

ХАРАКТЕРИСТИКА МЕМБРАННЫХ
НЕЙРОСПЕЦИФИЧЕСКИХ БЕЛКОВ

БЕРЕЗИН В. А.

Кафедра биофизики и биохимии Днепронетровского госуниверситета

Приводится характеристика современных представлений о клеточной и субклеточной локализации, физико-химических свойствах, функциональной роли ткане- и видоспецифичности мембранных нейроспецифических белков. В обзоре рассматриваются белки плазматической мембраны синапсом Д1, Д2, Д3, К1, К2, К4, К5, белок синаптических везикул—синаптин, главный белок постсинаптического уплотнения, специфические для синаптических структур фосфопротеин «белок 1» и фосфопротеин В-50, другие антигены клеточной поверхности структурных элементов мозга, а также мембранные антигены клеток мозга, идентифицированные в последнее время с помощью моноклональных антител. Подчеркивается, что применение техники получения рассматривать как качественно новый этап в изучении нейроспецифических мембранных белков.

Открытие в 1965 г. первого нейроспецифического белка S-100 [1] послужило началом разработки нового плодотворного подхода к анализу специфических функций и структуры нервной системы. Некоторые из изученных специфических белков можно рассматривать как маркеры отдельных типов клеток мозга [2]. Так, кислый глиальный фибриллярный белок и α_2 -гликопротеин являются маркерами астроцитов [2, 3], белок 14-3-2 имеет специфическую нейрональную локализацию [4]. Обнаружены антигены—маркеры клеточной поверхности олигодендроцитов [5]. Охарактеризованы белки, специфические для отдельных специализированных структур нервной ткани: миелина ЦНС—основной белок миелина [2]; миелина периферических нервов и спинного мозга—белок P₂ [6, 7]; нервных окончаний (синапсов)—белок 1 [8]; мембраны синаптических везикул—синаптин [9]; плазматической мембраны синапсом—белки Д1, Д2, Д3 [10]. Всего в структурах нервной ткани обнаружено более 30 нейроспецифических белков [11].

Наиболее изучены в настоящее время специфические белки, которые представлены в основном растворимой формой: белок S-100, белок 14-3-2, кислый глиальный фибриллярный белок, астроцитарный α^2 -гликопротеин. Однако в последнее десятилетие в связи с развитием новых методов и подходов к исследованию белков, локализованных в мем-

бренных структурах [12, 13], достигнуты значительные успехи в изучении мембранных нейроспецифических белков. Интерес к ним обусловлен уникальными функциями мембранных образований клеток нервной ткани. Изучение мембранных нейроспецифических белков может приблизить нас к пониманию таких вопросов, как структура и функция специализированных контактов нервных клеток, механизмы эмбрионального и постэмбрионального синаптогенеза, взаимодействие нейронов и прилегающих к ним нейроглиальных элементов, мембранные механизмы трансформации и малигнизации клеток мозга, механизмы синаптической передачи, обучения и памяти, сна, психической деятельности.

В настоящем обзоре представлены систематизированные сведения о мембранных специфических белках нервной ткани. Белок P_2 и основной белок миелина не будут рассматриваться; их, по-видимому, нельзя считать типичными (интегральными) мембранными белками, поскольку в силу основного характера они могут неспецифически связываться с липидными бислоями за счет электростатических взаимодействий [6, 7]. Специфические белки, ассоциированные с микротрубочками мозга, типа MAP_2 [14], также обсуждаться не будут. Основные данные о специфических мембранных белках мозга сведены в таблицу.

Мембранные формы нейроспецифических белков S-100 и 14-3-2. В настоящее время установлено, что существует гетерогенная группа белков S-100, которые относятся к семейству кальцийсвязывающих белков мозга [15]. Основная часть белка S-100, составляющего 0,2% от суммарных белков мозга, приходится на долю растворимой формы и только около 10% составляет мембраносвязанная форма, которая экстрагируется и-пентанолом [16]. Методами световой и электронной иммуногистохимии показана гетерогенность локализации мембраносвязанного белка S-100. Он обнаруживается в плазматических и цитоплазматических мембранах астроцитов, плазматической мембране олигодендроглии, а также в пре- и постсинаптических мембранах и ядерной мембране нейронов [17—19]. Показано, что в синапсоммах 85% белка S-100 находится в растворимой форме, а 15% связано с мембранами [20]. Предполагается наличие в синаптической мембране рецептора белка S-100. Константа диссоциации, определенная для комплекса белок S-100—рецептор, равна $1,99 \times 10^{-8}$ М [20]. По-видимому, мембранный белок S-100 экспрессирован на поверхности нейронов, поскольку моноспецифическая антисыворотка к нему может быть использована для отделения изолированных нервных клеток [19]. Мембраносвязанный S-100 появляется в нейронах на 2-й неделе постнатального развития крыс и кроликов [19]. Иммунохимически белок S-100 выявляется также на поверхности эпидермальных клеток Лангерганса и родственных им клеток лимфоузлов [21].

Специфические физиологические функции мембранного белка S-100 (так же, как и растворимого) остаются недостаточно изученными. Были предложены различные гипотезы участия мембранного белка S-100 в механизмах памяти [16]. Однако экспериментальные результаты, положен-

