



УДК 577.151.05:25.354

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ РЕЦЕПТОРНЫХ БЕЛКОВ,
МЕХАНИЗМЫ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННОЙ МОДИФИКАЦИИ
И ПРОБЛЕМЫ ПАМЯТИ(по материалам X Международного собрания по
нейрохимии, Рива-дель-Гарда, Италия, май, 1985 г.)

МИКЕЛАДЗЕ Д. Г.

Институт физиологии АН ГССР, Тбилиси

Регуляция биохимических превращений в нервной ткани, изменение метаболических характеристик нейронов и их морфо-функциональные изменения лежат в основе «вышей нервной деятельности животных и человека. Рецепторные белки нейротрансмиттеров, осуществляющих трансдукцию синаптического сигнала, и ферменты, принимающие участие в регуляции внутриклеточных процессов, являются основными звеньями, обуславливающими функциональную активность нервных клеток. Эти вопросы в настоящее время широко освещаются в печати и обсуждаются на мировых и региональных конференциях нейрохимиков.

Обратимая фосфорильная модификация белков является главным механизмом клеточной регуляции. Свыше трети всех ферментов, участвующих в метаболизме углеводов, белков, липидов и нуклеиновых кислот, модулируются фосфорильной модификацией. Проведение нервного импульса, действие фактора роста нервов, нейротрансмиттеров, гормонов вызывают обратимое фосфорилирование белков и ферментов, регулируя процессы биосинтеза, высвобождения нейротрансмиттеров, аксоплазматического транспорта веществ, а также изменения мембранного потенциала, транскрипции и трансляции, окислительного фосфорилирования и др. [1].

В настоящее время особое внимание уделяется Ca^{2+} -кальмодулинзависимой протеникиназе II и Ca^{2+} -фосфолипидзависимой протеникиназе C. Кальмодулинзависимая протеникиназа имеет высокую величину M_r (400—600 кД), содержится в большом количестве в нейронах и обнаруживается преимущественно в структурах коркового мозга [2—4]. Этот фермент ингибируется диэзепамом, АКТГ, дифенилгидантоном и энкефалинами. Ca^{2+} -кальмодулинзависимая протеникиназа II является чувствительной к эпилептическим разрядам нейронов и к гипоксии мозга [5, 6]. Наиболее хорошо изученной функцией протеникиназы C в нервной ткани является фосфорилирование основного белка миелина. Фосфолипидзависимая протеникиназа фосфорилирует один сериновый и один треониновый остаток основного белка, чем регулирует закручивание и сборку миелина вокруг аксона. Однако следует отметить, что фосфорилирование этого белка осуществляется также и Ca^{2+} -кальмодулинзависимой протеникиназой. Процесс фосфорилирования основного белка миелина изменяется при прохождении нервного импульса по миелинизированному волокну [7].

Интересным вопросом посттрансляционной модификации белков является ADP-рибозилирование. ADP-рибозилирование, например гистонов, модулирует структу-

ру хроматина и коррелирует с релаксацией полинуклеосома [8]. Имеются все основания предполагать, что процессы ADP-рибозилирования участвуют в транскрипции, репликации и репарации ДНК [9]. Mandel [10] показал, что высокодифференцированные клетки быстропролиферирующей культуры S_6 содержат поли-ADP-рибоза-полимеразную активность в более высокой степени, чем нормальные клетки астробластов. Также выяснено, что ADP-рибозилирование белков протекает не только в ядре, но и в цитоплазме, в частности рибонуклеопротеидных частицах и митохондриях.

Одной из наименее изученных модификаций белков является сульфатирование по тирозиновому остатку, которое происходит во многих тканях позвоночных и беспозвоночных животных. Этой модификации подвергаются, в основном, секретлируемые клеткой белки [11]. Процесс сульфатирования белков протекает в аппарате Гольджи. Предполагается, что биологическая функция сульфатирования может заключаться в увеличении способности узнавания секретлируемых белков и пептидов соответствующими рецепторами; в конформационном изменении молекулы белка и открытии определенных доменов, необходимых для трансдукции гормонального сигнала; в индуцировании диссоциации белков и пептидов с молекулы рецептора.

