

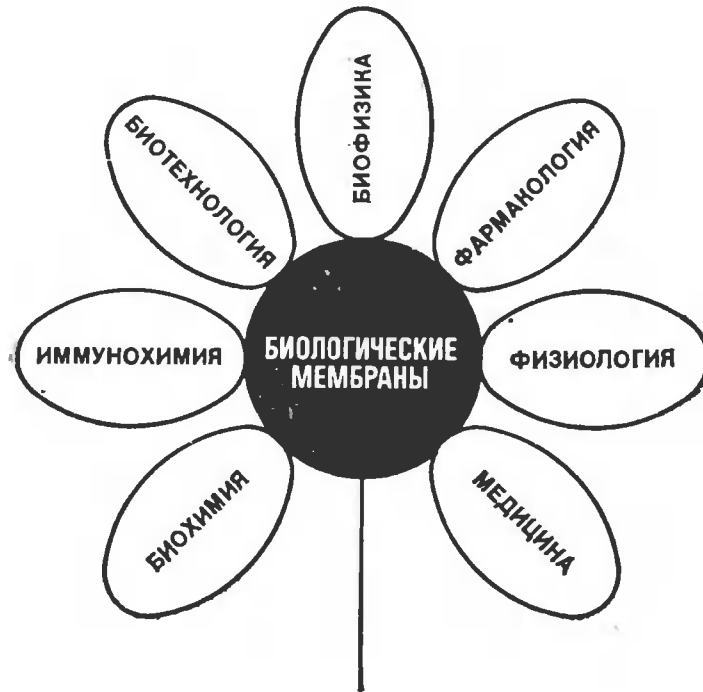
5638

БИОХИМИЯ МЕМБРАН

А. Я. КУЛЬБЕРГ

Рецепторы клеточных мембран





БИОХИМИЯ МЕМБРАН

Под редакцией
А. А. Болдырева

Книга 4

А. Я. КУЛЬБЕРГ

Рецепторы клеточных мембран

Допущено Министерством высшего и
среднего специального образования
СССР в качестве учебного пособия
для студентов биологических и
медицинских специальностей высших
учебных заведений



МОСКВА
«ВЫСШАЯ ШКОЛА» 1987

ББК 28.05
Б 63
УДК 577.1

Рецензенты:

кафедра биофизики 2-го Московского государственного медицинского института имени Н. И. Пирогова (зав. кафедрой проф. Ю. А. Владимиров);
чл.-кор. АН СССР, проф. А. А. Богданов (Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова)

Биохимия мембран: Учеб. пособие для биол. и мед. Б 63 спец. вузов/Под ред. А. А. Болдырева. Кн. 4. А. Я. Кульберг. Рецепторы клеточных мембран. — М.: Высш. шк., 1987. — 103 с.: ил.

В пособии впервые в отечественной литературе систематически изложены современные сведения о строении, биосинтезе и функциях рецепторов клеток эукариот, их значение для биологии клетки и многоклеточных организмов. Рассмотрены общие принципы организации рецепторов, строение их активных центров, структурные основы эффекторных функций. Приведены данные о молекулярной генетике рецепторов и регуляции процессов их биосинтеза и катаболизма. Освещены новые направления в изучении роли рецепторов в поддержании постоянства внутренней среды клетки, их участия в регуляции и биосинтезе белка.

Б 2007020000(4309000000)—364 20—87
001(01)—87

ББК 28.05
57.04

Предисловие

К числу фундаментальных проблем науки о биологических мембранах принадлежит проблема клеточных рецепторов. Эти важнейшие мембранные белки начали глубоко изучаться лишь в последние годы, однако за короткий срок накоплен обширный фактический материал, изучение которого существенно для понимания функциональной роли биологических мембран и биологии клетки в целом.

В настоящей книге впервые систематически излагаются основные сведения о клеточных рецепторах: их структурной организации, особенностях строения функционально значимых доменов, молекулярной генетике клеточных рецепторов, биосинтезе и катаболизме. Большое внимание уделено функциональной роли клеточных рецепторов в регуляции биохимических процессов, в том числе транспорта в клетку метаболитов, клеточной пролиферации, экспрессии генов, регуляции, биосинтеза белка по типу «обратной связи». Перечисленные проблемы в качестве составной части входят в учебные планы университетов и медико-биологических факультетов медицинских институтов по биохимии и биофизике или самостоятельного курса — *биохимия мембран*.

Проблема клеточных рецепторов весьма многогранна; она затрагивает практически все ключевые аспекты клеточной и молекулярной биологии. Степень изученности ряда вопросов еще недостаточна, а некоторые из сформулированных положений не могут быть отнесены к категории хрестоматийных. Быстрое накопление фактических данных создает трудности для окончательных выводов, открывая в то же время простор для построения гипотез. Наиболее перспективные из них, по мнению автора, нашли отражение в книге. Их критический анализ позволит читателю активно формировать собственное представление об этой важной области биохимии мембранных процессов.

Автор

Введение

Клетки многоклеточного организма находятся в постоянно изменяющемся микроокружении, поэтому они способны поддерживать свой метаболизм и постоянство внутренней среды благодаря свойству избирательно (специфически) «узнавать» содержащиеся вне клетки вещества. Последние могут принадлежать к индукторам и медиаторам клеточного метаболизма (гормоны, витамины и др.), белкам и пептидам, продуцируемым клеткой во внешнюю среду, а также низкомолекулярным метаболитам. «Узнавание» тех или иных веществ осуществляется с помощью сложных белков (гликопротеины), встроенных в клеточную мембрану. Вне зависимости от природы специфически связываемого ими лиганда эти белки имеют общий план строения: участок, расположенный вне клетки, внутримембранный участок и участок, «погруженный» в цитоплазму. Избирательность связывания такими мембранными белками содержащихся во внешней (по отношению к клетке) среде лигандов дала основание обозначить их как *рецепторы* (от лат. *receptio*). Для обозначения мембранных белков, участвующих в переносе в клетку низкомолекулярных метаболитов (сахара, аминокислоты, пуриновые и пиримидиновые основания и пр.), используют термин *транспортный белок*, или *транспортер* (от англ. *transporter*).

Таким образом, избирательное связывание лигандов рецепторными белками осуществляется теми частями их молекул, которые расположены вне клетки. Формирование комплекса лиганд — рецептор запускает цепь биологических реакций, важнейшая роль в которых принадлежит *внутриклеточному участку молекулы рецепторного белка*. Однако лишь совокупное участие всех структурных элементов молекулы рецептора обеспечивает при участии лиганда реализацию присущих ему функций (эффекторные функции).

В многоклеточных организмах клетки различных органов и тканей отличаются по набору рецепторов. Наряду с идентичными по функциям рецепторами, которые необходимы для обеспечения жизни любой клетки, обнаруживаются также рецепторы,

характерные для специализированных клеток. Именно эти рецепторы отражают особенности дифференцировки данной клетки в онтогенезе.