Таблица

Характеристика мембранных нейроспецифических белков

Название белка	Видоспецифичность	Локализация в ткани	Клеточная локализация	Изменение содержания в мозгу в онтогенезе	Физико-химические свойства	Предполагаемая функциональная роль	Источник информации
1	2	3	4	5	6	7	8
Д1	Крыса	Во всех отделах и структурах ЦНС	Наружная поверхность синаптической мембраны нейронов	Возрастает	Амфифильный белок	—	[26—29, 32, 33]
Д2	Видоспецифичен	" "	" "	Уменьшается	Гликопротеин: 2 основных формы: фетальная и взрослая. Взрослая форма из мозга человека с M_r 130 и 150 кД. Эмбриональная форма содержит сиаловые кислоты	Молекула клеточной адгезии, вовлеченная в процессы межклеточного узнавания при синаптогенезе	[26—29, 32, 33, 35, 36, 42]
Д3	Крыса	" "	Внутренняя сторона синаптической мембраны нейронов	Возрастает	Амфифильный белок	—	[26—29, 32, 33]
К1, К2	Видоспецифичны (цыпленок)	Головной мозг	Синаптическая мембрана	—	Амфифильные гликопротеины, связывающиеся с конканавалином А	—	[50]
К4, К5	Видоспецифичны	Головной мозг	Синаптическая мембрана	—	К4 сходен с Д2, а К5 с Д3 мозга крысы	—	[50]
N-SAM	Видоспецифичен	Нейроретина, головной мозг	Наружная поверхность плазматической мембраны нейронов	—	Гликопротеин; эмбриональная форма содержит 30%, а взрослая 10% сиаловых кислот, при удалении которых M_r = 140 кД. Подобен Д2 мозга крысы	Молекула клеточной адгезии	[41]

Таблица

Характеристика мембранных неспецифических белков

Название белка	Видоспецифичность	Локализация в ткани	Клеточная локализация	Изменение содержания в мозгу в онтогенезе	Физико-химические свойства	Предполагаемая функциональная роль	Источник информации
1	2	3	4	5	6	7	8
Д1	Крыса	Во всех отделах и структурах ЦНС	Наружная поверхность синаптической мембраны нейронов	Возрастает	Амфифильный белок	—	[26—29, 32, 33]
Д2	Видоспецифичен	" "	" "	Уменьшается	Гликопротеин; 2 основных формы: фетальная и взрослая. Взрослая форма из мозга человека с M_r 130 и 150 кД. Эмбриональная форма содержит сialовые кислоты	Молекула клеточной адгезии, вовлеченная в процессы межклеточного узнавания при синаптогенезе	[26—29, 32, 33, 35, 36, 42]
Д3	Крыса	" "	Внутренняя сторона синаптической мембраны нейронов	Возрастает	Амфифильный белок	—	[26—29, 32, 33]
К1, К2	Видоспецифичны (цыпленок)	Головной мозг	Синаптическая мембрана	—	Амфифильные гликопротеины, связывающиеся с конканавалином А	—	[50]
К4, К5	Видоспецифичны	Головной мозг	Синаптическая мембрана	—	К4 сходен с Д2, а К5 с Д3 мозга крысы	—	[50]
N-CAM	Видоспецифичен	Нейроретина, головной мозг	Наружная поверхность плазматической мембраны нейронов	—	Гликопротеин; эмбриональная форма содержит 30%, а взрослая 10% сialовых кислот, при удалении которых $M_r = 140$ кД. Подобен Д2 мозга крысы	Молекула клеточной адгезии	[41]

1	2	3	4	5	6	7	8
NS-1	Мышь	Головной мозг, глиобластома	Антиген клеточной поверхности глины	Возрастает	—	—	[65]
NS-2	Мышь	Головной мозг, глиобластома	" "	—	2 полипептида с M_r 84 и 120 кД	—	[66]
Thy-1	Видонеспецифичен	Мозг и тимус мыши, крысы, собаки; мозг, почки собаки, крысы, человека	Клеточная поверхность (в основном) нейронов		Гликопротеин с $M_r=24$ кД; 2 дисульфидные связи, на С-конце — гидрофобная область, гомология с доменами иммуноглобулинов	—	[69, 70]
Нейроспецифические антигены, идентифицированные с применением моноклональных антител							
O_1, O_2, O_3, O_4	Видонеспецифичны	ЦНС	Клеточная поверхность олигодендроцитов	O_1, O_2 при рождении в мозжечке отсутствуют и появляются на 7-й день	—	—	[5, 73]
Полипептид с M_r 65 кД	Видонеспецифичен	Секреторные везикулы различных типов только в нервной и нейросекреторных тканях	Наружная поверхность клеточных мембран	—	$M_r=65$ кД	—	[74]
BSP-2	Мышь	Отделы и структуры ЦНС	В культуре находят только на мембране нейронов; в мозжечке антигена связываются также с астроцитами	—	Комплекс из 3-х гликопротеинов с $M_r=180, 140$ и 120 кД	Гликопротеин с M_r 180 кД эквивалентен антигену NS-4, а с M_r 140 кД сходен с белком D2	[79]
BSP-3	Мышь	Мозжечок	Клеточная поверхность астроглии мозжечка	—	Гликопротеин с $M_r=48$ кД	—	[75]
Сиалогликопротеин	Видонеспецифичен	Кора, белое вещество больших полушарий, таламус, кора мозжечка	—	В мозгу 16-недельного зародыша человека не обнаруживается	$M_r=130$ кД	—	[78]

ные в их основу, по-видимому, свидетельствуют скорее о существовании неспецифической ответной реакции на физиологическую нагрузку нервных клеток специфических структур мозга, участвующих в формировании новых поведенческих навыков, чем о специфической роли белка S-100 [22]. Недавно было показано, что белок S-100, адсорбированный в присутствии Ca^{2+} на плазматических мембранах, полученных из отдельных отпрепарированных нейронов Дейтерса, стимулирует транспорт ГАМК через эти мембраны. Глиальные клетки обладали способностью ингибировать стимулированный связанным S-100 транспорт ГАМК. На этом основании предполагается функция мембранного белка S-100 как регулятора транспорта ГАМК через клеточную мембрану нейронов [19]. Тем не менее остается неясным, реализуется ли подобный механизм *in vivo*. Связанный с нейрональными мембранами белок S-100, возможно, регулирует ионные каналы посредством изменения состояния Ca^{2+} в мембранах [23].