В настоящее время широко обсуждается биологическая роль гликозилирования поверхностных белков плазматических мембран. Обнаружено, что в процессе роста и развития нейронов изменяется структура и содержание углеводных остатков белковых молекул и, соответственно, интенсивность их обмена [12]. Предполагается, что реакции гликозилирования белков принимают участие в адгезии нейронов и глиальных клеток и определяют дифференциацию нервной ткани. Большинство рецепторных белков подвергается гликозилированию.

В изучении структуры и функции рецепторных белков достигнуты большие успехи, обусловленные внедрением методов молекулярной генетики в нейробиологию. Исследования рецепторных белков в настоящее время проводятся с применением следующих методических подходов: выделение и очистка рецепторного белка и выработка антител к нему; идентификация соответствующей мРНК, клонирование рецепторной кДНК и ее анализ и, наконец, инициация трансляции, реконструкция и встраивание рецепторных белков в модельные объекты типа ооцитов. Использование таких методик позволило выяснить функциональную значимость, пространственную ориентацию, способность сопряжения с ионными каналами и функцию ряда рецепторных белков. Клонирование кДНК никотинового ацетилхолинового рецептора, а также кДНК натриевого канала и определение нуклеотидной последовательности соответствующих генов дали возможность определить, что все четыре субъединицы рецептора имеют сходную аминокислотную последовательность, идентичный гидрофобный профиль и ориентованы в липидном слое мембраны симметрично друг к другу [13, 14]. Однако лишь α -субъединица рецептора является совершенно необходимой для связывания специфического никотинового лиганда—бунгаротоксина. В отличие от ацетилхолинового рецептора, натриевый канал образуется из одного высокомолекулярного белка, имеющего четыре внутренние гомологические последовательности, заставляющие белок принимать в мембране конформацию псевдосимметричного типа. Каждая из этих четырех последовательностей содержит уникальный сегмент аминокислотных остатков с положительным зарядом, который может участвовать в образовании потенциалчувствительных воротных механизмов.

Использование вышеописанных подходов позволило Barnard [15] обнаружить идентичность ГАМК и глициновых рецепторов. Эти белки осадились одними и теми же антителами и были сопряжены с хлорным каналом по однотипному механизму.

Demoliou-Masson, Barnard [16] выяснили, что сродство ооцитов рецепторов к лигандам K, M, Σ типов, солюбилизованных из мембран дигитонинном, зависит от наличия ионов магния в среде, в присутствии которых происходит ассоциация олигомерных белков рецептора. Ассоциацию—диссоциацию ооцитов рецепторов, кроме ионов магния, контролируют ионы натрия и гуаниловые нуклеотиды. Ис-

пользование гельпроникающей хроматографии показало, что разные типы опиатных рецепторов могут взаимопревращаться под действием полной силы.

Удалось обнаружить, что белки ГАМК-рецептора гомологичны как к белкам глицинового рецептора [15], так и к белкам рецептора бензодиазепинов. Как показали *Kuriyama* и соавт. [17], высокоочищенный ГАМК-рецептор, который проявлял чувствительность к бикикулину и содержал два белка с M_r 53—57 кД, фотоаффинно связывал 3H -флунитразем при электрофорезе в ПААГ.

Одним из важнейших рецепторов мозга является D_2 -дофаминовый рецептор, с которым связываются нейролептики бутирофенонового ряда, фармакологический потенциал которых коррелирует со сродством этих препаратов с D_2 . Количество D_2 -дофаминового рецептора в определенных ареалах мозга изменяется при шизофрении, депрессивном состоянии, психозах, паркинсонизме и других формах патологии ЦНС. Несмотря на функциональную значимость D_2 -дофаминового рецептора, биохимический механизм сопряжения D_2 с внутриклеточными системами не выяснен. Поэтому определенный интерес представляют данные *Simmonds, Strange* [18], показавших, что усиление фосфоинозитольного обмена в передней доле гипофиза, индуцируемое аналогом тирозинерина DN 1417, подавляется агонистами D_2 -рецептора. Антагонисты D_2 -галоперидол, спироперидол и (+)-бутакамол снимали ингибирующий эффект агонистов (дофамин и апоморфин).

