

ADP-РИБОЗИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ В МОЗГУ И ДРУГИХ ОРГАНАХ

АРУТЮНЯН А. В.

Институт биохимии им. Г. Х. Бунятыана АН Армении, Ереван

В обзоре обобщены литературные данные об эндогенном ADP-рибозилировании у эукариот. Приведен собственный экспериментальный материал и результаты исследований других авторов об особенностях этого процесса в нервной ткани, на основании чего выдвинуто представление о том, что в ней осуществляется широкий круг реакций ферментативного ADP-рибозилирования: поли-ADP-рибозилирование, олиго (ADP-рибозилирование) и несколько типов моно-ADP-рибозилирования. Соответствующие ферменты отличаются субклеточной локализацией и, вероятно, выполняют различные функции в нервной клетке.

Рассмотрен также вопрос об участии белковых факторов мозга в реализации действия бактериальных токсинов, в связи с чем излагаются современные взгляды на роль ADP-рибозилирования в трансдукции сигнала рецепторными системами.

В заключение обсуждаются наиболее важные и перспективные направления дальнейшего исследования процесса ADP-рибозилирования в НС.

ADP-рибозилирование относится к числу наиболее распространенных в природе посттрансляционных модификаций различных клеточных белков. NAD используется в качестве уникального субстрата в этом процессе, являясь донором ADP-рибозы. Существует два типа реакций ADP-рибозилирования: моно- и поли-ADP-рибозилирование, осуществляемые различными ферментными системами. Образующиеся конъюгаты отличаются не только длиной ADP-рибозной цепи, которая может носить как линейный, так и разветвленный характер (рис. 1, а, б), но и природой химической связи: N-гликозидной, характерной для моно-ADP-рибозилирования и O-гликозидной—для поли-ADP-рибозилирования [1]. Акцепторными аминокислотами белков в реакциях моно-ADP-рибозилирования являются обычно аргинин, дифгамид (модифицированный остаток гистидина), аспарагин, лизин и, как недавно было установлено, цистеин, а в реакциях поли-ADP-рибозилирования—глутаминовая кислота и лизин (рис. 2).

Началу изучения процессов ADP-рибозилирования положили исследования, проведенные в лаборатории Р. Mandel, впервые обнаружившего поли (ADP-рибоза) синтетазную активность и существование полимера ADP-рибозы *in vivo* [2, 3]. Впоследствии было установлено,

что связанная с хроматином поли (ADP-рибоза) синтетазная активность катализирует перенос остатков ADP-рибозы с NAD на гистоны и другие ядерные белки [4, 5]. Было накоплено много данных, свидетельствующих о том, что физиологическая значимость реакций поли-ADP-рибозилирования связана с модификацией структуры и функции хроматина. Поли(ADP-рибоза)синтетаза абсолютно зависима от ДНК, активность фермента не проявляется в отсутствие ДНК или ее

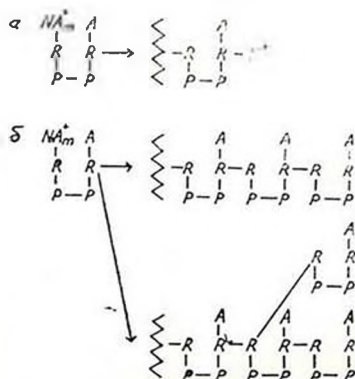


Рис. 1. а. Синтез моно-ADP-рибозол-белков, катализируемый ADP-рибозил-трансферазами; б. Синтез линейных или разветвленных поли (ADP-рибозил) белков, катализируемых (ADP-рибоза)полимеразой (поли-ADP-рибоза-синтетазой)

фрагментов [6]. Установлено участие поли-ADP-рибозилирования в регуляции синтеза, репарации и репликации ДНК, генных перестроек и перемещений, клеточной дифференцировке и трансформации, то есть практически во всех процессах, сопровождающихся разрывом и сборкой нитей ДНК [7, 8]. Структурные изменения в хроматине, обусловленные ADP-рибозилированием гистонов, приводят к конденсации хромосом и облегчают доступ к ДНК ДНК-регенерирующих ферментов. Кроме того, ADP-рибозилирование модулирует *in vivo* активность ряда ДНК-связывающих ферментов, таких как α - и β -ДНК-полимеразы, ДНК-топоизомеразы I и II, ДНК-лиаза II, Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимая эндонуклеаза и т. д.

Процесс моно-ADP-рибозилирования осуществляется моно-ADP-рибозилтрансферазами, которые обычно имеют цитоплазматическую, митохондриальную или мембранную локализацию [8]. Долгое время господствовало мнение, что моно-ADP-рибозилирование является прерогативой прокариот на основании того, что у эукариот не удавалось обнаружить моно-ADP-рибозилтрансферазной активности, несмотря на присутствие акцептирующих белков. Это положение подтверждалось тем, что моно-ADP-рибозилирование является общим механизмом действия на клеточный метаболизм ряда бактериальных токсинов. Сравнительно недавно (в конце 70-х—начале 80-х гг.) моно-ADP-рибозилтрансферазная активность была обнаружена у эукариотических организмов. Впервые моно-ADP-рибозилтрансфераза была выделена из эритроцитов индюка и человека [9] и растворимой фракции печени

крыс [10]. Затем подобный фермент, осуществляющий специфическую модификацию аргинина и других гуанидиновых соединений, был обнаружен в мембранах тиреоидных клеток [11], ядерной фракции печени кур [12], саркоплазматическом ретикулууме скелетных мышц кролика [13] и т. д. В последнее время описаны также эндогенные



Рис. 2. Акцепторные аминокислоты в реакциях моно-ADP-рибозилирования (а) и поли-ADP-рибозилирования (б)

ADP-рибозилтрансферазы, специфическим образом модифицирующие остатки гистидина [14, 15] и цистеина [16] в белках. Все эти моно-ADP-рибозилтрансферазы, несмотря на многочисленные отличия физико-химических свойств, имеют много общего с бактериальными токсинами, механизм действия которых на клеточный метаболизм довольно хорошо изучен. Полагают, что аргинин- и цистенинспецифические эндогенные ADP-рибозилтрансферазы принимают участие в регуляции активности аденилатциклазы (АЦ) подобно холерному и коклюшному токсину, которые ADP-рибозилирует регуляторные GTP-связывающие белки аденилатциклазной системы. Об этом свидетельствует то обстоятельство, что многими исследователями установлено, что ADP-рибозилирование в ряде тканей (щитовидная железа, мозг, эритроциты) сопровождается стимулированием активности АЦ. Правомочно также утверждение об идентичности механизма действия ADP-рибо-

зилтрансфераз, обнаруженных в пораженных вирусом полиомы почках хомячка [14] и печени быка [15] и дифтерийного токсина, модифицирующего остаток дифтамида фактора элонгации E_2 у эукариот, что приводит к угнетению синтеза белка, препятствуя проникновению в рибосомы пептидил-ТРНК.