Белок 14-3-2, подобно белку S-100, также представлен в основном растворимой фракцией. Выяснено, что этот белок является специфическим для мозга изоэнзимом эналазы ($\gamma\gamma$) [24]—гликолитического фермента. Было показано, что в небольшой степени белок 14-3-2 может быть включен в плазматическую мембрану нейронов. Мембранные формы белков S-100 и 14-3-2 частично перекрывают друг друга на поверхности нервных клеток [25]. Физиологическая роль мембранной формы белка 14-3-2 неизвестна.

Белки плазматической мембраны синапсом (Д1, Д2, Д3 и др.). В 1974 г. во фракции синапсомных мембран головного мозга крысы были описаны 5 нейроспецифических антигенов: Д1, Д2, Д3, Д5 и Д12 [10]. Их тканевая специфичность доказана перекрестным иммуоэлектрофорезом белков плазматической мембраны синапсом, экстрагированных 2%-ным раствором тритона X-100 с адсорбцией антител экстрактами различных тканей *in situ*. Вследствие более четкой визуализации части иммуопреципитатов в дальнейшем исследовались только антигены Д1, Д2 и Д3. Их обогащение во фракции плазматических синапсомных мембран составило 3,8, 2,7 и 4,1 для белков Д1, Д2 и Д3 соответственно. Белки отсутствовали во фракции синаптических везикул мозга крысы [26].

В экспериментах по адсорбции антител (выработанных против фракции синапсом), которые были проведены на трех объектах—целостных синапсомах мозга крысы, подвергнутых осмотическому шоку, синапсомах, пропущенных через пейлоновые сита и срезах коры больших полушарий—изучена топография антигенов Д1, Д2 и Д3 на синаптической мембране [27]. Было показано, что Д3 локализован на внутренней стороне синапсомной мембраны. Молекула Д1, по-видимому, лишь частично экспонирована на наружной стороне мембраны, тогда как белок Д2 целиком локализован на наружной стороне нейрональной мембраны. Изучение регионального распределения Д1, Д2 и Д3 в головном мозгу крыс показало, что эти белки присутствуют во всех струк-

турах примерно в одинаковых концентрациях, за исключением мозжечка, варолиева моста и продолговатого мозга, где их содержание снижено [28].

Существуют доказательства того, что белки Д1, Д2 и Д3 присущи только нейронам. Например, они отсутствовали в культивируемых клетках астроглии [29]. Локализация этих белков в нейронах не ограничена только синаптическими мембранами [29]. Методом иммуногистохимии было показано, что белок Д2 присутствует на всей поверхности тел и отростков культивируемых нейронов из фетального мозга, в то время как другие типы клеток не окрашиваются [30]. Во взрослом мозгу белок Д2 иммуногистохимически выявляется в пресинаптическом комплексе [31]. В онтогенезе мыши концентрации белков Д1 и Д3 в мозгу возрастают постнатально и достигают максимальных величин у взрослых животных. Концентрация белка Д2, наоборот, уменьшается с возрастом, достигая стационарного уровня у взрослых мышей, который составляет 50% от его содержания в мозгу 12-дневных животных [32].

При использовании перекрестного иммуноэлектрофореза в присутствии смесей ионогенных детергентов (додецилсульфата натрия, цетилтриметиламмонийбромид) и неионного детергента тритона X-100 (так называемый электрофорез со смещенным зарядом [33]) показано, что все три антигена Д1, Д2 и Д3 относятся к амфифильным мембранным белкам [34]. Амфифильный характер этих белков указывает на то, что они, видимо, инкорпорированы в структуру мембраны (заякорены своими гидрофобными доменами в углеводородной структуре липидного бислоя), а не просто сорбированы на поверхности.

Из трех антигенов (Д1, Д2 и Д3) наиболее полно изучены физико-химические свойства и физиологические функции белка Д2.

Белок Д2 был очищен из синаптических мембран мозга крыс колоночной хроматографией последовательно на гидроксипатите, иммобилизованном лектине из проростков пшеницы, биогеле А-5М и лизин-сефарозе в 240 раз с выходом 2,9% [35]. Полипептидный анализ очищенного препарата белка Д2, проведенный методом электрофореза в ПААГ в присутствии додецилсульфата Na (ДДС-Na), показал, что белок Д2 представлен двумя полипептидами с M_r 150 и 130 кД соответственно. Аналогичные результаты получены при электрофорезе в ПААГ ^{125}I -меченого белка Д2, который был выделен иммунопреципитацией при перекрестном иммуноэлектрофорезе [35]. Белок Д2 относится к мембранным гликопротеинам клеточной поверхности, поскольку связывается иммобилизованными лектинами [35]. Показано, что белок Д2 из фетального мозга человека, очищенный гидрофобной хроматографией на колонке с фенил-сефарозой, связывается с конканавалином А. Применение аффинного перекрестного иммуноэлектрофореза позволило рассчитать константу диссоциации комплекса белок Д2—лектин, которая равна $3,17 \times 10^{-2} M$ [36]. Показано также, что мембранные белки Д2 фетального и взрослого мозга отличаются по электрофоретической подвижности. Фетальный Д2—более кислый белок. Обработка его нейраминидазой уменьшает электрофоретическую подвижность, что указы-

вают на наличие дополнительных остатков спаловых кислот в фетальной форме белка Д2 [31, 37].

Помимо фетальной и взрослой мембранных форм белка Д2 существуют, очевидно, и растворимые (не связанные с мембраной) дериваты как фетальной, так и взрослой форм. На это указывает обнаружение белка Д2 в амниотической жидкости беременных с дефектами нервной трубки [38], а также в цереброспинальной жидкости больных с психическими и другими расстройствами НС [39]. Растворимый антиген Д2, определяемый в жидкостях тела у человека, может высвобождаться под действием экстраклеточных протеиназ, либо в результате протекания ряда дегенеративных процессов, затрагивающих синаптические структуры [34]. При определении растворимой и мембранной форм белка Д2 мозга человека во всех случаях [36, 38, 39] использовалась антисыворотка против белка Д2 мозга крысы; при этом специфический белок идентифицировался методом ракетно-линейного иммуноэлектрофореза [36], позволяющего регистрировать, по крайней мере, частично идентичные антигены. На этом основании белок Д2 можно считать видоиспецифичным. Однако пока остается неясным, в какой мере белок Д2 из мозга человека и крысы идентичен.

