



нию комплекса актомиозина при взаимодействии миозина с актином. 6S-тубулин снижает  $Mg^{2+}$ -АТФазную активность актомиозина. В последующей работе было показано [5], что колхицин и  $Ca^{2+}$  не влияют на связывание миозина скелетных миоцитов кролика с тубулином мозга свиньи. Одно из двух мест связывания у миозина оказалось общим с тубулином и актином. В этих опытах отмечается, что тубулин не влияет на  $Mg^{2+}$ -АТФазную активность миозина.

Микротрубочки способны связываться с актином, образуя стабильную сеть, при этом происходит поперечное сшивание фибрилл [6]. В дальнейшем выяснено [7], что актиновые микрофиламенты связываются с высокомолекулярными белками, ассоциированными с микротрубочками, но не связываются с тубулином. Природа этого белок-белкового взаимодействия пока не ясна. Интересно отметить, что в этих условиях актин не стимулирует АТФазную активность указанных высокомолекулярных белков.

Дать окончательную оценку вышеназванным данным пока трудно, однако они указывают на определенную взаимосвязь двух сократительных систем.

Рассмотрим экспериментальные данные об АТФазной активности микротрубочек мозга. Впервые динениподобный белок из мозга выделен в 1974 г. [8]. Он был сходен с классическим диненином по значениям  $M$  и  $R_f$ . Одновременно появилась работа по выделению динениподобной АТФазы из препаратов микротрубочек мозга [9], хотя и с меньшей активностью, чем диненин. Возможно, что динениподобный белок мозга активен тогда, когда он связан функционально с интактными микротрубочками. Если диненин состоит из двух изоформ с константами седиментации 14 и 30 S, то динениподобный белок состоит из двух изоформ, но с другими значениями констант седиментации—18 и 23 S. Это различие могло быть связано с процедурой выделения.

В недостаточно очищенном препарате тубулина обнаруживается АТФазная активность [10], однако в очищенном тубулине эта активность отсутствует [11]. В составе препарата тубулина мозга находятся связанные с тубулином высокомолекулярные белки, которые регулируют самосборку тубулина в микротрубочки. Эти белки получили название—белки, ассоциированные с микротрубочками (БАМ). Показано [12], что один из белков БАМ обладает АТФазной активностью. По-видимому, он входит в состав филаментозных ответвлений от осевого цилиндра микротрубочек—«ручек» (или «мостиков») диаметром 5—10 нм и подобен диненину—белку «ручек» наружных дублетов ресничек или жгутиков. «Ручки» микротрубочек мозга состоят из трех белков фракции БАМ с  $M$  271, 286 и 345 кД, именно последний из этих трех белков подобен диненину по значению  $R_f$ .

«Ручки» микротрубочек мозга наблюдаются как *in situ*, так и у реконструированных микротрубочек *in vitro*. При помощи этих «ручек» микротрубочки мозга прикрепляются к клеточным мембранам. Из-за трудностей подбора фиксирующих средств электронномикроскопически

не всегда удается выявить «ручки» в микротрубочках мозга. В двигательных функциях микротрубочек важную роль играют, помимо АТРаза «ручек», также процессы фосфорилирования белков. В частности, в препаратах микротрубочек выявлена сАМР-зависимая протеникиназа, фосфорилирующая тубулин и белки фракции БАМ [13]. Фосфорилирование и дефосфорилирование высокомолекулярных белков БАМ может иметь триггерный механизм в двигательных функциях микротрубочек. Во фракции БАМ также выявлен белок — ингибитор протеникиназы.

Banks [14] исследовал АТРаза активностью в препаратах микротрубочек селезеночного нерва быка. В этих препаратах обнаружены два пептида с  $M$  300 кД, сходные по значению  $M$  с динейном. Активность  $Mg^{2+}$ -АТРаза препарата микротрубочек оказалась довольно низкой (0,024 мкмоль  $P_i$ /мг белка/ч). Оптимум для субстрата (АТР) — 1 мМ, оптимум рН — 7,0—7,2. Активность  $Ca^{2+}$ -АТРаза была еще меньше, чем  $Mg^{2+}$ -АТРаза. Субстратная специфичность снижалась в ряду: АТР  $\gg$  ГТР  $>$  ГТР  $\gg$  АДР.