Существование в одном органе различных по происхождению клеток (например, энтодермального и мезодермального происхождения) или клеток единого происхождения, но различной специализации (как Т- и В-лимфоциты) диктует необходимость их *функциональной кооперации*. Она достигается при участии разнообразных медиаторов и клеточных рецепторов. В этом случае ответственные за кооперативное взаимодействие клеток рецепторы «работают» сообща, обеспечивая выполнение функции, характерной для данного органа или клеточной системы в целом.

Биосинтез клеточных рецепторов контролируется различными индукторами, в числе которых находятся как содержащиеся во внешней среде специфические лиганды, так и другие по строению и функции лиганды. Плотность рецепторов определенной специфичности на клеточной мембране отражает ее способность выполнять функцию, контролируемую данным лигандом. Поэтому определение содержания в организме какого-либо биологически активного соединения (например, гормона) не дает достаточной информации для того, чтобы судить о его функциональной активности до тех пор, пока не будет установлена плотность рецепторов данного гормона на клеточных мембранах.

Таким образом, изучение клеточных рецепторов может претендовать на необходимую глубину лишь при одновременном исследовании соответствующих лигандов и реакций лиганд — рецептор. Следует также иметь в виду, что рецепторы служат интегральными компонентами биологических мембран, в силу чего их взаимодействие с лигандами приводит к ряду кооперативных процессов, изменяющих в конечном счете состояние мембраны¹. Значимость этих процессов для механизма функционирования рецепторов рассматривается в этой книге.

¹ См.: Болдырев А. А. Введение в биохимию мембран. М., 1986.

Структурная организация и основные функции клеточных рецепторов

1

1.1. Выделение и очистка рецепторов

Клеточные рецепторы принадлежат к числу мембранных белков. Участок молекулы рецептора, пронизывающий цитоплазматическую мембрану, построен из неполярных аминокислот, в силу чего между ним и липидными компонентами мембраны осуществляются гидрофобные взаимодействия. Помимо них рецепторные белки образуют в ряде случаев ковалентные сложноэфирные связи с остатками фосфорной кислоты фосфолипидов мембраны (рис. 1). Тесная связь рецепторного белка с клеточной мембраной диктует необходимость использования для выделения рецепторов солюбилизирующих мембрану детергентов. С целью дополнительной очистки в ряде случаев прибегают к удалению из препаратов рецепторных белков ковалентно присоединенных к ним компонентов клеточной мембраны.

Процедуру выделения рецепторов начинают с получения препаратов клеточных мембран. Для разрушения клеток используют различные методы, включая механические, осмотические или температурные (замораживание — оттаивание). В буферные растворы добавляют ингибиторы протеиназ, чтобы предотвратить расщепление рецепторов в ходе их выделения. Во многих случаях для этих целей применяют ингибиторы белковой природы — соевый ингибитор трипсина, трасилол и др. Солюбилизацию клеточных мембран осуществляют, как правило, с применением неионных детергентов.

Методы очистки рецепторов основаны на технике *аффинной хроматографии*. В качестве специфических сорбентов применяют иммобилизованные на сефарозе лиганды. Ниже кратко изложены несколько методических процедур, дающих представление о технике очистки ряда рецепторных белков.

Рецептор трансферина. *Трансферин* — белок, участвующий в транспорте железа (см. рис. 1). Рецепторы этого белка можно обнаружить на мембране практически всех пролиферирующих клеток млекопитающих. Удобным источником для получения это-

го рецептора служат клетки множественной миеломы человека или клетки перевиваемой плазматомы мышей. Клетки лизируют в нейтральном буферном растворе, содержащем неионный детергент — 2% нонидет *P*-40 (тритон X-100), трасилол и моно-йодацетат. Лизат первоначально центрифугируют при 800 *g* для

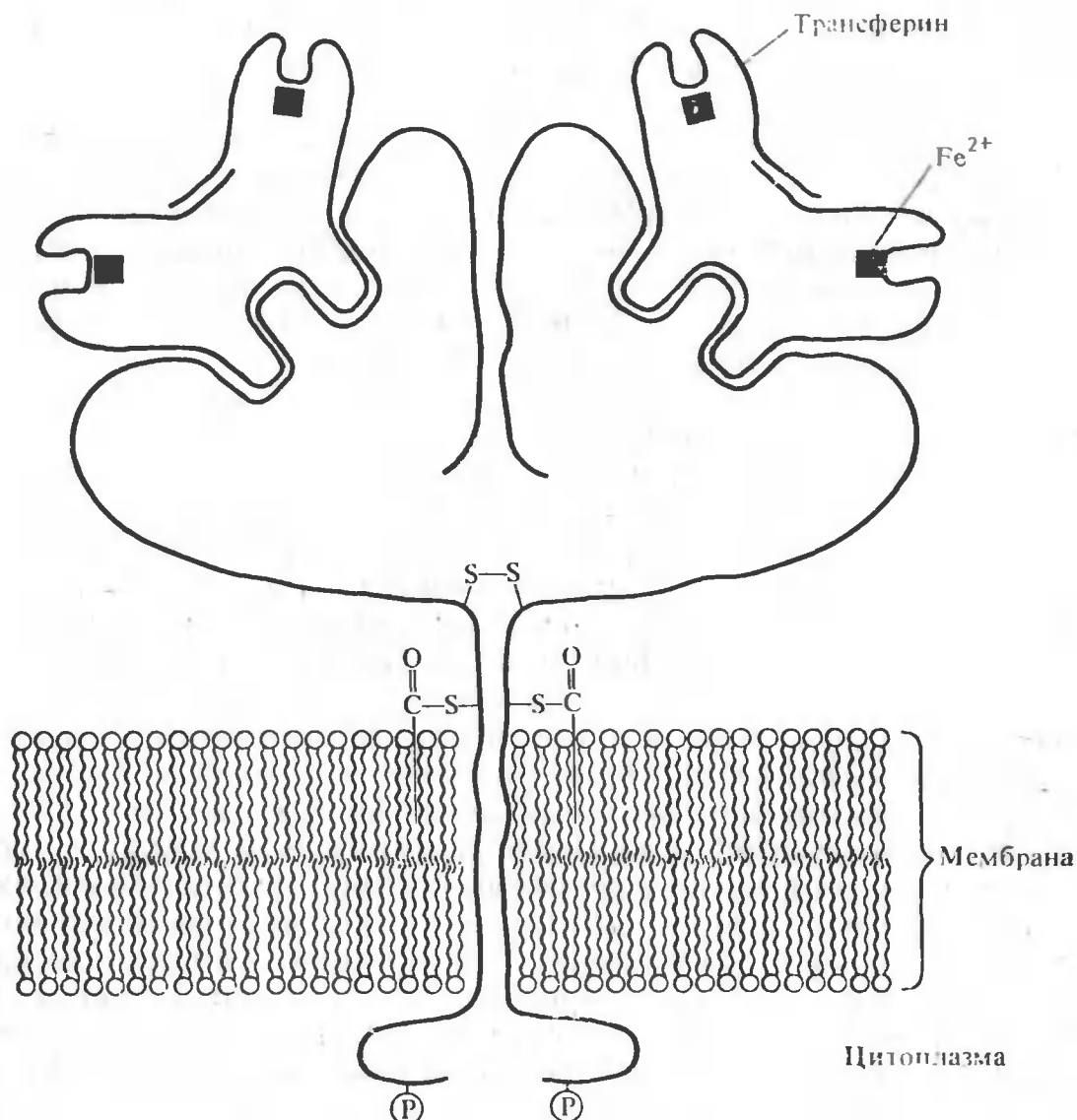


Рис. 1. Строение клеточного рецептора трансферина

удаления крупных частиц, а затем при 100 000 *g* для осаждения клеточных гранул. Для извлечения рецептора из лизата можно использовать трансферин, иммобилизованный на бромциансефарозе. Связывание рецептора с лигандом происходит в ацетатном буфере (pH 5,0), содержащем 0,5% тритон X-100 и соли Fe. Элюцию молекул рецептора осуществляют 0,1 М бикарбонатным буфером (pH 7,8), содержащим 0,5% тритона и соли Fe (van I. R. Driel, 1984).