Исследования последних лет позволили пролить свет на функции белка Д2. Его локальная концентрация в синаптических мембранах [29, 31], специфическая локализация на наружной поверхности мембран [27], параллелизм в уровне содержания и скорости образования синапсов в ранний постнатальный период мышей [32] позволили еще в ранних работах предполагать, что молекула этого белка может быть вовлечена в процессы межклеточного узнавания при синаптогенезе [27].

В 1977 г. в лаборатории Edelman [40, 41] был обнаружен полипептид с M_r 140 кД, локализованный на поверхности мембран клеток ретины эмбриона цыпленка, моноспецифические антитела к которому ингибировали адгезию этих клеток в культуре. Этот полипептид или его часть высвобождалась в раствор при культивировании клеток нейроретины. Была высказана гипотеза, что полипептид вовлечен в начальные стадии адгезии нервных клеток ретины. Белок был назван «молекулой клеточной адгезии» НС (N-CAM—nervous system cell adhesion molecule).

В дальнейшем было продемонстрировано сходство между N-CAM эмбриона цыпленка и белком Д2 мозга крысы [42]. Антитела к белку Д2 мозга крысы ингибировали объединение в пучок отростков нейронов симпатического ганглия крысы в культуре. Аналогичным свойством обладали Fab'-фрагменты антител, выработанные против N-CAM эмбриона цыпленка, по отношению к культивируемому ганглию дорзального корешка эмбриона цыпленка [43]. Наконец, анти N-CAM перекрестно реагировал с белком Д2, что говорит о несомненном сходстве этих двух молекул [42]. Сравнение физико-химических свойств эмбриональной и взрослой форм N-CAM цыпленка [44, 45] и белка Д2 мозга крысы [37] (углеводный состав, величина M_r , влияние ней-

раминидазы и др.) также указывает на их большое сходство. На поверхности гепатоцитов эмбриона цыпленка также был найден полипептид с M_r 68 кД, антитела к которому подавляли адгезию клеток печени [46]. Однако анти-N-SAM мозга и анти-SAM печени перекрестно не взаимодействовали. Недавно было получено прямое доказательство того, что молекула N-SAM может функционировать как лиганд в адгезии между отдельными нервными клетками [47]. Были получены также моноклональные антитела к N-SAM, которые использовались для аффинной очистки N-SAM [44].

Таким образом, совокупность изложенных выше данных позволяет предполагать, что нейроспецифический белок D2 вовлечен в процессы клеточной адгезии между нейронами и является «молекулой клеточной адгезии» НС млекопитающих и птиц.

Количественное определение белка D2 чувствительными иммунохимическими методами в жидкостях тела человека в настоящее время используется в пренатальной диагностике дефектов нервной трубки и диагностике различных нарушений ЦНС [38, 48, 49].

Недавно в синаптической мембране мозга цыпленка найдены 4 нейроспецифических амфифильных гликопротеина—K1, K2, K4 и K5. Гликопротеины K1 и K2 обладали видоспецифичностью, тогда как K4 и K5 оказались иммунологически сходными с D2 и D3 мозга крысы соответственно [50].

Кроме вышеописанных белков типа D, в плазматических синаптических мембранах обнаружена группа из 6 антигенов, которые при электрофорезе в присутствии лаурилсульфата натрия имели M_r 56, 58, 62, 63, 64 и 66 кД [51]. Эти антигены также присутствовали в гладких и шероховатых микросомах и синаптических пузырьках. Следовые количества антигенов были найдены в месте синаптических контактов. Антигены отсутствовали в ядре, митохондриях, миелине и цитозоле. К сожалению, тканевая специфичность этих антигенов не проверялась.

Главный белок постсинаптического уплотнения. Во фракции постсинаптических уплотнений обнаружен белок с M_r 52 кД, содержание которого возрастает в 20 раз на 3- и 4-й неделях постнатального развития и во взрослом мозгу составляет 50% от общего содержания белка фракции [52]. Белок нерастворим в неионных детергентах, хелатообразующих соединениях, гуанидинхлориде, имеет реактивные сульфгидрильные группы и был обнаружен только в тех субклеточных фракциях, которые содержат асимметрические синаптические структуры и постсинаптические утолщения. Предполагается, что «главный белок постсинаптического уплотнения» (mPSD-protein) является специфическим маркером асимметрических синапсов мозга млекопитающих [53]. Белок не обнаружен в мембранах субклеточных структур печени и хрусталика. К сожалению, тканевая специфичность белка определялась только на основе данных одномерного электрофореза в присутствии ДДС-Na с использованием несольобилизованного тритоном X-100 материала субклеточных структур тканей и не подтверждена иммунохимическими тестами.

Синаптический фосфопротеин В-50. Большой интерес представляет недавно описанный специфический синаптический фосфопротеин В-50 [54]—белок с M 18 кД и pI 4,5. Фосфопротеин В-50 локализован в плазматической мембране синапсом мозга крысы (компонент пресинаптической мембраны) и экстрагируется 0,5%-ным раствором тритона X-100. Он относится к нейроспецифическим белкам, поскольку обнаруживается исключительно в отделах головного мозга и отсутствует во всех других тканях и органах крысы [55]. Фосфопротеин В-50 является эндогенным субстратом синаптической протеникиназы, которая ингибируется АКТГ. Наибольшая активность этой протеникиназы проявляется в септальной области головного мозга. Оказалось также, что ингибирующее действие АКТГ на фосфорилирование белка В-50 в 10 раз более эффективно именно в этой области по сравнению с целым мозгом. В настоящее время предполагается, что система АКТГ—чувствительная протеникиназа—фосфопротеин В-50 играет определенную роль в модуляции нейропептидами пептидергических синапсов при выработке поведенческих навыков [55].