Reddington и соавт. [19] изучали распределение и свойства аденозинного рецептора, содержащегося в большом количестве в гиппокампе, с использованием двух агонистов: 3H -циклогексинаденозина и 3H -N-этилкарбоксамидоаденозина. Первый из этих лигандов взаимодействует с A_1 субтипом рецептора, вызывает ингибирование аденилатциклазы и модулирует синаптическую передачу. Этот рецептор в большом количестве содержится в гиппокампе. Второй используемый лиганд специфически связывается как с A_1 , так и с A_2 . Последний сопряжен с аденилатциклазой, локализован преимущественно в полосатом теле и фармакологически отличается от A_1 .

Классическими критериями идентификации лиганд-рецепторных взаимодействий являются насыщенность, обратимость, специфичность и высокая корреляция между связывающими параметрами и биологическим эффектом фармакологического соединения. Используя разные кинетические подходы, *Simonet* и соавт. [20] показали существование двух рецепторов ангиотензина в культивируемых нейронах спинного мозга. Электрофизиологические опыты подтвердили наличие двух рецепторов этого пептида. Такой же подход был применен *Asakura* и соавт. [21], изучавшими регуляцию двух аффинных состояний α_2 -рецептора норадреналина. Было показано, что N-этилмаленид и GTP вызывают переход высокоаффинного состояния рецептора в низкоаффинное, что свидетельствует в пользу модели двухстадийной реакции с образованием четвертичного комплекса GTP-связывающего белка, рецептора и лиганда.

В настоящее время выясняется, что α -адренорецепторы локализованы, в основном, в тех структурах мозга, которые имеют самое непосредственное отношение к процессам высшей нервной деятельности. Выяснено, что разрушение септальных ядер вызывает понижение холинацетилтрансферазной активности в гиппокампе и уменьшение числа мест связывания 3H -празозиона с α_1 -адренорецептором. Однако в отличие от холинацетилтрансферазы, количество этого рецептора восстанавливалось на 10—14-ый день после операции [22]. Эти изменения не затрагивали α_2 - или β -адренергические рецепторы, что свидетельствует об участии лишь α_1 -рецепторов в септо-гиппокампальных афферентах. Было также обнаружено наличие тесной взаимосвязи между серотонинергическими и α -адренергическими системами мозга [23]. Использование специфических нейротоксинов типа 5,7-дигидрокситриптамина позволило авторам прийти к заключению, что серотонин осуществляет гетерологическую регуляцию двух субтипов α -адренорецепторов.

Современные подходы к изучению проблем памяти можно подразделить на три группы: а) исследование биохимических коррелятов элементарных поведенческих актов простейших организмов; б) изучение сложных поведенческих реакций организма и выяснение биохимических коррелятов этих реакций; в) построение теоретических

моделей на основании известных биохимических реакций в синапсах. Совокупность полученных данных позволяет выделить те основные процессы, которым придается первостепенное значение в явлениях обучения и памяти.

В лаборатории *Kandel* [24] давно ведутся исследования по выяснению биохимических механизмов, лежащих в основе простейших рефлекторных действий моллюска *Aplysia*. Показано, что сенсорные нейроны при условном раздражении моллюска подвергаются пресинаптическому «облегчению», которое опосредуется изменением внутриклеточной концентрации сАМР. Количество последней в этом случае изменяется не только из-за активирования аденилатциклазы нейропередатчиком (серотонином), но и вследствие повышения содержания пресинаптического кальция, который через кальмодулин также усиливает активность фермента. Аденилатциклаза является ключевым ферментом, участвующим в хранении информации. Мутант дрозофилы *Rutabaga* имеет дефективную краткосрочную память и, соответственно, низкий уровень аденилатциклазной активности, причем в мутантах понижена аденилатциклазная активность обусловлена уменьшением базальной forskолинимулируемой реакции и потерей чувствительности каталитической субъединицы к ионам кальция [25].

В другой серии опытов показано, что ассоциативное обучение моллюска *Hermissenda graciosa* связано с изменением внутриклеточной концентрации Ca^{2+} и кальцийзависимым фосфорилированием белков [26]. Протеинкиназа модифицирует белки ионных каналов и изменяет активность последних.