Вышеизложенное убедительно демонстрирует участие эндогенных ADP-рибозилтрансфераз в регуляции клеточного метаболизма. Однако, для того, чтобы рассматривать этот процесс в качестве реакции универсальной посттрансляционной модификации белков, необходимо получить доказательства его обратимости аналогично, например, фосфорилированию или ацетилированию. В этой связи следует отметить, что недавно было показано существование ферментов, катализирующих высвобождение ADP-рибозы из моно-ADP-рибозилированных белков. Эта активность была обнаружена в эритроцитах индюка [16], трансформированных вирусом Simian-40 фибробластах [17] и растворимой фракции скелетных мышц [18]. Остается неясным вопрос о связи между метаболизмом поли(ADP-рибозы) и ADP-рибозы в организме, несмотря на то, что NAD является субстратом в обоих типах реакций ADP-рибозилирования. Прямых данных в этом отношении нет, однако небезынтересно, что в ряде случаев реакции поли-ADP-рибозилирования протекают в цитоплазме [19, 20], а типичная моно-ADP-рибозилтрансфераза была обнаружена Shimoyama и соавт. в ядерной фракции печени, где она осуществляет ADP-рибозилирование ряда белков, в том числе гистонов [12].

Поли-ADP-рибозилирование в мозгу

(ADP-рибоза)полимераза, катализирующая ковалентное присоединение к белкам ADP-рибозильного остатка NAD с последующим синтезом поли-ADP-рибозы посредством ($1''-2'$) рибозо-рибозной связи, была впервые обнаружена в ядерной фракции мозга крыс в 1980 г. [21]. Показано, что наиболее высокой активностью фермента обладают ядра нейронов, в глии она выше в астроцитах, по сравнению с олигодендроцитами. Ядерная (ADP-рибоза)полимераза мозговой ткани обнаруживает абсолютную зависимость от ДНК и ее активность в интактных ядрах значительно ниже, чем в разрушенных, что связано с возможной фрагментацией ДНК [22].

В дальнейшем была предпринята попытка выделить и очистить (ADP-рибоза)полимеразу из мозговой ткани. Заалишвили и соавт. изолировали фермент из ядерной фракции мозга крыс [23, 24]. При применении аффинной хроматографии на ДНК-сахарозе ими был получен препарат фермента со степенью очистки 123 раза и выходом 11,2%. Обнаружено стимулирующее влияние ионов магния и спермина на активность фермента, а также фрагментации ДНК под влиянием ДНК-азы I [24], что указывает на участие (ADP-рибоза)полимеразы в репарации ядерной ДНК.

Исследования, проведенные в лаборатории Mandel [25], установили, что, помимо ядерной фракции, (ADP-рибоза)полимераза присутствует во фракции синантических и несинантических митохондрий мозга, где ее активность сопоставима с таковой в митохондриях печени и составляет около 20 пмоль/мг белка/10 мин при 37°. Еще более высокая активность (ADP-рибоза)полимеразы была обнаружена в цитоплазматической рибонуклеопротеиновой фракции мозга, содержащей мРНК (т. н. mRNP) [26, 27]. Характерно, что митохондриальный фермент, в отличие от ядерной (ADP-рибоза)полимеразы, катализирует присоединение небольшого числа ADP-рибозных остатков (6—7) к акцентирующим белкам, что послужило основанием Mandel и соавт. выделить его в группу олиго (ADP-рибоза)трансфераз [25, 27]. Столь разнообразная локализация фермента в мозговой ткани, по-видимому, обуславливает правильность подхода некоторых исследователей к его изолированию из цельного мозга. Описана методика выделения (ADP-рибоза)полимеразы из мозга крупного рогатого скота и охарактеризованы основные физико-химические свойства выделенного фермента [28]. Путем осаждения экстракта цельного мозга сульфатом аммония и исследовательской хроматографии на досодежной жидкости на ДНК-целлюлозе, Red-сефарозе и гидроксипатите был выделен фермент со степенью очистки 5300 раз и выходом 19%. M_r фермента равна 116 кД, что соответствует величине M_r (ADP-рибоза)полимеразы из других источников (тимус, семенники и т. д.). Выделенный фермент существенно не отличался от описанных в литературе (ADP-рибоза)полимераз и по ряду других физико-химических параметров (рН-зависимость, величина V_{max} , K_m NAD, ингибирование аналогами субстрата). Характерно, что (ADP-рибоза)полимераза мозга, в отличие от фермента из тимуса и семенников, проявляет некоторую активность в отсутствие ДНК, что, вероятно, можно объяснить за счет фермента mRNP-фракции, который, по данным Mandel [26], не является ДНК-зависимым.

ADP-рибозилирование белков под влиянием бактериальных токсинов и участие в этом процессе белковых факторов мозга.

Известно, что в сопряжении различных рецепторов с ферментами мембран и ионными каналами принимают участие GTP-связывающие белки (G-белки), выполняющие роль внутриклеточных переносчиков сигнала. Если в ряде случаев остается невыясненным, каким образом G-белки взаимодействуют с эффекторными системами (фосфолипаза C, фосфолипаза A_2 , активируемые мускарином K^+ -каналы и т. д.), то в отношении АЦ этот вопрос достаточно хорошо изучен. G-белки АЦ-системы, в зависимости от оказываемого ими влияния на активность фермента подразделяются на 2 категории: стимулирующие (G_s -белки) и ингибирующие (G_i , G_o и G_o' -белки). Все они обладают GTP-азной активностью, имеют тримерную структуру, состоят из α , β , γ -субъединиц, причем в обоих типах белка β - и γ -субъединицы

прочны связаны и обычно функционируют в комплексе. α -Субъединица каждого из этих белков отличается величиной M_r : 45 или 52 кД у G_s -белков и 41, 39 и 40 кД соответственно у G_i , G_o и G_{12} -белков [29].