Мембранный белок синаптических везикул—синаптин. Синаптин (первоначально описанный как антиген С1 [26, 29]) является мембранным белком синаптических везикул. Его концентрация в мембранах синаптических везикул мозга крыс, определенная перекрестным иммуноэлектрофорезом, в 13,3 раза выше, чем в исходном гомогенате. Значительное количество синаптина найдено и в мембранах синапсом (в 2,9 раза выше по сравнению с исходным гомогенатом), что, видимо, объясняется неполным высвобождением везикул при гипоосмотическом разрушении синапсом [26]. Однако существует предположение, что синаптин может быть интегральным белком плазматической мембраны синапсом [56].

Иммуносорбция антисинаптином целых синапсом, плазматических мембран синапсом, целых хромаффинных гранул и их мембран позволила изучить топографию этого белка в различных мембранах [57]. Синаптин локализован на наружной поверхности синаптических везикул и хромаффинных гранул, а также на внутренней стороне плазматических мембран синапсом в секреторных гранулах нейрогипофиза быка. Этот белок присутствует в синапсом, исходя из чего было сделано предположение о физиологической роли синаптина. Он может быть белком, вовлеченным при экзоцитозе в процессе прикрепления органелл, хранящих нейротрансмиттеры, к внутренней поверхности плазматической мембраны, что приводит к высвобождению медиатора [57]. Следует учитывать, что «внутреннюю» локализацию синаптина во фракции плазматических мембран синапсом можно объяснить и в том случае, если принять, что препараты мембран загрязнены синаптическими везикулами при неполном их гипоосмотическом высвобождении. Синаптин отсутствует в первичных культурах астроглиальных клеток [29]. Методом электрофореза в ПААГ в присутствии ДДС-На показано, что синаптин представляет собой полипептид

с M_r 45 кД [57], региональное распределение которого подобно белкам Д1, Д2 и Д3.

Синапс-специфический фосфопротеин «белок 1». Белок 1 (Protein 1, синапсин) — специфический фосфопротеин синаптических окончаний нейронов [58]. Иммунохимически было показано, что белок 1 присутствует в синаптических везикулах, соединительной мембране и постсинаптическом уплотнении некоторых типов синапсов [59]. Очищенный препарат белка 1 содержит два компонента: белок 1а с M_r = 6 кД и белок 1б с M_r = 80 кД в соотношении 1 : 2, которые богаты глицином и пролином и имеют сильно растянутую структуру [58]. Белок 1 является сильно основным белком с pI = 10,4. Наибольшее его содержание было найдено во фронтальной коре, гиппокампе, таламусе, в коре мозжечка его концентрация почти в два раза ниже, а в сером веществе спинного мозга в пять раз ниже, чем в коре больших полушарий [8].

Белок 1 является эндогенным субстратом сАМР-зависимой протеникиназы в синаптических фракциях, обогащенных синаптическими соединительными мембранами. Фосфорилирование белка 1, помимо сАМР-зависимой протеникиназы, регулируется также Ca^{2+} -зависимой протеникиназой, медиаторами и деполяризующими агентами [58]. Антитела, специфические к белку 1, ингибируют фосфорилирование очищенного антигена как экзогенной сАМР-зависимой протеникиназой, так и эндогенной сАМР-зависимой протеникиназой во фракции синаптических везикул, синаптических мембран и гомогенате мозжечка [60].

Анализ продуктов деградации белка 1 коллагеназой указывает на то, что только небольшой участок молекулы, пептид с M_r 6 кД, принимает участие в прикреплении белка к синаптической мембране. Пептид с M_r 48 кД, содержащий остаток фосфорилированного серина, устойчив к действию коллагеназы и относится к той части аминокислотной последовательности белка, которая не связана с мембраной [61]. Предполагают, что белок 1 играет важную роль в функционировании синаптических везикул.

Мембранные антигены клеточной поверхности структурных элементов мозга. В разное время было описано несколько специфических мембранных антигенов, локализованных на поверхности клеток мозга. Одни из этих антигенов оказались тканеспецифичными, свойства и функции других слабо или вообще не изучены. Некоторые описанные антигены представляют собой, видимо, комплексы антигенов клеточной поверхности, определяемый по связыванию истощенных различными гетерологичными тканями антисывороток. Недостаточная изученность специфических антигенов клеточной поверхности нервных структур при использовании иммунохимических методов и подходов может быть преодолена получением и использованием моноклональных антител к этим антигенам (см. следующий подраздел). Ниже приведены перечень и краткая характеристика некоторых из антигенов клеточной поверхности нервной ткани.

В сыворотке крови нормальных мышей содержатся аутоантитела, распознающие видонеспецифичный антиген клеточной поверхности мозга МВА-2 (mouse brain antigen-2) [62], который определяется в мозгу человека, крысы, морской свинки, цыпленка и клетках нейробластомы. Из всех других тканей он обнаруживается только в почках человека.

На поверхности культивируемых клеток нейробластомы человека, а также клеток нормального мозга был описан видонеспецифический мембранный антиген мозга INMA (interspecies neural membrane antigen) [63].

Специфический мембранный гликопротеин NSA-3 локализован на мембранах 10% нейронов мозга крысы. Использование метода непрямой иммунофлуоресценции показало, что этот антиген присутствует также в перехватах Ранвье периферических нервов [64].

На клеточной поверхности глиобластомы мыши были обнаружены антигены, обозначенные как NS-1, 2, 4, 6 и 7. NS-1, по-видимому, является специфическим глиальным антигеном клеточной поверхности мозга в норме и глиобластом. Его концентрация, более высокая в областях, богатых белым веществом, постепенно возрастает в постнатальном периоде. В мозгу миелинодефицитных мутантных мышей количество этого белка снижено [65]. Антиген NS-2 состоит из двух белков с M_r 84 и 120 кД и других компонентов, ассоциированных с липидами. NS-2 выявляется только на поверхности клеток глиобластомы и мозга мышей, отсутствует в лимфоидных тканях и на поверхности нейробластомы [66]. Антиген NS-4 является тканеспецифичным и локализуется на поверхности клеток мозга, печени, селезенки и тимочитов [67]. Антигены NS-6, NS-7 обнаруживаются на поверхности клеток мозга, почек и сперматозоидов [66], то есть также являются тканеспецифичными. NS-2, NS-4, NS-6 и NS-7, видимо, являются не индивидуальными антигенами, а выявляются недифференцированно — как комплекс антигенов, что затрудняет их дальнейшее изучение [68].