Рецепторы тиротропина. Гормон *тиротропин* представляет собой гликопротеин, продуцируемый клетками передней доли

гипофиза. Рецепторы гормона экспрессируют клетки щитовидной железы. Для очистки рецептора используют частично очищенные клеточные мембраны щитовидной железы свиньи. Материал гомогенизируют механическим способом в присутствии 0,2 М ди-иодсалицилата лития, после чего нерастворимые компоненты удаляют центрифугированием. Все процедуры проводят в присутствии ингибитора протеиназ — фенилметилсульфонилфторида. Лизат мембраны первоначально фракционируют с помощью ионообменной хроматографии, а затем путем гельфильтрации на сефадексе. Фракции, содержащие рецептор, используют для выделения рецепторного белка с помощью иммобилизованного на биогеле тиротропина (M. N. Islam, N. R. Forid, 1984).

Рецепторы эпидермального фактора роста (гормона роста). Рецептор содержится на мембране различных клеток эпидермального и мезодермального происхождения. Одна из эффективных процедур выделения рецептора состоит в использовании иммобилизованных моноклональных антител против этого белка. Экспериментальная процедура состоит в следующем (P. J. Rafter, 1984). Источником клеток, продуцирующих антитела против рецептора, служит селезенка мышей, иммунизированных раково-эмбриональными клетками, экспрессирующими в больших количествах рецептор для эпидермального фактора роста. Эти клетки гибридизуют с клетками непродуцирующей плазматомы по общепринятой методике получения гибридом, продуцирующих антитела. Затем отбирают клоны гибридных клеток, синтезирующие антитела, которые способны конкурентно блокировать связывание фактора роста. Очищенные моноклональные антитела иммобилизуют на биогеле и сорбируют на них солюбилизованные детергентом рецепторы. После удаления несвязавшихся белков осуществляют элюцию рецептора с помощью N-ацетилгалактозамина. Использование его для элюции рецептора продиктовано тем, что антитела распознают в молекуле рецептора детерминанты олигосахаридной природы, сходные по строению с антигенными детерминантами группового вещества крови A¹.

Выделение рецепторов на иммобилизованных лектинах. Многие рецепторы содержат большой углеводный компонент, благодаря чему они эффективно взаимодействуют с растительными белками — *лектинами*, связывающими углеводы. Так как лектины избирательно связывают различные по строению сахара, гликопротеины, различающиеся по строению углеводных компонентов, специфически связываются разными лектинами. Одним из первых этот методический прием использовал П. Куатрекасас (P. Cuatrecasas, 1972) с целью очистки рецептора инсулина. В настоящее время для выделения указанного рецептора применяют иммобилизованный на агарозе лектин — *агглютинин из проростков пшеницы* (wheat germ agglutinin). Для элюции свя-

¹ О строении антигенных детерминант групповых веществ крови см.: Кульберг А. Я. Молекулярная иммунология. М. 1985.

заниго на сорбенте рецептора используют нейтральные буферные растворы, содержащие N-ацетилглюкозамин и N,N'-дицетилхитобиозу — сахара, входящие в структуру детерминант, распознаваемых указанным лектином.

Аналогичный метод используют, в частности, для очистки клеточного рецептора α -интерферона. В этом случае агглютинин из проростков пшеницы иммобилизуют на бромциансефарозе. Источником рецепторов служат солиобилизованные с помощью тритона X-100 мембраны лимфобластоидных клеток человека. Элюцию рецептора с иммуносорбента также производят с помощью N-ацетилглюкозамина.

При анализе методов, используемых для выделения клеточных рецепторов, обращает на себя внимание стремление к применению *максимально щадящих методов* на стадии элюции рецептора с сорбента. Так, применение сорбентов с иммобилизованными лактинами для очистки рецептора инсулина продиктовано прежде всего стремлением избежать воздействия на рецепторный белок растворов с низкими значениями pH, концентрированных растворов амидов (мочевина) или других денатурирующих белок веществ. В то же время в кислой среде (или с применением денатурирующих агентов) производится элюция с иммобилизованных лигандов (антигены или гаптены) различных по специфичности антител, не приводящая к их инактивации. Различие подходов к способам элюции клеточных рецепторов и антител (иммуноглобулины) с иммобилизованных лигандов, выбранных эмпирическим путем, связано с конформационной лабильностью рецепторных белков. Так, для ряда изученных к настоящему времени рецепторов (например, рецептор для эпидермального фактора роста) характерны выраженные изменения конформации при переходе из нейтральной в слабокислую среду (см. гл. 3).

Наиболее щадящие методы элюции рецепторных белков с иммобилизованных лигандов могут заключаться в вытеснении рецептора с помощью структурного аналога лиганда. Примечателен в этом отношении метод очистки β_2 -*адренергического рецептора*. В качестве сорбента применяют иммобилизованный на CL-сефарозе алпренолол, имеющий выраженное сродство к упомянутому рецептору. Последующую элюцию рецептора с сорбента осуществляли с помощью раствора алпренолола.

1.2. Маркирование рецепторов мечеными лигандами

Изучение строения и функциональных свойств рецепторов возможно без предварительного выделения их в высокоочищенном виде. Идентификация рецепторного белка в препаратах клеточных мембран или непосредственно на клеточной поверхности может быть осуществлена за счет связанного им *радиомеченого лиганда*. Если использовать лиганд, способный ковалентно при-

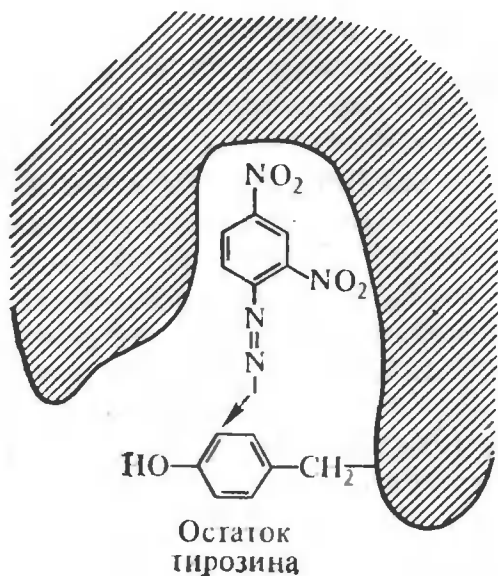


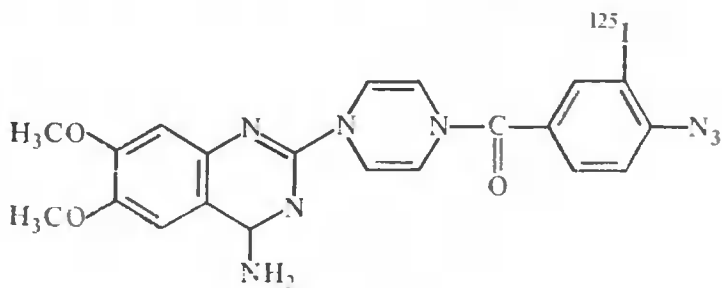
Рис. 2. Метод метки по сродству на примере фиксации в активном центре антитела против динитрофенильной группы специфического лиганда

соединяться к рецептору, возникнут благоприятные возможности для идентификации рецепторного белка среди других солюбилизованных мембранных белков.