Активация АЦ при присоединении лиганда к рецепторному белку осуществляется путем прямого взаимодействия α -субъединицы G_s -белка (α_s) с ферментом. Ингибирование же АЦ наступает в результате комбинированного действия нескольких факторов. Прежде всего $\beta\gamma$ -субъединицы, высвобождающиеся из G -ингибиторных белков при связывании агониста с рецептором, взаимодействуют с α -субъединицей G_s -белка, образуя с ней тримерный комплекс, вследствие чего снижается концентрация свободной α_s , являющейся непосредственным активатором АЦ [30]. Кроме того, α -субъединица G_i -белка конкурирует с α_s за присоединение к АЦ, а $\beta\gamma$ -субъединицы G -белков сами по себе оказывают ингибирующее влияние на активность фермента [31]. Наконец, установлено, что $\beta\gamma$ -субъединицы G_i -белков с высоким сродством связываются с кальмодулином, являющимся потенциальным активатором АЦ, после чего он перестает активировать фермент. Таким образом, в присутствии кальмодулина ингибирование АЦ $\beta\gamma$ -субъединицами G -белков носит бифазный характер: в низких концентрациях они, связываясь с ним, ингибируют активность АЦ, а в высоких концентрациях оказывают этот эффект путем непосредственного взаимодействия с ферментом [32].

Столь подробное описание нами регуляторных G -белков аденилатциклазной системы обусловлено тем, что их ADP-рибозилирование лежит в основе механизма действия ряда бактериальных токсинов на животный организм. В частности, холерный токсин (холераген) катализирует ADP-рибозилирование α_s , что приводит к ингибированию присущей ей активности GTP-азы и выключает реакцию GTP-GDP-обмена, благодаря чему АЦ остается необратимо активированной. В клетках кишечного эпителия обусловленное действием холерагена бесконтрольное повышение уровня cAMP приводит к выбросу больших количеств Na^+ и воды в просвет кишечника, что является причиной тяжелой диареи. Аналогичным образом действуют некоторые штаммы патогенной *E. coli*, продуцирующие энтеротоксины, функционально и иммунологически близкий к холерагену [33]. Исследования, проведенные в лаборатории J. Moss (США) однозначно показали, что акценторной аминокислотой в процессах ADP-рибозилирования, катализируемых холерагеном, является аргинин. Показано, что субстратом реакции могут быть свободный аргинин или другие низкомолекулярные гуанидиновые соединения [34, 35].

Стимулирование АЦ под влиянием коклюшного токсина происходит в результате ADP-рибозилирования α -субъединицы G -ингибиторных белков (α_i), в результате чего G_i перестают функционировать в качестве медиаторов связанного с рецепторами ингибирования АЦ. При этом снижается или полностью утрачивается чувствительность сопряженных с АЦ рецепторов (α_2 -адренергических, мускариновых

холецистических, опнатных и т. д.) к своим лигандам, ингибирующим активность фермента и снижающим уровень сАМР. Подобные факты, широко известные в отношении периферических органов, в последнее время стали обнаруживать и в ЦНС. В частности, недавно было показано, что АDP-рибозилирование α -субъединицы G_i -белка с M_r 41 кД коклюшным токсином подавляет связывание α_2 -рецепторов в синаптических мембранах коры больших полушарий головного мозга и предотвращает влияние GTP на этот процесс [36]. Asano и Ogazawa установили интересные взаимоотношения между G_i и G_o -белками и ГАМК_A-рецептором в мембранах коры мозга крупного рогатого скота [37]. Ими было показано, что модификация α -субъединицы с помощью коклюшного токсина приводит к потере возможности GTP-связывающих белков взаимодействовать с рецептором. Обработанные алкильными реагентами типа N-этилмаленимида G-ингибиторные белки утрачивали способность АDP-рибозилироваться под влиянием коклюшного токсина. Эти данные свидетельствуют о совпадении или близости участков модификации N-этилмаленимидом или АDP-рибозилтрансферазой и указывают на возможность того, что акцептором АDP-рибозы в ингибиторных G-белках является цистеин.

Таким образом, бактериальные токсины и, в частности, коклюшный токсин успешно используются в нейробиологических исследованиях в качестве инструментов, позволяющих изучить участие G-белков в процессах рецепторного связывания. Следует отметить, что α -субъединицы G-белков АDP-рибозилируются коклюшным токсином (также как и холерагеном) только в том случае, если они жестко связаны с $\beta\gamma$ -субъединицами, то есть находятся в неактивной форме. АDP-рибозилированные G-белки более не способны связываться с рецепторами, что выражается в уменьшении их средства к агонистам, о чем было сказано выше, или потере способности агонистов индуцировать GTP-GDP обмен посредством GTP-азной реакции в клеточной мембране [38, 39]. На рис. 3 вышесказанное резюмировано в виде схемы, в которой описано функционирование G-белков в качестве переносчиков сигнала и влияние бактериальных токсинов (на примере коклюшного токсина) на этот процесс.

Характерно, что впервые G-белки АЦ-системы, являющиеся субстратами АDP-рибозилирования бактериальных токсинов, были выделены в лаборатории Gilman из мозговой ткани [40], которая, как оказалось, наиболее богата ими: в ней на долю G-белков приходится около 1% от общего содержания белка [41]. Из мембранной фракции мозга были изолированы ингибиторные G_i - и G_o -белки, подвергающиеся АDP-рибозилированию под влиянием коклюшного токсина. Впоследствии в этой же лаборатории был обнаружен и выделен из мембранной фракции крупного рогатого скота GTP-связывающий белковый фактор, названный ARF (ADP-riboseylation factor), участвующий в процессе катализируемого холерагеном АDP-рибозилирования белков [42, 43]. Было высказано мнение, что ARF образует

комплекс с α_s (G_s -ARF), являющийся более эффективным субстратом ADP-рибозилирования холерагеном, по сравнению со свободной α_s [42]. Позднее было обнаружено, что ARF стимулирует активность холерагена, индуцируя GTP-зависимые процессы, не связанные с G-белками, такие как гидролиз NAD, ауто-ADP-рибозилирование A_1 -пептида—компонента холерагена, ADP-рибозилирование агматина и ряда других простых гуанидиновых соединений и белков, не относящихся к АЦ-системе [44]. Аналогичные белковые факторы, стиму-