Thy-1 (Θ) — гликопротеин, идентифицированный как антиген клеточной поверхности в мозгу и тимусе мышей, крыс, собаки [69]. Распределение антигена по тканям значительно варьирует у разных видов. Так, например, он присутствует в больших количествах в тимусе мышей, а в тимусе человека отсутствует. Он обнаружен в почках собаки, крысы, человека, а в почках мышей отсутствует. Несмотря на гетерогенность тканевого распределения Thy-1 у разных видов, белок найден в мозгу всех исследованных видов млекопитающих. У всех видов организмов этот белок экспрессирован преимущественно на поверхности нейронов, и лишь небольшая часть глиальных клеток имеет этот антиген. Thy-1 гликопротеин из мозга крысы был очищен и охарактеризован Barclay и соавт. [70]. Он оказался белком с M_r 24 кД. Аминокислотный состав Thy-1 гликопротеина из мозга и тимуса очень сходен, а углеводный отличается [69]. Определена аминокислотная последовательность Thy-1 гликопротеина из мозга крысы [69]. Молекула имеет две дисуль-

фидные связи. С-конец цепи содержит необычную гидрофобную область, по-видимому, связанную с липидами. Аминосакхара образуют связь с амидными группами остатков аспарагина. Последовательность и структура молекулы обнаруживают гомологию с вариабельными доменами иммуноглобулина [69]. Функциональная роль Thy-1 гликопротеина на поверхности нейронов остается неясной.

Специфические мембранные антигены мозга, идентифицированные с помощью моноклональных антител. Разработка гибридной методики получения моноклональных антител в 1975 г. [71] открыла новые широкие перспективы в исследовании мембранных тканеспецифических антигенов. В настоящее время моноклональные антитела находят применение в изучении тонкой структуры и топографии поверхностных антигенов клеточной дифференцировки, антигенов комплекса гистосовместимости, опухолеспецифических антигенов и др. [72]. Использование моноклональных антител позволяет преодолеть трудности в изучении мембранных белков и отдельных их доменов, экспрессированных на клеточной поверхности, имеющие место при обычном иммунологическом подходе, который сопряжен с гетерогенностью иммунного ответа.

Получены 4 моноклональных антитела к антигенам клеточной поверхности олигодендроцитов, обозначенным как O1, O2, O3 и O4. Эти антигены отсутствуют на поверхности астроцитов, нейронов, фибробластов, клеток ретины в клеточной культуре. В культурах мозжечка антитела к антигенам O1, O2 и O3 метят астроциты. O-антигены присутствуют в ЦНС мыши, крысы, цыпленка и человека [5]. Антигены O1 и O2 отсутствуют при рождении в мозжечке. На 7-й день постнатального развития определяются все 4 O-антигена. В клеточных культурах на разных сроках развития антигены O3 и O4 могут появляться на поверхности шванновских клеток, а O4—на поверхности нейронов ганглия дорзального корешка мыши [73].

Два различных моноклональных антитела были получены к двум антигенным детерминантам белка, локализованного на наружной поверхности мембран синаптических везикул [74]. При электрофорезе в присутствии ДДС-Na белков синаптических везикул антитела связываются только с одним полипептидом с M_r 65 кД. Белок видонеспецифичен и присутствует в мозгу рыб, амфибий, птиц и млекопитающих. Он локализован в секреторных везикулах различных типов, но только в нервной и нейросекреторных тканях. По величине M_r он отличается от ранее описанного синаптина [57]. Имобилизованные моноклональные антитела были успешно применены для очистки синаптических везикул из гомогената мозга.

При использовании гибридной методики были получены 207 моноклональных антител против культивируемых клеток мозжечка мыши. 16 из них реагировали с клеточными поверхностями мозжечка, а 4—с гликопротеинами [75]. Величина M_r одного из гликопротеинов—BSP-3 (brain surface protein) равна 48 кД. Этот белок йодирован на поверхности культивируемых клеток мозжечка. Методом иммуно-

флуоресценции показано, что белок в основном локализован на поверхности астроглиальных клеток; клетки нейронов окрашивались слабо. Олигодендроциты, эндотелиальные и лептоменингеальные клетки не окрашивались. Ранее в той же лаборатории получены моноклональные антитела против комплекса, состоящего из 3-х гликопротеинов с M_r 180, 140 и 120 кД соответственно [76]. Эти антитела связывались только с клетками нейронов мозжечка и не реагировали с астроцитами и фибробластами. Этот комплекс гликопротеинов назван BSP-2. В дальнейшем оказалось, что эти три гликопротеина не являются отдельными субъединицами одного белка, а, возможно, представляют собой три отдельных полипептида со сходной структурой, либо образующихся вследствие ограниченного протеолиза, либо независимо кодируемых дуплицированными генами [77]. Сравнение свойств отдельных компонентов BSP-2 с другими ранее изученными специфическими антигенами показывает, что высокомолекулярный гликопротеин ($M_r = 180$ кД) является, по-видимому, эквивалентом антигена NS-4. Гликопротеин с M_r 140 кД напоминает нейроспецифический белок спинального соматической мембраны мозга крысы Д2 [37, 77]. В связи с этим интересно отметить, что BSP-2 иммунохимически не обнаруживается в астроцитах в культуре, но содержится не только в нейронах, а и в астроцитах мозжечка взрослой мыши [77]. Белок Д2 также не найден в культивируемых астроцитах [30], а иммуногистохимических данных по его локализации во взрослом мозгу крысы недостаточно [31]. Таким образом, вопрос о клеточной локализации белка Д2, по-видимому, нельзя считать окончательно решенным.