Ковалентное присоединение лиганда к рецептору основано на методе *метки по сродству* (affinity labelling), разработанной первоначально для антител и ферментов (А. Wofsy et al., 1963). Метод состоит в следующем. Лиганд, содержащий реакционноспособную группу, после связывания в активном центре рецептора (антитело, фермент) взаимодействует с одним из боковых аминокислотных остатков в районе активного центра с образованием ковалентной связи (рис. 2).

Одна из изящных модификаций метода метки по сродству состоит в получении *фотоактивного*

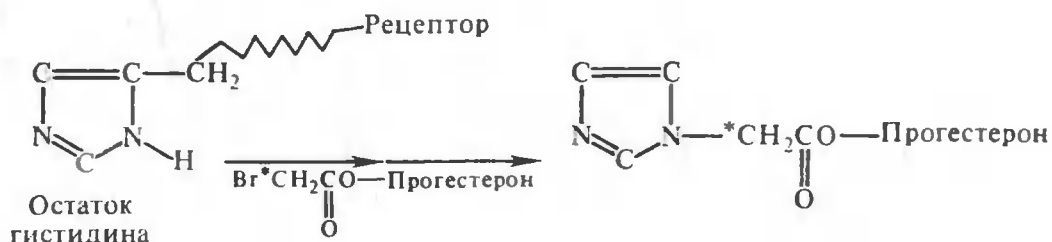
лиганда. После связывания лиганда с белком лиганд подвергается фотолизу, в результате которого появляется реакционноспособная группа, взаимодействующая с аминокислотными остатками в районе активного центра. В качестве примера такого фотоактивного соединения можно привести 2-[4-(4-азид-3-под-



бензоил) пиперазин-1-1]-4-амино-6,7-диметоксиквиназолин. Указанное соединение является аналогом *празозина* — специфического α_1 -адренергического антагониста. Оно специфически взаимодействует с α_1 -адренергическим рецептором, блокируя его активный центр. Использование фотоактивного лиганда, меченого ^{125}I , позволяет в дальнейшем идентифицировать как комплекс лиганд — рецептор, так и отдельные субъединицы рецептора с ковалентно фиксированным на них лигандом (Н. Hess et al., 1983; С. Е. Seidman, 1984).

Другим примером использования реакционноспособных соединений для маркирования рецепторов могут служить экспери-

менты с рецептором прогестерона на клетках матки человека (J. C. Warren, 1971—1975). В этих исследованиях использовали радиомеченные 11 α - и 16 α -бром [2'—³H] ацетокиспрогестерон. После связывания в активном центре рецептора лиганд взаимодействовал с остатками гистидина и метионина в активном центре, образуя с ними ковалентные связи.



Возможности метода метки по сродству для изучения строения и функций клеточных рецепторов весьма велики. Большое разнообразие реакционноспособных (в том числе фотоактивных) соединений позволяет использовать их для получения модифицированных лигандов различного строения и размеров. С их помощью можно получать также реакционноспособные пептиды и белки. В последнем случае необходимо иметь производное с реакционноспособной группой, присоединенной к строго определенному аминокислотному остатку. В качестве примера такого производного можно привести инсулин быка, остаток лизина которого в В-цепи модифицирован N-[N'-(2-нитро-4-азидфенил)-глицином]. Такое производное инсулина нашло применение для маркирования рецепторов гормона на жировых клетках (адипоциты) (B. C. Reed et al., 1983, 1984).

1.3. Молекулярная масса и пространственная структура рецепторов

В табл. 1 приведены сведения о молекулярных характеристиках рецепторов ряда гормонов и других лигандов. Хотя строение некоторых рецепторов изучено в недостаточной степени, общее заключение может быть сделано. Как правило, рецепторы имеют большую молекулярную массу и достаточно часто состоят из нескольких субъединиц (полипептидные цепи). Молекулярная масса рецепторов колеблется в широких пределах и не зависит от природы и молекулярной массы лиганда. Рецепторы одного и того же лиганда, экспрессируемые различными клетками, могут заметно различаться по структурной организации. Это относится, например, к рецепторам инсулина на адипоцитах и клетках мозга, а также к рецепторам соматостатина на клетках мозга и поджелудочной железы. Различия в структурной организации как сходных, так и разных по специфичности рецепторов могут быть связаны с различиями в строении не всей молекулы, а лишь од-

Таблица 1. Молекулярные характеристики клеточных рецепторов

Рецептор	Молекулярная масса, кД	Число субъединиц и их молекулярная масса, кД	Дисульфидные связи между полипептидными цепями	Углеводный компонент	Источник рецептора
Инсулина	350	2+2 ($\alpha_2\beta_2$) α —130; β —90	+	+	Адипоциты
Эпидермального фактора роста	90	131	—	+	Клетки карциномы человека
Трансферина	186	2 (димер)	+	+	Ретикулоциты овцы
Тиротропина	200	2+2 ($\delta_2\epsilon_2$) ϵ —35; δ —66	+(между ϵ -цепями)	+	Щитовидная железа свиньи
Хорион-гонадотропина	240—280	2+2 ($\alpha_2\beta_2$) α —85; β —38	+(между α - и β -цепями)	+	Желтое тело яичника коровы
Глюкагона	113—119	2 (димер)	—	+	Печень крысы
Соматостатина	90	2 (40; 76)	+	?	Поджелудочная железа крысы
Энкефалина	100—110	2 (димер)	—	?	Мозг крысы
Холецистокинина	116	2 (40; 76)	+	?	Поджелудочная железа свиньи
Антигенсвязывающий В-лимфоцитов	180	2+2 (H_2L_2) H —52÷70, L —22	+	+	Лимфоциты селезенки

ной из их частей. Многочисленные примеры различий в строении внутриклеточных участков рецепторов, отвечающих за их эффекторные функции, приведены в гл. 2. Напротив, внеклеточные участки различных по специфичности рецепторов обладают, видимо, сходством строения (общие принципы структурной организации, способов формирования активных центров, первичной структуры). Эти данные подробно обсуждаются в гл. 3. В некоторых случаях различия между рецепторами связаны с их углеводным компонентом. Так, в отличие от рецептора инсулина на мембранах адипоцитов, содержащего углеводный компонент,

аналогичный рецептор на клетках мозга определяемого количества углеводов в своей молекуле не имеет.