Нейрохимические реакции, лежащие в основе обучения и памяти, должны соответствовать определенным условиям. Во-первых, основные биохимические сдвиги должны протекать в основном в синаптических образованиях и преимущественно в структурах коры головного мозга; во-вторых, специфические биохимические реакции должны запускаться относительно слабым воздействием и ответные изменения должны быть ассоциативными и, в-третьих, они должны приводить к изменениям эффективности синаптической передачи. Опытами, проведенными *Beardry* [27], показано, что изменение нейрональной активности в процессе обучения сопровождается увеличением концентрации кальция в дендритных шипиках, что приводит к активации ряда Ca^{2+} -зависимых ферментов, в том числе Ca^{2+} -зависимой протеазы (кальпаина). Увеличение активности этого фермента вызывает протеолитическое расщепление цитоскелетных белков (типа спектрина), и следовательно—изменение формы дендритного шипика и перераспределение рецепторного белка вдоль мембраны.

Из экстракционных белков, участвующих в процессах обучения и памяти, привлекают к себе внимание так называемые эпендимы. Эти гликопротеины являются специфическими для НС золотых рыбок, и скорость их обновления усиливается в процессе обучения. *Shashoua* [28] показал, что эпендимы состоят из двух белков с величинами M_r 37000 и 31000, связанных между собой дисульфидными мостиками. Эти белки синтезируются и высвобождаются во внеклеточную жидкость определенным типом нейросекреторных клеток. В отсутствие ионов кальция эпендимы агрегируют настолько сильно, что их невозможно растворить даже в кипящем растворе 1% ДДС-Na в 6 М мочеvine. Введение антител эпендимов в СМЖ золотых рыбок приводит к полной потере способности к воспроизведению запоминаемой информации. Предполагается, что эпендимы участвуют в синаптических процессах при консолидации памяти. Привлекает внимание то, что антитела против эпендимов имеют перекрестную активность в отношении белка S-100 [29].

В настоящее время принято считать, что в основе краткосрочной памяти должны лежать феномены типа посттетанической потенциации и гетеросинаптического «облегчения». *Kuroda* [30] привел экспериментальные доказательства гипотезы относительно аденозинного происхождения посттетанической потенциации. Тетаническое раздражение, а также обработка клеток аденозином увеличивают концентрацию сАМР в пресинаптических терминалях. Повышение концентрации сАМР усиливает кальциевый ток, что со своей стороны стимулирует активность аденилатциклазы. В конечном итоге усиливается выброс нейропередатчиков и наблюдается феномен гетеросинаптического «облегчения».

Таким образом, полученные в последнее время данные относительно молекулярной организации рецепторных белков свидетельствуют о том, что большинство рецепторов состоит из мономерных структур, образуя сложный олигомерный симметричный комплекс в мембране. В надмолекулярной организации рецепторного комплекса принимают участие ферменты, осуществляющие посттрансляционную модификацию белков. Процессы фосфорилирования, ADP-рибозилирования и гликозилирования тесно связаны с активностью рецепторного комплекса и вызывают изменения оперативных характеристик синаптической передачи. Эти изменения отражаются на элементарной условно-рефлекторной деятельности простейших организмов и могут лежать в основе высших интегративных функций мозга животных и человека. Этот краткий обзор новейших данных в области молекулярной организации рецепторных белков, регуляции ферментов, участвующих в посттрансляционной модификации, и биохимических реакций, лежащих в основе памяти, построен в основном на материалах X Международного собрания по нейрохимии в г. Рива-дель-Гарда (Италия) и свидетельствует о важной роли указанных процессов в функциональной активности ЦНС.

RECEPTOR PROTEINS, MECHANISMS OF POSTTRANSLATIONAL MODIFICATIONS AND MEMORY (X-th MEETING OF ISN, RIVA-DEL-GARDA, ITALY, MAY 1985)

MIKELADZE D. G.