С помощью моноклональных антител в мозгу человека был идентифицирован нейроспецифический сialogликопротеин с M_r 130 кД. Антигенная детерминанта, реагирующая с моноклональными антителами, в больших количествах присутствует в коре больших полушарий, белом веществе, таламусе, коре мозжечка и других отделах мозга и отсутствует в тканях печени, сердца, почки, селезенки, тимуса, лимфоузлов, эритроцитах, надпочечниках, периферических нервах. Мозг 16-недельного человеческого зародыша практически не имеет этой детерминанты. Антигенная детерминанта обнаруживается только в мозгу млекопитающих [78].

В последнее время иммуногистохимически с использованием набора мозгоспецифических моноклональных антител была показана региональная индивидуальность антигенов отдельных нервных элементов (в частности нейронов) [79, 80]. Предполагается, что такое качественное антигенное разнообразие, формирующееся при дифференцировке, лежит в основе функциональной гетерогенности нейрональных элементов [79].

Очевидно, всестороннее изучение нейроспецифических белков моноклональными антителами возможно в том случае, если имеется набор таких антител к целому ряду антигенных детерминант (эпитопов) антигена. При этих же условиях представляется возможным провести сравнительный анализ вновь обнаруженных антигенов и ранее изученных

традиционными иммунохимическими методами специфических антигенов мозга.

Несомненно, использование моноклональных антител можно рассматривать как качественно новый этап в изучении специфических мембранных белков клеточных элементов мозга.

NERVOUS SYSTEM-SPECIFIC MEMBRANE PROTEINS

BEREZIN V. A.

Chair of Biophysics and Biochemistry,
State University, Dnepropetrovsk

The modern data on cellular and subcellular localization, physical and chemical properties, functional role, tissue and species specificity of nervous system-specific membrane proteins are discussed. Synaptic plasma membrane proteins D1, D2, D3, K1, K2, K4, K5, synaptic vesicle membrane protein—synaptin, major postsynaptic density protein, phosphoprotein—protein 1, some other brain cell surface antigens and brain specific membrane antigens, identified by use of monoclonal antibodies are considered. It is noted that development of monoclonal antibody technique should be considered a new step in the investigation of nervous system-specific membrane proteins.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Moore B. W. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 19, 739—744, 1965.
2. Jacque C.—In: *Neurological mutations affecting myelination. INSERM Symp. № 14* (ed. by N. Baumann), North-Holland Biomed. Press, p. 305—319, 1980.
3. Ghandour M. S., Langley O. K., Gombos G., Vincendon G., Warecka K. *Neurosci.*, 7, 231—237, 1982.
4. Moore B. W.—In: *Advances in Neurochemistry* (ed. by B. W. Agranoff, M. H. Aprison), New York Plenum Press, p. 137—155, 1975.
5. Sommer J., Schachner M. *Develop. Biol.*, 83, 311—327, 1981.
6. Терлецкая Я. Т., Сыроватская Л. П., Козулина Е. П., Овандер М. П., Белик Я. В. *Укр. биохим. журн.*, 52, 753—758, 1980.
7. Ishaque A., Hofmann Th., Eylar E. H. *J. Biol. Chem.*, 257, 592—595, 1982.
8. Goetz S. E., Nestler E. J., Chehrizi B., Greengard P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 2130—2134, 1981.
9. Bock E., Helle K. B. *FEBS Lett.*, 82, 175—178, 1977.
10. Jorgensen O. S., Bock B. J. *Neurochem.*, 23, 879—880, 1974.
11. Белик Я. В. *Укр. биохим. журн.*, 54, 607—616, 1982.
12. Reynolds J. A.—In: *Membrane receptors. Methods for purification and characterization*. London—New York, p. 33—61, 1981.
13. Jacobs S., Cuatrecasas P.—In: *Membrane receptors. Methods for purification and characterization*. London—New York, p. 61—86, 1981.
14. Nieto A., Avila J., Valdivia M. M. *Mol. and Cell Biochem.*, 37, 185—189, 1981.
15. Starostina M. V., Malup T. K., Sviridov S. M. *J. Neurochem.*, 36, 1904—1915, 1981.
16. Haglid K. G., Stavourou D. J. *Neurochem.*, 20, 1523—1526, 1973.
17. Haglid K. G., Hamberger A., Hanson H.-A., Hyden H., Persson L., Rönnback L. *J. Neurosci.*, 2, 175—191, 1976.
18. Старостина М. В., Свиридов С. М. *Успехи соврем. биол.*, 84, 176—188, 1977.