Функциональная роль полипептидных цепей. Если молекула рецептора построена из нескольких различающихся по строению полипептидных цепей, их вклад в организацию активного центра рецептора, равно как участие в реализации эффекторных свойств, может быть неодинаков. Это положение иллюстрируют данные о строении рецептора инсулина. Одна из цепей этого белка (α) участвует в образовании активного центра, в то время как другая (β) отвечает за эффекторные свойства рецептора. В других рецепторных белках разноименные полипептидные цепи совместно участвуют в формировании активного центра рецептора (см. табл. 1).

С помощью метода метки по сродству удастся оценить вклад в организацию активного центра рецептора боковых аминокислотных остатков полипептидных цепей, образующих его молекулу. Для этого рецепторный белок с ковалентно присоединенным к нему лигандом разделяют на полипептидные цепи и определяют, с какой из цепей связан лиганд (см. разд. 3.1). Каким же образом лиганд, содержащий только одну реакционноспособную группу, может оказаться связанным с аминокислотными остатками двух полипептидных цепей, если обе они участвуют в образовании активного центра? Такая возможность существует потому, что при отсутствии стерических ограничений реакционноспособная группировка лиганда способна вступать во взаимодействие с любым подходящим аминокислотным остатком в активном центре, причем вероятность взаимодействия с боковыми остатками соответствующих цепей будет зависеть от их пространственного расположения относительно модифицированного лиганда после связывания его в активном центре.

Метод метки по сродству получил широкое распространение при изучении активных центров антител. Поскольку антигенсвязывающие рецепторы В-лимфоцитов имеют иммуноглобулиновую природу и не отличаются по строению своих активных центров от антител, данные, полученные при изучении последних, приложимы для анализа организации активных центров рецепторов В-лимфоцитов, а также рецепторов другой специфичности.

В связи с этим необходимо отметить, что реакционноспособный лиганд может взаимодействовать как с тяжелой, так и легкой цепью молекулы антитела, но в разных соотношениях. Это соотношение варьирует даже у одинаковых по специфичности антител, продуцируемых разными клетками, и зависит от особенностей строения цепей, которые в свою очередь влияют на расположение в активном центре аминокислотных остатков каждой цепи.

Молекулы рецепторов, образованные парами различающихся или идентичных полипептидных цепей, содержат активные центры, в образование которых тот или иной вклад вносят обе цепи. Именно так устроены активные центры антигенсвязывающих ре-

цепторов В- и Т-лимфоцитов (см. гл. 3, 4), опииатные рецепторы. Сказанное выше приложимо для структуры активного центра рецептора трансферина и рецепторов энкефалина (см. табл. 1).

В случае, когда активный центр формируют идентичные полипептидные цепи, образующие димер, конфигурация активного центра полностью симметрична. При этом избирательность связывания лиганда значительно выше, чем при асимметричной конфигурации центра, и, как следствие этого, сродство лиганда к рецептору будет весьма велико. Этот вывод согласуется с данными рентгеноструктурного анализа димера легких цепей иммуноглобулинов, связывающих тринитрофенильную группу. Последняя целиком заполняет глубокий щелеобразный карман между переменными районами этих цепей (J. Deisenhofer, 1982). Для сравнения можно привести реконструированную структуру активного центра моноклонального антитела против фосфорилхолина (рис. 3). Асимметричный по структуре активный центр этого антитела сформирован при участии разноименных цепей: легкой и тяжелой. Расположенный в полости центра низкомолекулярный лиганд занимает небольшое пространство, контактируя лишь с несколькими из образующих его коротких участков полипептидных цепей.

При существовании в молекуле рецептора нескольких полипептидных цепей различного строения только одна из них может участвовать в формировании активного центра. Так, молекула рецептора пептидного гормона — холецистокинина, находящегося на клетках поджелудочной железы, образована двумя цепями с молекулярными массами 76 000 и 40 000. Только тяжелая цепь связывает гормон (С. Jakamoto, 1983). Эти данные, полученные с использованием метода метки по сродству, убедительно подтверждают результаты изучения рецептора той же специфичности, экспрессируемого клетками мозга: этот рецептор вообще состоит из одной полипептидной цепи с молекулярной массой 51 000 (С. Jakamoto, 1985). Следует напомнить также тот факт, что лишь одна из полипептидных цепей рецептора инсулина (α -цепь) связывает гормон.

Иная ситуация наблюдается в случае α_1 -адренергического рецептора, находящегося на мембране клеток печени. Рецептор состоит из трех полипептидных цепей с молекулярными массами 77 000, 68 000 и 59 000. Если к рецептору ковалентно присоединяют лиганд с помощью метода метки по сродству, последний оказывается фиксированным на каждой из цепей. Взаимодействие рецептора с лигандом (4-амино-6,7-диметоксиквиназолин) специфично и характерно именно для этого типа рецепторов (С. E. Siedman et al., 1984).

Возникло предположение, что все три цепи рецептора появляются в результате протеолиза более тяжелой цепи прорецептора. Опыты показали, что для каждой цепи существует независимый путь биосинтеза. Последнее, однако, не исключает существование между ними большой степени сходства строения.

Судить об этом можно будет после изучения их первичной структуры, равно как строения мРНК для каждой из цепей.

В тех случаях, когда наличие различных по строению полипептидных цепей в молекуле рецептора доказано, представляет

