434—438, 1987.
34. *Strader C. D., Sigal I. S., Candlore M. R., Rands E., Hill W. S., Dixon R. A. F.* J. Biol. Chem., v. 263, p. 10267—10271, 1988.
35. *Main B. G., Tucker H.* Progr. Med. Chem., v. 22, p. 122—143, 1985.
36. *Strader C. D., Candlore M. R., Hill W. S., Sigal I. S., Dixon R. A. F.* J. Biol. Chem., v. 264, p. 13572—13578, 1989.
37. *Fraser C. M.* J. Biol. Chem., v. 264, p. 9266—9270, 1989.
38. *Dohman H. G., Caron M. G., Dobson A., Frielle T., Lefkowitz R. J.* Biochemistry, v. 29, p. 2335—2342, 1990.
39. *Strader C. D., Sigal I. S., Dixon R. A. F., FASEB J.*, v. 3, p. 1825—1832, 1989.
40. *Cerione R. A., Staniszewski G., Benovic J. L., Lefkowitz R. J., Caron M. G., Giershik P., Somers R. L., Spiegel A. M., Codina J., Birnbaumer L.* J. Biol. Chem., v. 260, p. 1493—1498, 1985.
41. *Cerione R. A., Regano J. W., Adams H., Codina J., Benovic J. L., Giershik P., Somers R. L., Spiegel A., Birnbaumer L., Lefkowitz R. J., Caron M. G.* J. Biol. Chem., v. 261, p. 1011—1016, 1986.

42. *Sirader C. D., Dixon R. A. F., Chung A. H., Candalore M. R., Blake A. D., Sigal I. S.* J. Biol. Chem., v. 262, p. 16139-16143, 1987.
43. *Kobilka B. K., Caron M. G., Daniel K. W., Kobilka T. S., Lefkowitz R. J., Regan J. W.* Science, v. 240, p. 1310-1316, 1988.
44. *O'Dowd B. F., Hnatowich M., Regan J. W., Leader W. M., Caron M. G., Lefkowitz R. J.* J. Biol. Chem., v. 263, p. 15985-15992, 1988.
45. *O'Dowd B. F., Hnatowich M., Caron M. G., Lefkowitz R. J., Bouvier M.* J. Biol. Chem., v. 264, p. 7594-7599, 1989.
46. *Nakanata N., Abe M. T., Matsuoka I., Nakanishi H.* FEBS Lett., v. 260, p. 95-97, 1990.
47. *Higashijima T., Uzu S., Nakajima T., Ross E. J.* J. Biol. Chem., v. 263, p. 6491-6494, 1988.
48. *Cotecchia S., Exum S., Caron M. G., Lefkowitz R. J.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 87, p. 2896-2900, 1990.
49. *Hausdorff W. P., Hnatowich M., O'Dowd B. F., Caron M. G., Lefkowitz R. J.* J. Biol. Chem., v. 265, p. 1338-1393, 1990.
50. *Johnson G. L., Wolfe B. B., Harden T. K., Motinoff P. B., Perkins J. P.* J. Biol. Chem., v. 253, p. 1472-1480, 1978.
51. *Butcher R. W., Ho R.-J., Meng H. C., Sutherland E. W.* J. Biol. Chem., v. 240, 4515-4523, 1965.
52. *Kakuichi S., Rall T. W.* Mol. Pharmacol., v. 4, p. 367-378, 1968.
53. *Ho R.-J., Sutherland E. W.* J. Biol. Chem., v. 246, p. 6522-6527, 1971.
54. *Su Y.-F., Harden T. K., Perkins J. P.* J. Biol. Chem., v. 255, p. 7110-7419, 1980.
55. *Strunovic B., Cerione R. A., Kilpatrick B. F., Caron M. G., Lefkowitz R. J.* Science, v. 225, p. 837-849, 1984.
56. *Stadel J. M., Rebar R., Shorr R. G. L., Sawyer D. F., Caron M. G., Lefkowitz R. J.* Biochemistry, v. 25, p. 3719-3724, 1986.
57. *Sibley D. R., Strasser R. H., Caron M. G., Lefkowitz R. J.* J. Biol. Chem., v. 259, p. 9742-9749, 1984.
58. *Nambi P., Peters J. R., Sibley D. R., Lefkowitz R. J.* J. Biol. Chem., v. 260, p. 2155-2171, 1985.
59. *Blackshear P. J., Nain A. C., Kuo J. F.* FASEB J., v. 2, p. 2957-2959, 1988.
60. *Hausdorff W. P., Bouvier M., O'Dowd B. F., Irons G. P., Caron M. G., Lefkowitz R. G.* J. Biol. Chem., v. 264, p. 12657-12665, 1989.
61. *Bouvier M., Leeb-Lundberg L. M. F., Benovic J. L., Caron M. G., Lefkowitz R. J.* J. Biol. Chem., v. 262, p. 3106-3113, 1987.
62. *Sibley D. R., Nambi P., Peters J. R., Lefkowitz R. J.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 121, p. 973-979, 1984.
63. *Kelleher D. J., Pessin J. E., Ruoho A. E., Johnson J. P.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 81, p. 4316-4320, 1984.
64. *Sibley D. R., Lefkowitz R. J.* Nature, v. 317, p. 124-129, 1985.
65. *Strasser R. H., Sibley D. R., Lefkowitz R. J.* Biochemistry, v. 25, p. 1371-1377, 1986.
66. *Strasser R. H., Caron M. G., Lefkowitz R. J.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 83, p. 2797-2801, 1986.
67. *Strasser R. H., Benovic J. L., Caron M. G., Lefkowitz R. J.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 83, p. 9362-9366, 1986.
68. *Benovic J. L., Regan J. W., Matsui H., Mayor F. J., Cotecchia S., Leeb-Lundberg L. M. F., Caron M. G., Lefkowitz R. J.* J. Biol. Chem., v. 262, p. 17251-17293, 1987.
69. *Kwira M. M., Hosey M. M., Benovic J. L., Lefkowitz R. J., Caron M. G.* Biochemistry, v. 28, p. 4543-4547, 1989.
70. *Dohmar H. G., Bouvier M., Benovic J. L., Caron M. G., Lefkowitz R. G.* J. Biol. Chem., v. 262, p. 14282-14288, 1987.