19. Hyden H. *Comp. Biochem. Physiol.*, 67B, 413—422, 1980.
20. Donato R., Michetti F., Miani N. *Brain Res.*, 98, 561—573, 1975.
21. Higley H. R., Connelly E. M., Rowden G. J. *Histochem. Cytochem.*, 30, 577, 1982.
22. Алексидзе Н. Г., Бережной Г. А., Никурадзе В. О., Белик Я. В. *Нейрохимия*, 1, 43—50, 1982.
23. Гайнутдинов Х. Л., Старостина Н. В., Штарк М. Б. *ДАН СССР*, 255, 239—241, 1980.
24. Bock E., Dissing J. *Scand. J. Immunol.*, 4, 2, 31—36, 1975.
25. Hyden H., Rönnback L. *J. Neurol. Sci.*, 39, 241—243, 1978.
26. Bock E., Jorgensen O. S. *FEBS Lett.*, 52, 37—39, 1975.
27. Jorgensen O. S. *J. Neurochem.*, 27, 1223—1227, 1976.
28. Bock E., Brestrup C. J. *Neurochem.*, 30, 1603—1607, 1978.
29. Bock E., Jorgensen O. S., Dittman L., Eng L. F. J. *Neurochem.*, 23, 867—870, 1975.
30. Bock E., Yavin Z., Jorgensen O. S., Yavin E. J. *Neurochem.*, 35, 1297—1302, 1980.
31. Jorgensen O. S., Moller M. *Brain Res.*, 194, 419—429, 1980.
32. Jacque C. M., Jorgensen O. S., Baumann N. A., Bock E. J. *Neurochem.*, 27, 905—909, 1976.
33. Helenius A., Simons K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 529—532, 1977.
34. Jorgensen O. S. *FEBS Lett.*, 79, 42—44, 1977.
35. Rasmussen S., Ramlau J., Axelsen N. H., Bock E. *Scand. J. Immunol.*, 15, 179—185, 1982.
36. Березин В. А., Бок Э. *Укр. биохим. журн.*, 54, 502—506, 1982.
37. Jorgensen O. S. *J. Neurochem.*, 37, 939—946, 1981.
38. Jorgensen O. S., Norgaard-Pedersen B. *Prenat. Diagn.*, 1, 3—6, 1981.
39. Jorgensen O. S., Bock E. *Scand. J. Immunol.*, 4, 2, 25—30, 1975.
40. Brackenbury R., Thiery J.-P., Rutishauser U., Edelman G. M. *J. Biol. Chem.*, 252, 6840—6855, 1977.
41. Thiery J.-P., Brackenbury R., Rutishauser U., Edelman G. M. *J. Biol. Chem.*, 252, 6841—6845, 1977.
42. Jorgensen O. S., Delouvee A., Thiery J.-P., Edelman G. M. *FEBS Lett.*, 111, 39—43, 1980.
43. Rutishauser U., Gall W. E., Edelman G. M. *J. Cell Biol.*, 79, 382—393, 1978.
44. Hoffman S., Sorkin B. C., White P. C., Brackenbury R., Mailhammer R., Rutishauser U., Cunningham B. A., Edelman G. M. *J. Biol. Chem.*, 257, 7720—7729, 1982.
45. Rothbard J. B., Brackenbury R., Cunningham B. A., Edelman G. M. *J. Biol. Chem.*, 257, 11064—11069, 1982.
46. Bertolotti R., Rutishauser U., Edelman G. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 4831—4835, 1980.
47. Rutishauser U., Hoffman S., Edelman G. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 685—689, 1982.
48. Jorgensen O. S., Bock E., Bech R., Rafaelsen O. J. *Acta psychiat. scand.*, 56, 50—56, 1977.
49. Jorgensen O. S., Hemmingsen R., Kramp P., Rafaelsen O. J. *Acta psychiat. scand.*, 61, 356—364, 1980.
50. Albeck M. J., Bock E. *Protides of the biological fluids. Proc. 29th Colloq. Brussels*, 1981, 29, p. 151—154, 1982.
51. Mahadik S. P., Korenovsky A., Ciccarone V., Rapport M. M. *J. Neurochem.*, 36, 1675—1682, 1981.
52. Kelly P. T., Cotman C. W. *J. Biol. Chem.*, 252, 786—793, 1977.
53. Kelly P. T., Montgomery P. R. *Brain Res.*, 233, 265—286, 1982.
54. Zwiers H., Schotman P., Gispens W. H. J. *Neurochem.*, 34, 1689—1699, 1980.
55. Kristjansson G. I., Zwiers H., Oestretcher A. B., Gispens W. H. J. *Neurochem.*, 39, 371—378, 1982.

56. Heuser J. E., Reese T. S. J. Cell. Biol., 57, 499—524, 1973.
57. Bock E., Helle K. B. FEBS Lett., 82, 175—178, 1977.
58. Ueda T., Greengard P. L. Biol. Chem., 252, 5155—5163, 1977.
59. Bloom F. E., Ueda T., Ballenberg E., Greengard P. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 5982—5986, 1979.
60. Naito S., Ueda T. J. Biol. Chem., 25, 10657—10663, 1981.
61. Ueda T. J. Neurochem., 36, 297—300, 1980.
62. Martin S. E., Martin W. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 1036—1040, 1975.
63. Akesson R., Seeger R. C. J. Immunol., 118, 1995—2003, 1977.
64. Delpech A., Delpech B., Girard N. C. R. Acad. Sci. Paris, 288, 1323—1325, 1979.
65. Schachner M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71, 1795—1799, 1974.
66. Yuan D., Viletta E. S., Schachner M. J. Immunol., 118, 551—557, 1977.
67. Solter D., Schachner M. Develop. Biol., 52, 98—104, 1976.
68. Chaffee J. K., Schachner M. Develop. Biol., 62, 185—192, 1978.
69. Cambell D. G., Gagnon J., Reid K. B., Williams A. F. Biochem. J., 195, 15—30, 1981.
70. Barclay A. N., Letarte-Muirhead M., Williams A. F. Biochem. J., 151, 699—706, 1975.
71. Kohler G., Milstein C. Nature (London), 256, 495—497, 1975.
72. Eisenbarth G. S. Analyt. Biochem., 11, 1—16, 1981.
73. Schachner M., Kim K., Zehnle R. Develop. Biol., 83, 328—338, 1981.
74. Matthew W. D., Tsuvaler L., Reichardt L. F. J. Cell Biol., 91, 257—269, 1981.
75. Hirn M., Pierres M., Deagostini-Bazin H., Hirsch M., Golidis C., Ghandour M. S., Langley O. K., Gombos G. Neurosci., 7, 239—250, 1982.
76. Hirn M., Pierres M., Deagostini-Bazin H., Hirsch M., Golidis C. Brain Res. 214, 433—439, 1981.
77. Langley O. K., Ghandour M. S., Gombos G., Hirn M., Golidis C. Neurochem. Res., 7, 349—362, 1982.
78. Lakin K. H., Fabre J. W. J. Neurochem., 37, 1170—1178, 1981.
79. Sternberger L. A., Harwell L. W., Sternberger N. H. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 1326—1330, 1982.
80. Trisler D. Trends Neurosci. 5, 306—310, 1982.

Поступила 10. V 1983