В этой же работе указывается, что в препарате микротрубочек содержатся фосфолипиды и выявляется  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТРаза активностью, что указывает на невысокую степень очистки микротрубочек. В этом же препарате микротрубочек не обнаруживалась миозинподобная  $K^+$ -ЭДТА-АТРаза активностью. Активность  $Mg^{2+}$ -АТРаза очищенного тубулина в данной работе составляла 0,008 ед. Следует сразу же оговориться, что данные о присутствии  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТРаза активностью в микротрубочках мозга не подтвердились [15, 16].

Из микротрубочек аксонов кальмара выделена фракция БАМ, соосажающаяся вместе с тубулином и способная регулировать полимеризацию тубулина в микротрубочки [17]. В составе фракции БАМ электрофоретически обнаружен пептид с  $M$  200 кД, сходный, по мнению авторов, с тяжелой субъединицей мышечного миозина.

В препаратах микротрубочек мозга быка присутствует некая АТРаза, которая способна к коседиментации с микротрубочками. Присутствие в препаратах примесей актина и миозина не сказывается на активности этой новой, по-видимому, динейновой АТРаза, которая может участвовать в механохимическом сопряжении микротрубочек [15].

Webb [16] показал, что в препаратах микротрубочек мозга быка активность  $Mg^{2+}$ -ГТРаза выше, чем активность  $Mg^{2+}$ -АТРаза. В ходе очистки АТРаза выделяется вместе с микротрубочками: и удельная активность связанного фермента остается постоянной в циклах полимеризации — деполимеризации в ходе очистки микротрубочек. Данная АТРаза менее активна в связанном виде, чем в состоянии, когда микротрубочки деполимеризованы. Значение  $K_m$  для АТР равно 0,9 мМ. Активность  $Mg^{2+}$ -АТРаза в данных опытах увеличивалась в присутствии 5 мМ  $Ca^{2+}$ , снижалась в присутствии GDP (200—600 мкМ) и NaCl (67—111 мМ). Убаин, колхицин и винбластин не влияли на активность  $Mg^{2+}$ -АТРаза препаратов микротрубочек. Считается, что дан-

ная АТРаза необходима для АТР-индуцируемой и GDP-зависимой полимеризации тубулина, но не для GTP-индуцируемой полимеризации. Чистый тубулин полимеризуется в присутствии GTP, но не в присутствии АТР + GDP. Фракция тубулина, содержащая АТРазную активность, полимеризуется в присутствии АТР или GTP. Очищенный тубулин АТРазной активностью не обладает.

Wallin и соавт. [18] подробно изучили АТРазную активность в препаратах микротрубочек мозга быка. При pH 6,8 активность  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$ -АТРазы равна 2,9 и 3,1 ед., а при pH 8,0—2,5 и 3,5 ед. соответственно. Во фракции БАМ также измерялась АТРазная активность. Показано, что р-хлормеркуробензолсульфокислота при pH 6,8 активирует (на 16%)  $Mg^{2+}$ -АТразу препарата микротрубочек при низких концентрациях ( $10^{-6}$ — $10^{-7}$  М) и значительно ингибирует  $Mg^{2+}$ -АТразу при высоких концентрациях ( $\geq 10^{-4}$  М), в то время как  $Ca^{2+}$ -АТРаза только ингибируется при высоких концентрациях тиолового реагента. Другой тиоловый агент — N-этилмаленид действует на АТразу препарата микротрубочек аналогичным способом. При pH 8,0 первый реагент только ингибирует, а второй только активирует АТразу. Пренкубация обоих тиоловых агентов в присутствии АТР (pH 6,8) приводит к стимуляции  $Mg^{2+}$ -АТРазы микротрубочек. При использовании фракции БАМ при pH 6,8 оба реагента действовали также на АТРазную активность, но менее эффективно. Согласно авторам, АТРаза препаратов микротрубочек мозга по своему отношению к тиоловым реагентам подобна как диненну, так и миозину. В последующей работе этой группы исследователей [19] показано, что АТРаза микротрубочек мозга активируется ионами  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$  (1—2 мМ) практически одинаково (0,18—0,27 ед) и имеет оптимум pH 8,0. При pH 6,8 во фракции очищенного тубулина выявляется лишь  $Ca^{2+}$ -АТРазная активность. При разделении микротрубочек (на фосфоцеллюлозе) на тубулин и БАМ АТРазная активность главным образом определяется в последней фракции. В этом случае АТРазная активность тормозилась NaF (10 мМ), ЭДТА и в среде с высокой ионной силой (0,6 М KCl), но не изменялась в присутствии ванадата (0,1 мМ), ЭГТА и уабанина. Значение  $K_m$  для АТР как для  $Mg^{2+}$ , так и для  $Ca^{2+}$ -АТРазы равно 25 мкМ,  $M \geq 200$  кД, активность АТРазы сосредоточена в препаратах микротрубочек с  $K_s = 30$ —36 (тип «кольцо — спираль»). На основании полученных данных делается вывод о сходстве исследований АТРазы микротрубочек мозга с диненном и миозином (см. таблицу), хотя и имеются некоторые отличия этой АТРазы от миозиновой, например, по ионной регуляции.