71. Benovic J. L., Kahn H., Weyland I., Codina J., Caron M. G., Lefkowitz R. G. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 84, p. 8879-8882, 1987.
72. Lohse M. J., Benovic J. L., Codina J., Caron M. G., Lefkowitz R. G. Science, v. 249, p. 1547-1550, 1990.
73. Wilden U., Hall S. W., Kuhn H. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 83, p. 1174-1178, 1986.
74. Lohse M. J., Benovic J. L., Caron M. G., Lefkowitz R. G. J. Biol. Chem., v. 265, p. 3202-3209, 1990.
75. Hausdorff W. P., Caron M. G., Lefkowitz R. G. FASEB J., v. 4, p. 2881-2889, 1990.
76. Yang C. D., Benovic J. L., Caron M. G., Fong Y. L., Lefkowitz R. J., Sibley D. R. J. Biol. Chem., v. 267, p. 8855-8858, 1992.
77. Sibley D. R., Benovic J. L., Caron M. G., Lefkowitz R. J. Cell, v. 48, p. 913-922, 1987.
78. Lefkowitz R. J. Nature, v. 317, p. 124, 1985.
79. Kasuga M., Karlsson F. A., Kahn C. R. Science, v. 215, p. 185-187, 1982.
80. Kenneth T. Comments Mol. Cell. Biophys., v. 3, p. 1-13, 1985.
81. Воейков В. Л., Удовиченко И. П., Киселев О. Г., Прохорова И. А. Биол. мембраны, т. 4, с. 438-442, 1987.
82. Воейков В. Л., Гуревич В. В., Удовиченко И. П. Биол. мембраны, т. 1, с. 65-73, 1984.

Поступила 15. I. 1991