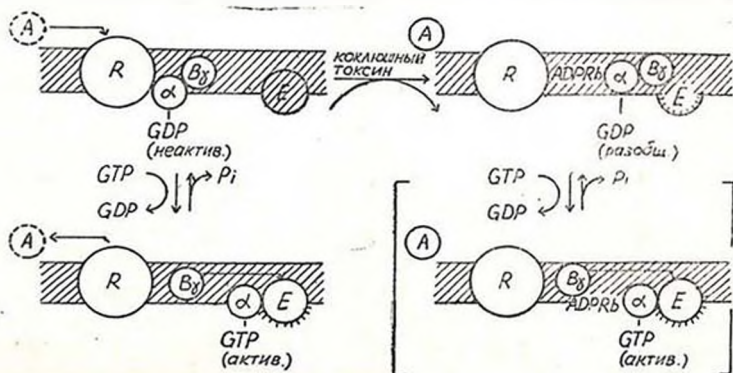


Рис. 3. G-белки как переносчики сигнала (цит. по 32). R—рецептор, А—агонист, Е—эффектор

лирующие ADP-рибозилтрансферазную активность холерагена, были изолированы из растворимой фракции мозга. Предпосылкой к этому послужили ранее опубликованные данные о повышении АЦ-активности под влиянием холерагена в присутствии не только мембран, но и растворимой фракции из различных тканей [45, 46]. Moss и сопр., используя модифицированный метод Kahn, Gilman [43], выделили из растворимой фракции мозга быка два белка с M_r 19 кД ($sARF_1$ и $sARF_2$), которые по своим свойствам соответствовали ранее описанному ARF мембран ($mARF$) [47, 48]. Оба эти белка оказывали на Ca^{2+} -зависимые и -независимые реакции, катализируемые холерагеном, эффекты, подобные $mARF$ [44]. Эти данные позволили уточнить механизм активирования АЦ-системы холерагеном и прийти к заключению, что первичный эффект ARF связан не с G-белками, а с его непосредственным взаимодействием с A_1 -пептидом холерного токсина. Поскольку это взаимодействие зависит от GTP и субстратом осуществляемой токсином реакции ADP-рибозилирования также является GTP-связывающий белок (G_{s_1}), легко убедиться в том, что в активации АЦ холерагеном участвует каскадная система GTP-связывающих белков. На первом этапе A_1 -пептид токсина активируется ARF (пока непонятно, какой из видов— $mARF$ или $sARF$ является более предпочтительным участником этого процесса в клетке); затем комп-

лекс ARF—холераген катализирует ADP-рибозилирование G_{s1} , повышая чувствительность последней к GTP и ее способность к активации каталитической субъединицы АЦ (рис. 4). Недавно было установлено, что в этом процессе первостепенная роль принадлежит низко- и высокоаффинному взаимодействию ARF с GTP [49]. Физиологическая роль тканевых белковых факторов, стимулирующих действие бактериальных токсинов, не представляется окончательно ясной, но неоспоримо, что они участвуют в GTP-зависимой регуляции эндогенных ADP-рибозилтрансфераз.

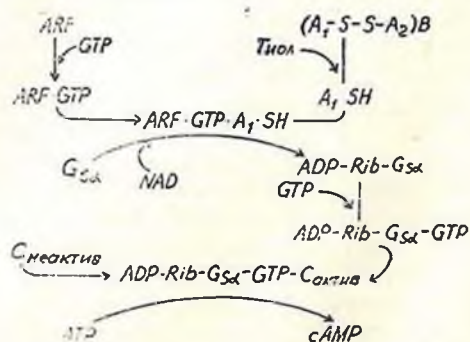


Рис. 4. Участие ARF в стимулировании АЦ холерагеном (цит. по 48): $(A_1-S-S-A_2)$ —пептиды, связанные с β -субъединицей холерагена дисульфидной связью. С—каталитическая субъединица АЦ

В последнее время появились данные о том, что ряд нейротоксинов, продуцируемых *Clostridium botulinum*, также обладает ADP-рибозилтрансферазной активностью. Фармакологически все нейротоксины этого типа (А, В, С₁, D, Е, F и G) идентичны, они блокируют высвобождение нейромедиаторов нервными окончаниями, преимущественно холинэргических нервов. Недавно из надпочечников был выделен новый GTP-связывающий белок, являющийся субстратом ADP-рибозилирования, катализируемого нейротоксинами С₁ и D, названный, в отличие от известных ранее G-белков, G_h-белком [50, 51]. Аналогичный по величине M_r G-белок был изолирован из тромбоцитов, но по сравнению с G_h-белком он был менее эффективен как субстрат ADP-рибозилирования С₁-нейротоксином. Высокой активностью в отношении этого белка обладал другой штамм *Clostridium botulinum* типа С, названный авторами ADP-рибозилтрансферазой С₃ [52]. В опытах, проведенных с культурой пермеабилizованных хромафинных клеток, было обнаружено, что этому белку принадлежит важная роль в усилении экзоцитоза при повышении внутриклеточного содержания кальция [53]. При ADP-рибозилировании G-белка экзоцитоз нейромедиаторов нарушался и это, по мнению Knight и соавт. [53] и подтверждающих эту точку зрения японских исследователей [50, 51], обуславливает действие некоторых нейротоксинов. Однако, следует при-

пать, что этот механизм детально не изучен; кроме того ADP-рибозилтрансферазной активностью обладают некоторые штаммы *Clostridium botulinum*, не являющиеся нейротоксинами (например, C₂) и, напротив, у большинства продуцируемых этим микроорганизмом нейротоксинов не обнаружено ADP-рибозилтрансферазной активности [51].

Исследованиями Kikuchi и соавт. было установлено, что под влиянием нейротоксина C₁ в мембранах мозга происходит ADP-рибозилирование трех GTP-связывающих белков, один из которых идентифицирован как белок с M_r 20 кД, являющийся продуктом *rho*-гена [54]. В связи с этим следует отметить, что в настоящее время описано большое количество так называемых малых G-белков (с величиной M_r, не превышающей 25—39 кД), не связанных с процессами трансдукции сигнала и играющих важную роль в регуляции пролиферации и дифференциации клеток. Полагают, что они являются наиболее древними представителями этой группы белков, в процессе эволюции которых сформировались G-белки, связанные с рецепторами [55]. К числу бактериальных токсинов, обладающих ADP-рибозилтрансферазной активностью, относятся также дифтерийный токсин (*Corynebacterium diphtheriae*) и *Pseudomonas Toxin A*, ингибирующие синтез белка путем ADP-рибозилирования дифтамида (продукт посттрансляционной модификации гистидина) фактора элонгации 2 (EF-2) эукариот и последующего подавления его связывания с рибосомами [33, 56]. Мы не обнаружили в доступной нам литературе данных о присутствии в мозгу субстратов или тканевых факторов, способствующих ADP-рибозилированию вышеуказанными бактериальными токсинами. Однако обнаруженные недавно факты о наличии ADP-рибозилтрансфераз с аналогичным осуществляемому ими механизмом действия [57] не исключают возможности существования подобного фермента в мозговой ткани.