По данным Shelanski, Liem [20], тубулин мозга не обладает  $Mg^{2+}$ -АТРазной активностью, однако добавка субъединиц нейрофиламентов при самосборке микротрубочек придает структуре  $Mg^{2+}$ -АТРазную активность.

Японские исследователи обнаружили в препаратах микротрубочек мозга крыс АТРазную активность [21]. Хроматографический анализ

микротрубочек указывал на то, что АТРаза прочно связана с белками фракции БАМ. Интересно, что очищенный тубулин резко стимулирует АТРадную активность микротрубочек. Этот факт нам кажется очень важным. Известно, что тубулин мозга свиней также стимулирует АТРаду диненна ресничек [22]. По-видимому, в обоих случаях образуется комплекс типа тубулин—динени аналогично комплексу актомиозина. Обнаружено [21], что  $\text{Ca}^{2+}$  (8—10 мМ) тормозит  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРаду микротрубочек мозга, но активирует фермент микротрубочек в присутствии тубулина. Ионы магния таким действием не обладают. Активность частично очищенной АТРады при 37° составляет 0,5—0,8 ед, значение  $K_m$  для АТР равно  $3 \cdot 10^{-5}$  М.  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРаза микротрубочек тормозится в среде с 0,2 М КСl или  $\text{NH}_4 \text{Cl}$ , но не ингибируется ванадатом, колхицином и уабанном.

Таблица

Сходство и отличия АТРады микротрубочек мозга по сравнению с АТРадой миозина и диненна [19]

Параметр	Микротрубочки	Динени	Миозин
М	> 200 кД (?)	520 кД	470—540 кД
Оптимум рН	8,0	6,5—10,5	6,0 и 9,5
Стимуляция ионами	$\text{Mg}^{2+}$ , $\text{Ca}^{2+}$ (1—2 мМ)	$\text{Mg}^{2+}$ , $\text{Ca}^{2+}$ (10—20 мМ)	$\text{Ca}^{2+}$ ; 0,6 МКСl + ЭДТА
Ингибиторы	NaF, ЭДТА	Ванадат, ЭДТА	$\text{Mg}^{2+}$
Субстратная специфичность	Низкая	Высокая	Низкая
$K_m$ для АТР, мкМ	25	11—50	< 30

Польские исследователи [23] показали, что в препаратах микротрубочек мозга, полученных методом сборки-разборки, обнаруживается АТРадная активность. Гистохимически обнаружена АТРадная активность в микротрубочках коры мозга крыс [24, 25], при этом активность значительно тормозилась высокими концентрациями фиксатора глутаральдегида [24]. Гистохимически в ткани нервов краба, улитки и мозга крыс обнаруживается в микротрубочках  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРадная активность [26]. Для выявления этой активности необходимы  $\text{Pb}^{2+}$ ; 1% глутарат (но не 2—3%), рН 7,6; АТР. В присутствии GTP (вместо АТР) активность также выявляется, хотя и в меньшей степени. На  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРадную активность не влияют цистеин и NaF.

Во фракции БАМ, выделенной из микротрубочек мозга быка, обнаружена АТРадная активность [27]. Субстратами этой АТРады являются АТР и GTP. Электрофоретический анализ показал, что данная АТРаза микротрубочек отличается от АТРады саркоплазматического ретикулула,  $\text{F}_1$ -АТРады митохондрий,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРады, и от АТРады миозина и диненна.