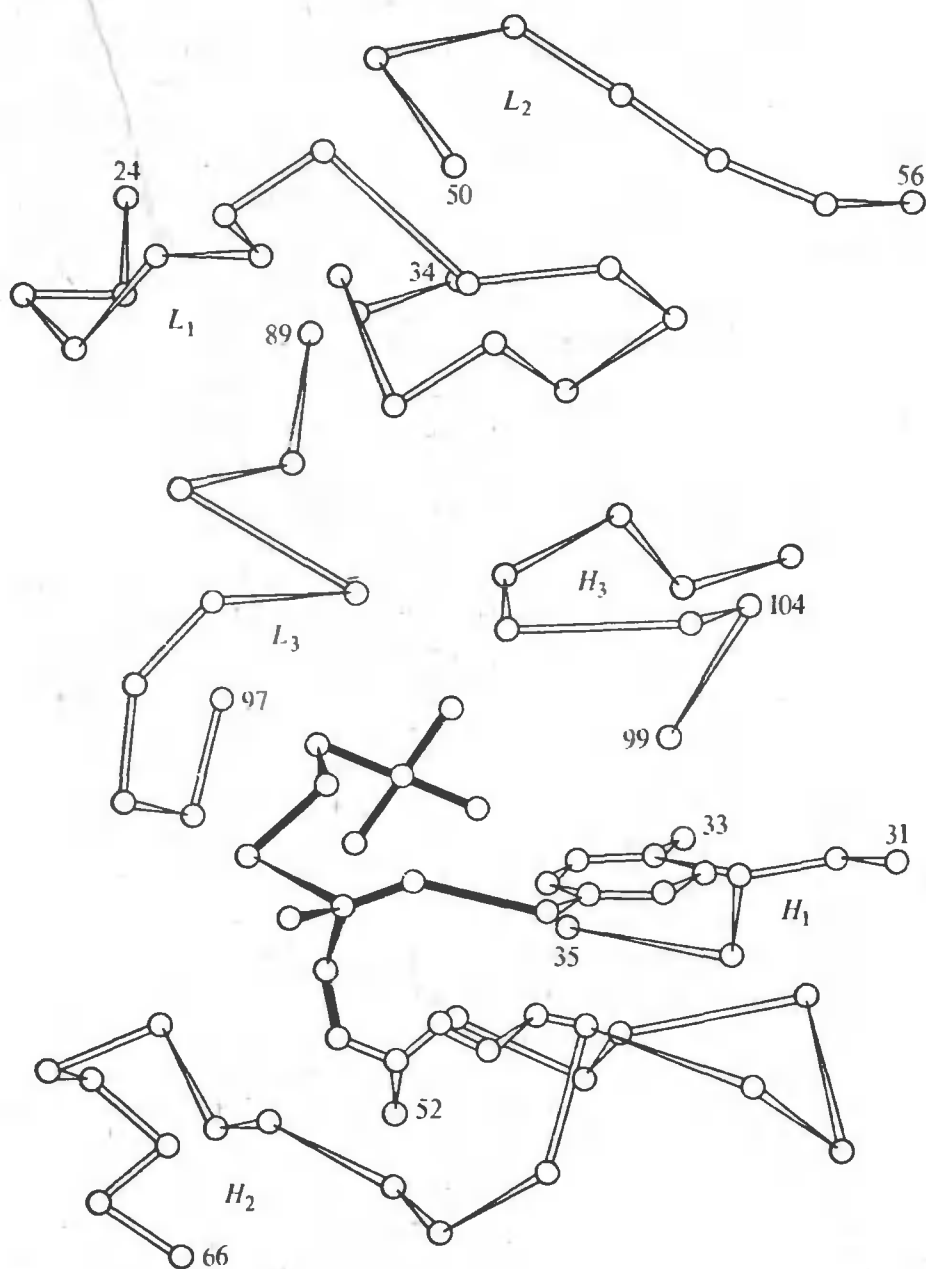


Рис. 3. Структура активного центра антитела, связывающего фосфорилхолин (выделен жирным):

L_1 — L_3 — гипервариабельные участки легкой цепи; H_1 — H_3 — гипервариабельные участки тяжелой цепи; цифрами отмечены позиции некоторых аминокислотных остатков

интерес проанализировать функциональную роль каждой из них. Анализ такого рода проделан для рецептора инсулина на жировых клетках.

Согласно многочисленным данным молекула рецептора построена из двух пар субъединиц α и β . Первая имеет молекулярную массу 135 000, вторая — 95 000. Инсулин, содержащий реакционноспособную группу, присоединяется только к α -субъединице (С. С. Yip et al., 1978, 1980; С. Wang et al., 1982). Обе цепи α и β пронизывают наружный слой цитоплазматической мембраны, но только β -субъединица проходит через наружную и внутреннюю

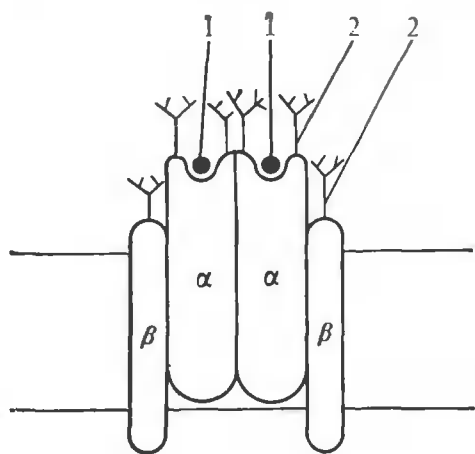


Рис. 4. Рецептор инсулина:

α - и β -субъединицы рецептора;
1 — инсулин, 2 — разветвленные цепи углеводного компонента

стороны бислоя (рис. 4). В составе этой субъединицы содержится внутриклеточный домен, ответственный за эффекторные функции рецептора инсулина. Таким образом, между α - и β -субъединицами существует «разделение обязанностей».

Несмотря на наличие в молекуле инсулинового рецептора двух симметричных половин, они отличаются между собой тем, что только одна из α -субъединиц имеет высокое сродство к лиганду. Различия в степени сродства к инсулину у α -субъединиц достигает 100 (D. T. Pang, J. A. Shafer, 1984).

Помимо рецептора инсулина существуют другие симметрично построенные белки, проявляющие асимметрию относительно сродства их активных центров к лиганду. Так, в молекуле неполного антитела (ввиду отсутствия у него преципитирующих и агглютинирующих свойств) только один из активных центров имеет высокое сродство к детерминантной группе антигена. Причина асимметрии рецептора инсулина (неполное антитело) по степени сродства к лиганду пока еще не выяснена.

По тому же принципу, что и рецептор инсулина, организованы молекулы рецепторных белков для некоторых других гормонов. Образован двумя парами полипептидных цепей рецептор для тиротропина: легкой (ϵ) с молекулярной массой 35 000 и тяжелой (δ), молекулярная масса которой составляет 66 000. Две легкие цепи объединены в комплекс дисульфидными связями и образуют активный центр для связывания гормона. Находящийся в активном центре рецептора лиганд стабилизирует комплекс, легко диссоциирующий после восстановления дисульфидных связей. Если до реакции с лигандом восстанавливают дисульфидные связи в молекуле рецептора, сродство последнего к лиганду значительно уменьшается (Y. Ozawa et al., 1979; J. Ginsberg, 1982; M. N. Islam, N. Farid, 1985).

Таким образом, активные центры рецепторов образуются во многих случаях при участии одной цепи или двух идентичных полипептидных цепей. Среди немногих исключений — антигенсвяз-

зывающие рецепторы В- и Т-лимфоцитов¹, сходные по принципам организации своих активных центров с иммуноглобулинами, активные центры которых сформированы при участии различных по структуре полипептидных цепей.

Полученные к настоящему времени данные свидетельствуют в своей совокупности в пользу того, что в случае формирования активного центра рецепторного белка при участии только одной цепи димеризация двух одноименных цепей ведет к стабилизации их конформации и, как следствие того, к увеличению сродства к лиганду. По этим причинам обратимая ассоциация — диссоциация цепей приобретает важное биологическое значение, так как регулирует процесс взаимодействия рецепторного белка с лигандом.