Моно-ADP-рибозилтрансферазы мозга и других органов

Исследование эндогенных субстратов моно-ADP-рибозилирования, осуществляемого различными бактериальными токсинами, почти во всех тканях животного организма стимулировало поиск моно-ADP-рибозилтрансфераз животного происхождения. Наибольших успехов в этом направлении достигли J. Moss и соотр. из лаборатории клеточного метаболизма Национального института здоровья (Бетесда, США). Впервые в 1978 г. появились сообщения о наличии моно-ADP-рибозилтрансферазной активности в эритроцитах индюка [58] и цитовидной железе крупного рогатого скота [59]. Интенсивно развивающиеся с начала 80-х годов исследования показали, что в животных тканях присутствует, наряду с мембраносвязанной, растворимая форма ADP-рибозилтрансферазы.

Появились первые работы, посвященные очистке и изучению свойств эндогенных моно-ADP-рибозилтрансфераз. Из цитозоля эри-

эритроцитов индюка были очищены до гомогенного состояния ADP-рибозилтрансферазы А и В, отличающиеся чувствительностью к гистонам и хаотропным солям (А-форма переходит из неактивной в активную в присутствии гистонов или NaCl, а В-форма не подвержена активирующему действию этих соединений) [60, 61]. Кроме того, эти две формы фермента несколько отличаются субстратной специфичностью: А-форма использует в реакциях ADP-рибозилирования исключительно NAD, тогда как субстратом В-формы, наряду с NAD, является NADP [62]. Затем было показано, что помимо них, эритроциты содержат мембраносвязанную активность ADP-рибозилтрансферазы: из ядер и плазматических мембран были изолированы соответственно A_1 и С-форма фермента, первая из которых очень напоминает А-форму фермента из цитозоля, а вторая относительно инертна к воздействию солей и гистонов [63].

В 1984 г. Shimoyama и соавт. [64] выделили из ядерной фракции печени кур высокоактивную моно-ADP-рибозилтрансферазу, чувствительную к ДНК, чем она прежде всего отличается от А- и A_1 -ADP-рибозилтрансфераз из эритроцитов. Интересно, что образуемые в реакциях, катализируемых этим ферментом, аддукты ADP-рибоза-гистоны инициируют образование поли(ADP-рибозы) при их инкубации с поли(ADP-рибоза)синтетазой в присутствии Mg^{2+} и ДНК. Одним из эффективных акцепторов ADP-рибозы, модифицируемых этим ферментом, наряду с гистонами, является белок хроматина с M_r 33 кД (p33), ADP-рибозилирование которого, по мнению авторов, вносит определенный вклад в процессы репликации ДНК и транскрипции [65].

Все изолированные ферменты подобно холерагену катализировали *in vitro* перенос ADP-рибозильного остатка с NAD на гуанидиновую группу аргинина. Наличие аргининспецифической ADP-рибозилтрансферазы показано в эритроцитах человека [66], растворимой фракции печени крысы [67] и внутренней митохондриальной мембране печени быка [68], в саркоплазматическом ретикулуме и саркомере кролика [69, 70].

В 1982 г. были опубликованы результаты исследований Lester и соавт., впервые описавших ADP-рибозилирование белков синапсомом и митохондрий электрического органа Torpedo, положившие начало детальному изучению этого процесса в нервной ткани. Было показано, что наиболее интенсивному ADP-рибозилированию подвергаются белки с M_r 62 и 86 кД, тогда как в присутствии холерагена ADP-рибозилируется в основном белок с M_r 42 кД, относящийся, по мнению авторов, к GTP-связывающим белкам АЦ-системы [71]. Наряду с этим, показано, что в ряде тканей, например, в плазматических мембранах печени под влиянием эндогенной ADP-рибозилтрансферазы и холерагена ADP-рибозилируются одни и те же белки [72]. Исследованиями Фоменко и соавт. было установлено, что в синаптических мембранах мозга крысы осуществляется аргининспецифическое моно-ADP-рибозилирование белка с M_r 42 кД, причем, в отличие от дан-

ных, полученных на мембранных препаратах Torpedo, этот белок ADP-рибозилируется в отсутствие добавленного холерагена [70]. Наблюдаемое обеими группами исследователей ADP-рибозилирование белка с M_r 42 кД сопровождалось повышением активности АЦ. Этот механизм, как полагают Фоменко и соавт., лежит в основе стимулирования АЦ при введении животным предшественника NAD никотинамида [73]. Уровень включения меченой ADP-рибозы в белки синаптических мембран в экспериментах, проведенных вышеуказанными группами исследователей, был незначителен и, в частности, по данным Фоменко и соавт., составлял около 2% от используемой метки. Авторы склонны считать, что это обусловлено недостаточной доступностью мембранных акцепторов ADP-рибозы и возможным наличием в экстрактах синаптических мембран ингибитора процесса ADP-рибозилирования. Проведенные в этом направлении исследования в нашей лаборатории показали, что интенсивность ADP-рибозилирования возрастает более чем в 15 раз при хранении синаптических мембран в течение 20 ч при комнатной температуре, причем это не связано с протеолитическим распадом акцепторных белков [74]. По нашим данным, ADP-рибозилирование хранившихся синаптических мембран подавлялось в присутствии тимидина, являющегося ингибитором поли (ADP-рибоза)синтетазы, и, в отличие от результатов ранее проведенных другими авторами исследований, не полностью ингибировалось аргинином и носило более продолжительный характер: процесс завершался лишь через 2 ч инкубации и при этом расходовалось около 12% от используемого [^{14}C] NAD. Интенсификация процесса ADP-рибозилирования в условиях наших опытов может быть обусловлена деструкцией синаптических мембран при хранении и высвобождении из них акцепторных белков, а также соответствующих мембраносвязанных ADP-рибозилтрансфераз, осуществляющих перенос ADP-рибозы на другие, помимо аргинина, аминокислотные остатки мембранных белков.