Недавно обнаружено [28], что микротрубочки мозга быка содержат динени, который по своим свойствам ( $K_s$ , радиус Стокса, пептидные карты) сходен с диненином аксонем жгутиков и ресничек, однако отличается по ферментативным свойствам. Нуклеотидтрифосфатаза ди-

ненна мозга по сравнению с диненном сперматозондов млекопитающих была менее чувствительна к ингибирующему действию ванадата и гидролизовала GTP и ITP с большей скоростью, чем АТР. В работе Murphy и сотр. [29] отмечается, что диненная АТРаза (активность 0,6 ед) при очистке выделяется вместе с микротрубочками. При отсутствии детергентов фермент агрегирует и может быть отделен от микротрубочек. Выделенный динени (M 150 кД) состоит из двух субъединиц. Эти же авторы [30] идентифицировали и сравнили АТР-связывающие пептиды диненна жгутиков сперматозондов морского ежа и очищенного препарата  $Mg^{2+}$ -АТРаза микротрубочек мозга быка при помощи фотоаффинного аналога АТР — 8- $N_3$ АТР. Анализ меченых продуктов методом электрофореза и радиоавтографии показал, что фотолиз индуцировал значительное избирательное мечение компонента  $Mg^{2+}$ -АТРаза с M = 55 кД и компонента диненна с M = 45 кД. В результате фотолиза АТРазная активность препаратов обоих белков тормозилась на 30%. Очищенный актин и тубулин мозга лишь слабо метились 8- $N_3$ АТР. Предполагается, что АТР-связывающий центр обоих белков является каталитическим и ответственным за гидролиз АТР.

В препаратах тубулина мозга содержится также ГТРазная активность, эта АТРаза ассоциирована с тубулином и необходима для полимеризации тубулина в микротрубочки [31, 32]. Недавно показано, что эта ГТРаза модулируется сАМР,  $Ca^{2+}$  и АТР [33]. В данной работе обнаружено, что препарат тубулина мозга, содержащий связанный GDP, гидролизует субстрат GTP со скоростью в 1,5 раза больше, чем препарат, содержащий связанный АТР. В присутствии сАМР скорость гидролиза GTP возрастает в 1,5—3 раза. Для стимуляции ГТРаза, вызванной сАМР, не требуется присутствия АТР в среде инкубации. Это указывает на то, что такая стимуляция не связана с действием сАМР-зависимой протеникиназы, ассоциированной с микротрубочками. Хотя использовавшийся препарат тубулина содержал мало или совсем не содержал кальмодулина, ионы  $Ca^{2+}$  в концентрации 10 мкМ значительно (на 50%) тормозили ГТРажную активность препарата. Процесс полимеризации тубулина в препарате не тормозился  $Ca^{2+}$  в такой же концентрации. Ингибирование ГТРаза ионами  $Ca^{2+}$  наблюдалось как в присутствии, так и в отсутствие АТР, что указывает на то, что данный эффект не связан с действием  $Ca^{2+}$  кальмодулин-зависимой протеникиназы. Присутствие АТР по-разному влияло на вызываемую сАМР активацию ГТРаза в препаратах, содержащих связанный GTP и GDP. Как стимулирующее действие сАМР, так и ингибирующее действие  $Ca^{2+}$  наблюдалось лишь в первые 2 мин после начала полимеризации тубулина, т. е. лишь во время фазы нуклеации микротрубочек. В период элонгации, а также после достижения равновесия реакции полимеризации тубулина, ни сАМР, ни  $Ca^{2+}$  не влияли на ГТРажную активность препарата тубулина. Таким образом, АТРаза в

нативных микротрубочках мозга, вероятно, локализована в «ручках» (во фракции БАМ), а ГТРаза—в тубуллин.

Несмотря на некоторую противоречивость изложенных фактов, можно сделать следующие предварительные выводы:

— в высокомолекулярных белках, ассоциированных с микротрубочками мозга, содержится АТРаза, напоминающая по своим свойствам динени;

— данная АТРаза, по-видимому, принимает участие в механическом сопряжении при функционировании микротрубочек мозга.