Institute of Physiology, Georgian SSR Academy of Sciences, Tbilisi

The review covers modern ideas about molecular organization of a number of receptor proteins (GABA, dopamine, adenosin, α_1 and α_2 -adrenoreceptors etc). Analysis of the functional importance of posttranslational modifications of proteins in CNS (phosphorylation, glycosylation, ADP-ribosylation and others) is given. Biochemical mechanism of the behavioural reactions in different types of animals are discussed.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Nestler E. J., Walaas S. I., Greengard P. *Sciences*, v. 225, p. 1357—1364, 1984.
2. Kennedy M. B. J. *Neurochem.*, v. 44, suppl, S3, 1985.
3. Gomcz M. V., Ribeiro A. M. J. *Neurochem.*, v. 44 suppl, S30, 1985.
4. Navone F., Jahn R., Schiebler W., Greengard P., De Camilli P. J. *Neurochem.*, v. 44 suppl, S30, 1985.
5. Wasterlain C. G., Farber D. B., Bronstein J. M., Fairchild D. J. *Neurochem.*, v. 44 suppl, S58, 1985.
6. Wasterlain C. G., Powell C. L., Bronstein J. M. J. *Neurochem.*, v. 44 suppl, S180, 1985.
7. Murray N., Steck A. J. J. *Neurochem.*, v. 44 suppl, S30, 1985.
8. Niedergang C. P., Murcia G., Ittel M-E., Pouyet J., Mandel P. *Eur. J. Biochem.*, v. 146, p. 185—191, 1985.
9. Mandel P., Okazaki H., Niedergang C. *Progr. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.*, v. 27, p. 1—51, 1982.
10. Mandel P. J. *Neurochem.*, v. 44 suppl, S61, 1985.
11. Huttner W., Baurle P., Hille A., Lee R., Por S., Rosa P. J. *Neurochem.*, v. 44, suppl, S4, 1985.
12. Ploegh H. L. J. *Neurochem.*, v. 44 suppl, S4, 1985.
13. Mishina M., Kurosaki T., Tobimatsu T., Morimoto Y., Noda M., Yamamoto T., Terao M., Lindstrom J., Takahashi T., Kuno M., Numa S. *Nature*, v. 307, p. 604—608, 1984.

14. *Numa S.* J. Neurochem., v. 44 suppl, S1, 1985.
15. *Barnard E. A.* J. Neurochem., v. 44 suppl, S5, 1985.
16. *Demoliou-Mason C. D., Barnard E. A.* J. Neurochem., v. 44 suppl, S6, 1985.
17. *Kuriyama K., Taguchi J., Kimura H.* J. Neurochem., v. 44 suppl, S40, 1985.
18. *Simonds S. H., Strange P. G.* J. Neurochem., v. 44 suppl, S76, 1985.
19. *Reddington M., Erfurth A., Lee K. S.* J. Neurochem., v. 44 suppl, S41, 1985.
20. *Simmonet G., Laribi C., Legendre P., Durouy B., Vincent J. D.* J. Neurochem., v. 44 suppl, S41, 1985.
21. *Asakura M., Tsukamoto T., Imafuki J., Matsui H., Saitoch N., Hasegawa K.* J. Neurochem., v. 44 suppl, S34, 1985.
22. *Forloni G., Wang L.-Y., Vinci R., Consolo S., Ladinsky H. J.* J. Neurochem., v. 44 suppl., S82, 1985.
23. *Rappaport A., Sturtz F., Guicheney P.* J. Neurochem., v 44 suppl, S85, 1985.
24. *Abrams T. W., Kandell E. R.* J. Neurochem., v. 44 suppl, S12, 1985.
25. *Dudai Y., Sher B.* J. Neurochem., v. 44 suppl, S13, 1985.
26. *Neary J. T., Acosta-Urquidi J., Alkon D. L.* J. Neurochem., v. 44 suppl, S13, 1985.
27. *Baudry M. J.* J. Neurochem., v. 44 suppl, S13, 1985.
28. *Shashona V. E.* J. Neurochem., v. 44 suppl, S14, 1985.
29. *Schmidt R.* J. Neurochem., v. 44 suppl, S21, 1985.
30. *Kuroda Y. J.* J. Neurochem., v. 44 suppl, S21, 1985.

Поступила 4. X 1985