В этой связи интересно отметить, что более эффективными, по сравнению с аргинином, ингибиторами ADP-рибозилирования белков хранившихся синаптических мембран оказались гистидин и, особенно, цистеин. Дальнейшие исследования показали, что при инкубации синаптических мембран, используемых в качестве источника ADP-рибозилтрансфераз, с меченым NAD в присутствии свободных аминокислот среди продуктов реакции, наряду с ADP-рибозил-аргинином, обнаруживаются ADP-рибозилцистеин и ADP-рибозил-гистидин (или ADP-рибозил-дифтаמיד?). При этом отмечается увеличение включения радиоактивности в зону высокомолекулярных белков (M_r 215—260 кД), белков с M_r 41—43 кД и появление метки в белках с M_r 56—57, 81—83 и 129—135 кД [75].

В связи с полученными нами данными интересно отметить, что эндогенная ADP-рибозилтрансфераза, катализирующая перенос ADP-рибозы с NAD на остаток дифтамида, обнаружена в составе фактора

элонгации E_2 , выделенного из почечной ткани хомячка, пораженного вирусом полиомы, и из печени крупного рогатого скота. Оказалось, что E_2 может модифицироваться не только под влиянием дифтерийного токсина, но и путем ауто-ADP-рибозилирования [57]. Дифтаמיד представляет собой уникальный модифицированный остаток гистидина, обнаруженный лишь в составе фактора элонгации E_2 и сохранившийся в процессе эволюции эукариот [76]. Трудно представить, что единственное предназначение дифтамида—это быть субстратом модификации E_2 при микробной интоксикации. Более привлекательно думать, что дифтаמיד служит акцептором в реакциях ADP-рибозилирования белков, катализируемых тканевыми ферментами. Не исключено, что в этой же роли может выступать непосредственно гистидин.

В последние годы появились работы, свидетельствующие о наличии цистениспецифических тканевых моно-ADP-рибозилтрансфераз с механизмом действия, подобным коклюшному токсину. Впервые NAD:цистени ADP-рибозилтрансфераза была обнаружена и выделена из цитозоля эритроцитов человека [77]. Установлено, что этот фермент катализирует ADP-рибозилирование, наряду со свободным цистенином, GTP-связывающие белки G_{12} [78]. Недавно появились данные о наличии аналогичного фермента в печени крыс, в которой он присутствует вместе с ADP-рибозилтрансферазами, катализирующими образование ADP-рибозиларгинина и ADP-рибозилкабоксилата [78].

Результаты исследований, проведенных в нашей лаборатории, в совокупности с литературными данными указывают на то, что в синапсомах ADP-рибозилирование осуществляется системой моно-ADP-рибозилтрансфераз, модифицирующих различные аминокислотные остатки в белках синаптических мембран (аргинин, цистенин и гистидин). Принимая во внимание данные об ингибирующем влиянии на процесс ADP-рибозилирования тимидина, нельзя отрицать также присутствие в синаптических мембранах поли(ADP-рибоза)синтетазы. В пользу этого предположения свидетельствует факт ингибирования ADP-рибозилирования в отсутствие тимидина глутаматом [74], являющимся, как уже отмечалось, акцептором ADP-рибозы в реакциях поли-ADP-рибозилирования (I). С другой стороны, нельзя полностью исключить ингибирующее влияние тимидина на процессы моно-ADP-рибозилирования, так как ингибиторы поли(ADP-рибозы)синтетазы, к которым, наряду с тимидином, относятся также никотинамид, бензамид и 3'-бензамид, не являются строго специфическими [7].

Резюмируя вышесказанное, можно заключить, что в мозговой ткани осуществляется широкий спектр реакций ферментативного ADP-рибозилирования; поли-ADP-рибозилирование в ядерной фракции и, отчасти, в синаптических мембранах, олиго-ADP-рибозилирование в митохондриях и несколько типов моно-ADP-рибозилирования в синапсомах.

В последнее время интенсивно развиваются исследования в направлении изучения механизма действия катализирующих эти процессы ферментных систем, их очистки и описания физико-химических свойств изолированных белков. Между тем, практически неисследованными остаются вопросы функциональной значимости этих процессов в нервной ткани. В первую очередь, что относится к моно- и олиго-ADP-рибозилтрансферазам, которые вообще мало исследованы, по сравнению с поли(ADP-рибоза)синтетазой.

Весьма перспективным является исследование влияния осуществляемой этими ферментами посттрансляционной модификации синаптических белков на нейромедиаторные процессы. Значительный интерес представляет идентификация ADP-рибозилированных белков и выяснение их функциональной роли в синапсомах, а также в митохондриях. В этой связи следует упомянуть, что определенная роль в митохондриальном транспорте Ca^{2+} принадлежит ADP-рибозилированию, которое, в свою очередь, может регулироваться Ca^{2+} -кальмодулиновой системой [80].

Немаловажным аспектом изучения ADP-рибозилирования в нервной ткани может стать выяснение роли этого процесса в регуляции ферментативной активности и его взаимосвязи с другими видами посттрансляционной модификации белков, в том числе ферментов. Наличие аргинин- и цистениспецифических ADP-рибозилтрансфераз в мозгу прежде всего диктует необходимость исследования их участия в регуляции активности АЦ через систему G-белков. Другим возможным примером опосредованного влияния ADP-рибозилирования на ферментные белки служит изменение их способности подвергаться другим посттрансляционным модификациям, в частности фосфорилированию, что доказано на примере киназы фосфоорилазы скелетных мышц и пируваткиназы L-типа из печени свиньи [81, 82]. Наконец, эндогенные ADP-рибозилтрансферазы мозговой ткани могут оказывать непосредственное регуляторное влияние на активность ферментов, как это было показано в случае ADP-рибозилирования глутаминсинтетазы из мозга быка и сердца кур [83], ацетилКоАкарбоксилазы из печени крыс [84], АМР-дезаминазы скелетных мышц кролика [85] и др.

Ждет своего разрешения вопрос об обратимости процесса ADP-рибозилирования в нервной ткани. Факт функционирования цикла ADP-рибозилирование—де-ADP-рибозилирование является экспериментальным обоснованием гипотезы о том, что эти процессы, наряду с другими посттрансляционными модификациями белков (фосфорилирование, метилирование, гликозилирование) выполняют важную регуляторную роль в животной клетке.

ADP-RIBOSYLATION OF PROTEINS IN BRAIN AND OTHER ORGANS

ARUTYUNYAN A. V.

Buniatian Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Armenian Republic, Yerevan

This review summarizes literature about endogenous ADP-ribosylation in eukaryotes. We present our own experimental materials and results of other authors about characteristics of this process in nerve tissue. On the basis of these data we conclude that enzymatic ribosylation reactions such as poly-ADP-ribosylation, oligo-ADP-ribosylation and several types of mono-ADP-ribosylation are underway in nerve tissue. The corresponding enzymes differ in subcellular localization and appear to play different functions in the nerve cell.