Обратимые конформационные переходы молекулы рецептора. В свете обсуждаемой проблемы значительный интерес представляют данные, свидетельствующие о существовании обратимых конформационных переходов в молекулах рецепторных белков, происходящих при относительно небольших изменениях рН. Многие рецепторные белки имеют изоэлектрическую точку в слабнокислой среде, в силу чего при физиологических значениях рН (нейтральная среда) они заряжены отрицательно. За счет того, что плотность упаковки доменов, образующих активный центр рецептора, невелика, даже незначительного увеличения их гидратации в нейтральной среде достаточно, чтобы ощутимо уменьшить устойчивость конформации активного центра рецептора. В то же время при значениях рН, близких к изоэлектрической точке рецепторного белка (рН 5,0—5,5), последний теряет часть связанной воды и за счет внутримолекулярных взаимодействий приобретает более устойчивую конформацию. Это способствует меньшей доступности остатков тирозина для нодирования и большей устойчивости белка к протеолитическому расщеплению (M. Di Paola, F. R. Maxfield, 1984). При переходе в нейтральную среду чувствительность к протеолизу и доступность остатков тирозина возрастают. Варьируя в указанных пределах концентрацию водородных ионов, можно в существенной степени изменять константу связывания лиганда рецептором. Так, рецептор одного из белков системы комплемента — C1q, находящийся на поверхности макрофагов, значительно прочнее связывает лиганды при рН 5,5, нежели в нейтральной среде (R. Porter, 1982). Указанный прием можно использовать для очистки рецепторов или их частей на иммобилизованных лигандах (см. гл. 6). Физиологическое значение описанных конформационных переходов в молекуле рецептора будет рассматриваться при обсуждении проблемы рециркуляции рецепторов (см. разд. 1, 4).

¹ Здесь и в дальнейшем сведения иммунологического характера могут быть почерпнуты из книг А. Я. Кульберга и Р. В. Петрова (см. рекомендуемую литературу).

Шарнирные участки. Ориентация рецепторов в мембране благоприятствует контакту их внеклеточных участков с водорастворимыми лигандами. Однако эффективность взаимодействия с последними была бы ограничена, не будь у внеклеточных участков рецептора способности изменять свое положение относительно фиксированной внутримембранной части его молекулы. Придать известную гибкость молекуле рецептора могут участки с относительно неупорядоченной структурой, например с высоким содержанием остатков пролина. Такие участки, названные *шарнирными*

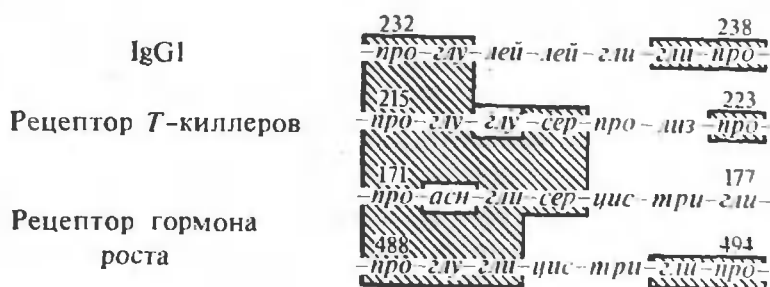


Рис. 5. Аминокислотная последовательность сегмента тяжелой γ_1 -цепи IgG1 (человека), входящего в шарнирный участок, и сходных с ним сегментов цепей антигенсвязывающего рецептора Т-киллеров (β -цепь) и рецептора эпидермального гормона роста (заштрихованы)

ми, были найдены в молекуле иммуноглобулинов класса G, где они обеспечивают вращение Fab-участков относительно Fc-участка. Изучение гибкости молекул рецепторных белков с помощью физических методов только предстоит осуществить. Поэтому в настоящее время о наличии в них шарнирных участков можно судить на основании косвенных методов — прежде всего, по наличию в молекуле рецептора участков полипептидных цепей, богатых остатками пролина.

Антигенсвязывающие рецепторы В-лимфоцитов имеют иммуноглобулиновую природу, поэтому в их молекулах существуют участки аминокислотной последовательности, аналогичные шарнирным участкам сывороточных иммуноглобулинов. Аминокислотные последовательности полипептидных цепей антигенсвязывающих рецепторов Т-лимфоцитов также содержат сегменты, имеющие гомологию первичной структуры с шарнирными участками тяжелых цепей иммуноглобулинов. Подобный участок был обнаружен при анализе аминокислотной последовательности β -цепи антигенсвязывающего рецептора Т-киллеров — одной из субпопуляций Т-лимфоцитов (А. Я. Кульберг, 1986). Интересно, что первичная структура упомянутого рецепторного белка была предсказана Н. Saito и сотрудниками (1984) на основании изучения нуклеотидной последовательности кДНК для этого белка. Как видно из рис. 5, один из сегментов β -цепи этого рецептора имеет черты сходства с одним из сегментов тяжелой γ_1 -цепи им-

муноглобулина человека класса G, находящегося в пределах шарнирного участка.

На том же рисунке представлена аминокислотная последовательность двух сегментов полипептидной цепи, образующей рецептор для эпидермального фактора роста¹. Сегменты находятся в участках цепи с исключительно высоким содержанием остатков пролина и цистеина. Так, второй из представленных сегментов цепи расположен в районе, в составе которого обнаруживается 14 остатков пролина и 20 остатков цистеина. Этот район из 137 остатков непосредственно примыкает к внутримембранной (гидрофобная) части молекулы рецепторного белка. На этом основании можно заключить, что шарнирный участок расположен на границе между внеклеточной и внутримембранной частями рецептора. Он может иметь исключительное значение для обеспечения вращательной свободы движений внеклеточной части рецептора относительно его фиксированного в мембране участка. Нет необходимости специально доказывать, сколь это обстоятельство может быть значимо для эффективного связывания лиганда и «сшивания» последним двух соседствующих в мембране молекул рецептора.

Наличие в рецепторных белках шарнирных участков, богатых остатками пролина, можно установить и на основании *методов иммунохимического анализа*. Установлено, что часть антител, появляющихся у кролика в ответ на иммунизацию очищенными препаратами Fc γ -рецепторов лимфоцитов и макрофагов (связывающих агрегированный Ig G), реагирует с очищенным коллагеном и коллагено-подобной частью молекулы одного из белков системы комплемента — C1q. Показано, что антигенное сходство Fc γ -рецепторов лимфоцитов и макрофагов обеспечивается именно этими участками их молекул, в то время как лигандсвязывающие участки различаются по своему антигенному строению (И. М. Сычева и др., 1984, 1985).

На основании приведенных выше данных можно предположить, что шарнирные участки содержатся в каждом рецепторном белке и имеют определяющее значение для реализации его функции. Накоплению фактических данных по этому вопросу могут способствовать, в частности, данные, полученные с использованием ферментов, расщепляющих коллаген и подобные ему по строению белки. Так показано, что α -цепи рецептора инсулина чувствительны к расщеплению эластазой (J. Massague et al., 1981). Действительно, в этой цепи рецептора инсулина высоко содержание остатков пролина и цистеина (A. Ulrich et al., 1985).

Другие проблемы, касающиеся первичной и пространственной структуры клеточных рецепторов, рассматриваются в следующих разделах настоящей книги.

¹ Полная аминокислотная последовательность этого рецептора, предсказанная на основании изучения кДНК для этого белка, описана A. Ulrich и со-трудниками (1984).

1.4. Функциональные свойства клеточных рецепторов

Многообразие рецепторов как по специфичности, так и по эффекторным свойствам создает трудности в описании их наиболее общих функциональных свойств, характеризующих рецепторы как определенный класс биологически активных макромолекул. Данные последних лет (P. Gordon et al., 1980—1982; J. Carpenter, 1984) позволяют заключить, что общим свойством клеточных рецепторов, от которого зависит реализация их биологических функций, является их способность перемещаться с клеточной поверхности во внутренние части клетки.