## АТРаза ACTIVITY OF BRAIN MICROTUBULES

GLEBOV R. N., KRYZHANOVSKY G. N.

Institute of General Pathology and Pathological Physiology, USSR  
Academy of Medical Sciences, Moscow

The review is devoted to the interaction of actine microfilaments with microtubules that is of great importance for functioning of brain cells, cytoskeleton net. On summarizing the existent literature it may be suggested that the dynein-like ATPase is localized in the "handles" of brain microtubules. The motor function of the microtubules may be due to an ATPase of this kind.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Глебов Р. Н., Крыжановский Г. Н. Функциональная биохимия синапсов, М., Медицина, 1978.
2. Satir P. In: Cell motility, Cold Spring Harbor conferences on cell proliferation. Cold Spring Harbor Lab., 3, 841—846, 1976.
3. Hayashi M. J. Biochem. 85, 3, 691—698, 1979.
4. Fujii T., Tanaka R. Life Sci., 24, 1683—1690, 1979.
5. Shimo-Oka T., Hayashi M., Watanabe Y. Biochemistry, 19, 4921—4926, 1980.
6. Griffith L. M., Pollard T. D. J. Cell Biol., 78, 958—965, 1978.
7. Griffith L. M. Eur. J. Biochem., 22, 270—296, 1980.
8. Burns R., Pollard T. FEBS Lett., 40, 274—280, 1974.
9. Gaskin F., Kramer S., Cantor C., Adelstein R., Shelanski M. FEBS Lett., 40, 281—286, 1974.
10. Nagayama A., Dales S. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 65, 464—471, 1970.
11. Azai T., Kaziro Y. Biochem. Biophys. Res. Comm., 69, 369—376, 1976.
12. Murphy D., Borisy G. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 2696—2701, 1975.
13. Глебов Р. Н. Успехи совр. биол., 91, 3, 433—450, 1981.
14. Banks P. J. Neurochem., 27, 1465—1471, 1976.
15. Gelfand V. J., Gyoeva F. K., Rosenblat V. A., Shanina N. A. FEBS Lett., 88, 197—200, 1978.
16. Webb B. C. Arch. Biochem. Biophys., 198, 296—303, 1979.
17. Sakai H., Matsumoto G. J. Biochem., 83, 1413—1422, 1978.
18. Wallin M., Larsson H., Edström A. J. Neurochem., 33, 1095—1099, 1979.
19. Larsson H., Wallin M., Edström A. J. Neurochem., 33, 1249—1258, 1979.
20. Shelanski M. L., Liem R. K. H. J. Neurochem., 33, 5—13, 1979.
21. Jhara Y., Fujii T., Arai T., Tanaka R., Kaziro Y. J. Biochem., 86, 587—590, 1979.

22. *Hoshino M.* Biochim. Biophys. Acta, 462, 49—62, 1977.
23. *Turyna B., Pozniczek M.* Lesz. nauk. UJ, 549, 39—44, 1979.
24. *Fitzsimon J. T. R., Kerkut G. A., Sharp G. A.* J. Physiol., 278, 96—97, 1978.
25. *Sharp G. A.* Comp. Biochem. and Physiol., A66, 3, 415—429, 1980.
26. *Kerkut G. A., Sharp G. A., Fitzsimons J. T. R.* Comp. Biochem. and Physiol., B67, 3, 485—492, 1980.
27. *White H. D., Coughlin B. A., Purich D. L.* J. Biol. Chem. 255, 486—491, 1980.
28. *Baccetti B., Burrini A. G., Dallai R., Pallini V.* Eur. J. Cell Biol., 22, 292, 1980.
29. *Murphy D. B., Hlebsch R. R.* Eur. J. Cell Biol., 22, 1, 291, 1980.
30. *Hlebsch R. R., Murphy D. B., Haley B. E.* J. Cell Biol., 87, part. 2, 37, 1980.
31. *Jacobs M., Smith H., Taylor E. W.* J. Molec. Biol., 89, 455—468, 1974.
32. *Maccioni R., Seeds N. W.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 462—466, 1977.
33. *Helmberg K.-W., Burg J., Doenges K. H.* Eur. J. Cell Biol., 22, 296, 1980.

Институт общей патологии  
и патологической физиологии  
АМН СССР, Москва

Поступила 2. X 1981