We have also reviewed the problem about the involvement of brain protein factors in the action of bacterial toxins. We discuss current views about the role of ADP-ribosylation in signal transduction by receptor systems.

In conclusion we discuss some of the more important and promising goals in further studies of ADP-ribosylation in the nervous system.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Ueda K., Hayaishi O. *Ann. Rev. Biochem.*, v. 54, p. 73—105, 1985.
2. Chambon P., Weill J. D., Mandel P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 11, № 1, p. 39—43, 1963.
3. Chambon P., Weill J. D., Doly J., Strossen M. T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 25, p. 638—643, 1966.
4. Nishizuka Y., Ueda K., Honjo T., Hayaishi O. *J. Biol. Chem.*, v. 243, p. 3765—3767, 1968.
5. Otake H., Miwa M., Fujimura S., Sugimura T. *J. Biochem.*, v. 65, № 1, p. 145—146, 1969.
6. Hayaishi O., Ueda K.—In: *ADP-Ribosylation Reactions (Biology and Medicine)*, p. 3—16, Acad. Press, L.—N. Y., 1982.
7. Gaal J. C., Pearson C. K. *Biochem. J.*, v. 230, p. 1—18, 1985.
8. Shall S.—In: *Advances in Posttranslational Modifications of Proteins and Aging*, (eds. V. Zappia, P. Galetti, R. Porta, F. Wold), v. 231, p. 597—626, 1988.
9. Moss J., Vaughan M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 75, p. 3621—3624, 1978.
10. Moss J., Stanley C. J. *J. Biol. Chem.*, v. 255, p. 7830—7833, 1981.
11. De Wolf M. J. S., Vittl P., Ambesi-Impibato F. S., Kohn L. D. *J. Biol. Chem.*, v. 256, p. 12287—12295, 1981.
12. Tanigawa Y., Tsuchiya M., Imat Y., Shimoyama M. *J. Biol. Chem.*, v. 259, p. 2022—2029, 1984.
13. Soman G., Mickelson J. R., Loyts C. F., Graves D. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 120, p. 973—980, 1984.
14. Lee H., Iglewski W. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 81, p. 2703—2707, 1984.
15. Iglewski W. J., Lee H., Muller P. *FEBS Lett.*, v. 173, p. 113—118, 1984.
16. Moss J., Jacobson M. K., Stanley S. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 82, p. 5603—5607, 1985.
17. Smith K. P., Benjamin R. S., Moss J., Jacobson M. K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 126, p. 136—142, 1985.

18. *Yang-Chung Chang, Soman C., Graves D. J.* Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 139, № 3, p. 932—933, 1986.
19. *Elkaim R., Thomassin H., Niedergang C., Egly J. M., Kempf J., Mandel P.* Biochimie, v. 65, p. 653—659, 1983.
20. *Mandel P.*—In: ADP-Ribosylation of Proteins (ed. by F. R. Althaus, H. Hilz, S. Shall), p. 2—8, Springer-Verlag, 1985.
21. *Заалишвили Т. М., Маргиани Д. О., Тамазян А. С.* Изв. АН ГССР, т. 6, № 2, с. 141—146, 1980.
22. *Заалишвили Т. М.* Изв. АН ГССР, т. 7, № 4, с. 381—383, 1981.
23. *Заалишвили Т. М., Маргиани Д. О., Тамазян А. С.* Сообщ. АН ГССР, т. 106, № 2, с. 397—400, 1982.
24. *Заалишвили Т. М., Сабелашвили Д. Ш.* Нейрохимия, т. 8, № 3, с. 385—389, 1989.
25. *Masmoudi A., Mandel P. J.* Neurochem., v. 51, № 1, p. 188—193, 1988.
26. *Mandel P.*—In: ADP-ribose Transfer Reactions. Mechanisms and Biological Significance (ed. by M. K. Jacobson and E. L. Jacobson), p. 32—38, Springer-Verlag, 1989.
27. *Chypre C., Manteg C., Mandel P. J.* Neurochem. v. 51, p. 561—565, 1988.
28. *Арутунян Д. Л., Погосян А. А., Мхитарян А. Г.* ДАН АрмССР, т. 86, № 4, с. 178—180, 1988.
29. *Gilman A. G.* Ann. Rev. Biochem., v. 56, p. 615—649, 1987.
30. *Katada T., Bokoh G. M., Smigel M. D., Ut M., Gilman A. G. J.* Biol. Chem., v. 261, p. 3586—3595, 1984.
31. *Katada T., Olnuma M., Ut M. J.* Biol. Chem., v. 261, p. 3586—3595, 1984.
32. *Ut M.*—In: ADP-ribose Transfer Reactions. Mechanisms and Biological Significance (ed. by M. K. Jacobson and E. L. Jacobson), p. 414—421, Springer-Verlag, 1989.
33. *Gaal J. C., Pearson C. K.* Trends in Biochem. Sci., v. 11, № 4, p. 171—175, 1986.
34. *Moss J., Vaughan M. J.* Biol. Chem. v. 252, p. 2455—2457, 1977.
35. *Moss J., Vaughan M.* Adv. Enzymol. v. 61, p. 303—379, 1988.
36. *Nomura Y., Kitamura Y., Segawa T. J.* Neurochem. v. 44, № 2, p. 364—369, 1985.
37. *Asuno T., Ogasawara N.* Mol. Pharmacol. v. 29, p. 241—249, 1985.
38. *Haga K., Haga T., Ichiyama A., Katada T., Kurose H., Ut M.* Nature, v. 316, p. 731—732, 1985.
39. *Kurose H., Katada T., Haga T., Haga K., Ichiyama A., Ut M. J.* Biol. Chem., v. 261, p. 6423—6428, 1986.
40. *Gilman A. G.* Cell, v. 36, p. 577—579, 1984.
41. *Kahn R. A., Goddard G., Newkirk M. J.* Biol. Chem., v. 263, p. 8262—8287, 1988.
42. *Kahn R. A., Gilman A. G. J.* Biol. Chem., v. 259, p. 6228—6234, 1984.
43. *Kahn R. A., Gilman A. G. J.* Biol. Chem., v. 261, p. 7903—7911, 1985.
44. *Tsai S. C., Noda M., Adamik R., Moss J., Vaughan M.* Proc. Natl. Acad. Sci., USA, v. 84, p. 5139—5142, 1987.
45. *Enomoto K., Gill D. M. J.* Biol. Chem., v. 255, p. 1252—1258, 1980.
46. *Le Vine I. I., Cuatrecasas P.* Biochim. et biophys. acta, v. 672, p. 248—261, 1981.
47. *Tsai S.-C., Noda M., Adamik R., Chang P. P., Chen H.-C., Moss J., Vaughan M. J.* Biol. Chem., v. 263, № 4, p. 1768—1772, 1988.
48. *Noda M., Tsai S.-C., Adamik R., Chang P. P., Kunz B., Moss J., Vaughan M.*—In: ADP-Ribose Transfer Reactions. Mechanisms and Biological Significance (ed. by M. K. Jacobson, E. L. Jacobson), p. 445—449, Springer-Verlag, 1989.
49. *Bobak D. A., Buziotis M. M., Noda M., Tsui S.-C., Adamik R., Moss J.* Biochemistry, v. 29, № 4, p. 855—861, 1990.
50. *Ohashi Y., Kamiya T., Fujiwara M., Narimiya S.* Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 142, p. 1032—1038, 1987.
51. *Narimiya S., Ohashi Y., Fujiwara M.*—In: ADP-Ribose Transfer Reactions. Mechanisms and Biological Significance (ed. by M. K. Jacobson and E. L. Jacobson), p. 437—444, 1989.

52. *Aktories K., Laux M., Rosener S.*—In: ADP-Ribose Transfer Reactions. Mechanisms and Biological Significance (ed. by M. K. Jacobson, E. L. Jacobson), p. 445—449, 1989.
53. *Knight D. E., Tonge D. A., Baker P. F.* Nature, v. 317, p. 719—721, 1985.
54. *Kikuchi A., Yamamoto K., Fujita T., Takai Y.* J. Biol. Chem., v. 263, № 31, p. 16303—16308, 1986.
55. *Этингоф Р. Н., Думлер И. Л.* Журн. эвол. биох. и физиол., т. 25, № 2, с. 195—214, 1989.
56. *Nygard O., Nilsson L.* Biochim. et biophys. acta, v. 821, № 1, p. 152—162, 1985.
57. *Lee H., Igilewski W. J.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 81, p. 2703—2707, 1984.
58. *Moss J., Vaughan M.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 75, p. 3621—3624, 1978.
59. *Kohn L. D.* Recept. Recognit., Ser. A, № 1, p. 134—212, 1978.
60. *Moss J., Stanley S. J., Watkins P. A. J.* Biol. Chem., v. 255, p. 5838—5840, 1980.
61. *Yost D. A., Moss J. J.* Biol. Chem., v. 258, p. 4926—4929, 1983.
62. *West R. E., Jr., Moss J.* Biochemistry, p. 8057—8062, 1986.
63. *Moss J., West R. E., Osborne J. C., Levine R. L.*—In: ADP-Ribosylation of Proteins (ed. by F. R. Althaus, H. Hilz, S. Shall), p. 512—517, Springer-Verlag, 1985.
64. *Tanigawa Y., Tsuchiya M., Imai Y., Shimoyama M.* J. Biol. Chem. v. 259, p. 2022—2029, 1984.
65. *Mishima K., Tsuchiya M., Tanigawa Y., Yoshimura Y., Shimoyama M.* Eur. J. Biochem., v. 179, p. 267—273, 1989.
66. *Moss J., Stanley S. J.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 78, p. 4809—4812, 1981.
67. *Moss J., West R. E., Jr., J. Biol. Chem.* v. 256, p. 7830—7833, 1981.
68. *Richter C., Winterhalter K. H., Baumhuter S., Lotscher H. R., Moser B.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 80, p. 3188—3192, 1983.
69. *Soman G., Mickelson J. R., Louis C. F., Graves D. J.* Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 120, № 3, p. 979—980, 1984.
70. *Soman G., Graves D. J.* Arch. Biochem. Biophys., v. 260, № 1, p. 56—66, 1988.
71. *Lester H. A., Steer L., Michaelson D. M.* J. Neurochem. v. 38, № 4, p. 1080—1086, 1982.
72. *Beckner S. K., Blecher M.* Biochim. Biophys. Acta, v. 673, p. 477—486, 1981.
73. *Фоменко А. И., Халмуродов А. Г., Степаненко С. П., Пожарун С. В.* Биологич. мембраны, т. 3, № 2, с. 124—130, 1986.
74. *Арутюнян А. В., Моисеян Н. О., Бурназян Л. Б., Еранян С. С., Геворкян Г. А.* Нейрохимия, т. 7, № 4, с. 500—508, 1988.
75. *Моисеян Н. О., Бурназян Л. Б., Арутюнян А. В.* Нейрохимия, т. 9, № 4 (в печати).
76. *Brown B. A., Bodley J. W.* FEBS Lett., v. 103, p. 253—255, 1979.
77. *Tanuma S., Kawashima K., Endo H. J.* Biochem. v. 101, № 3, p. 821—824, 1987.
78. *Tanuma S., Kawashima K., Endo H. J.* Biol. Chem. v. 263, p. 5485—5489, 1988.
79. *Jacobson E. L., Mingmuang M., About-Ela N., Jacobson N. K.*—In: ADP-Ribose Transfer Reactions. Mechanisms and Biological Significance (ed. by M. K. Jacobson, E. L. Jacobson), p. 13—17, Springer-Verlag, 1989.
80. *Graves C. B., McDonald J. M.* Cell Calcium, v. 6, p. 491—501, 1985.
81. *Tsuchiya M., Tanigawa Y., Ushiroyama T., Matsuura R., Shimoyama M.* Eur. J. Biochem., v. 147, p. 33—40, 1985.
82. *Matsuura R., Tanigawa Y., Tsuchiya M., Mishima K., Yoshimura Y., Shimoyama M.* Biochim. et biophys. acta, v. 969, p. 57—65.
83. *Moss J., Watkins P. A., Stanley S. J., Purnell M. R., Kidwell R. J.* Biol. Chem., v. 259, p. 5100—5104, 1984.
84. *Witters L. A., Dermott M. Mc.* Biochemistry, v. 25, p. 7216—7220, 1986.
85. *Haroutunian A. V., Mishima K., Tsuchiya M., Tanigawa Y., Shimoyama M., Shlman S.* Med. Sci., v. 11, p. 1—12, 1987.

Поступила 28. X. 1990