Интернализация. Первоначально допускали, что перемещение рецепторов внутрь клетки — *интернализация* — происходит только после связывания рецептором лиганда. Однако в последнее время появились результаты, свидетельствующие о существовании независимой от лиганда интернализации рецепторов. Такое явление, в частности, описано для инсулиновых рецепторов клеток гепатомы (J. Chvetchko et al., 1984; J. A. Hodo, I. Simpson, 1984).

Факт переноса с помощью рецептора внутрь клетки распознаваемого им лиганда был установлен с использованием либо реакционноспособных лигандов, либо меченных радиоактивным иодом рецепторов. Если клетки, имеющие инсулиновые рецепторы, обработать в темноте (при 4°C) модифицированным инсулином с фотореактивной группой, а затем краткосрочно облучить светом, произойдет ковалентное присоединение инсулина к связавшим его рецепторам. Используя модифицированный инсулин, меченный радиоактивным иодом, можно показать наличие радиомеченого инсулина на клеточной поверхности путем «состригания» белков клеточной мембраны с помощью трипсина.

Однако, если после присоединения к рецепторам инсулина повысить температуру до 37°C и различное время инкубировать клетки при этой температуре, количество инсулина, «состригаемое» трипсином, постепенно снижается вплоть до полного исчезновения. Вместе с тем обработанные трипсином клетки содержат радиоактивную метку. Поскольку инсулин соединен с рецептором ковалентной связью, его поступление внутрь клетки может произойти только вместе с рецептором. Описанный выше эксперимент в различных модификациях использовали для оценки интернализации разных по специфичности клеточных рецепторов.

Первый этап интернализации рецепторов связан с инвагинацией клеточной мембраны и последующим отшнурованием от нее вакуоли, названной *рецептосомой* (рис. 6). На втором этапе происходит слияние рецептосомы с находящимися в цитоплазме лизосомами. В слабокислой среде лизосомы за счет конформационного перехода в молекуле рецептора (см. разд. 1.2) происходит диссоциация комплекса лиганд — рецептор. Лиганд при этом разрушается (полностью или частично) гидролитическими фермен-

тами, содержащимися в лизосоме; рецептор либо остается неразрушенным, либо подвергается ограниченному расщеплению (M. Askoli et al., 1984; J. Carpenter, 1984).

Принципиальное значение для понимания физиологической роли интернализации комплексов лиганд — рецептор имеет ответ

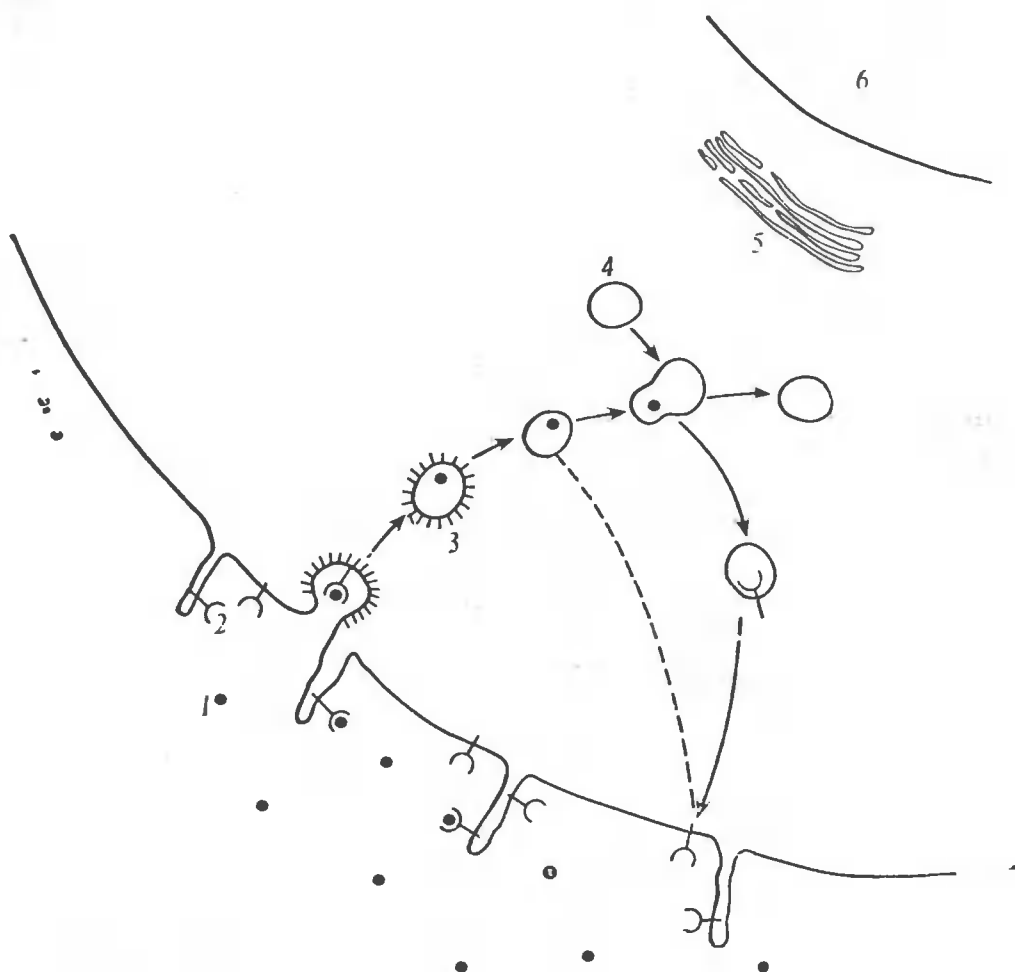


Рис. 6. Интернализация клеточных рецепторов и их рециклирование:

1 — лиганд, 2 — рецептор, 3 — рецептосома, 4 — лизосомальная вакуоль, 5 — аппарат Гольджи, 6 — ядро клетки

на следующие вопросы: 1) какова степень расщепления лиганда в лизосомах и сохраняют ли продукты гидролиза сигнальные функции и 2) какова судьба попавшего в лизосомы рецептора?

Ответ на первый из поставленных вопросов не может быть дан в настоящее время в окончательной форме, так как продукты гидролитического расщепления таких, например, лигандов, как белковые гормоны, содержащиеся в лизосомах, пока что не охарактеризованы. При захвате клетками печени неиммунизированного животного гомологичных Ig G антител (этот процесс опосредуется Fc γ -рецепторами) в лизосомах удается обнаружить крупные осколки молекулы Ig G. Среди них, несомненно, при-

существуют Fab-фрагменты с молекулярной массой около 50 000. Сохраняющиеся в лизосомах крупные осколки молекулы белкового лиганда, подобные Fab-фрагментам Ig G, могут подвергаться впоследствии более глубокому расщеплению. Дальнейшая их судьба, как об этом свидетельствуют эксперименты с иммуноглобулинами другого класса — Ig A (интернализированы в клетках печени крысы в комплексе с Fc α -рецепторами для этого белка), связана с перемещением в аппарат Гольджи (H. J. Geuze et al., 1984).

Какова биологическая (сигнальная) функция лигандов, поступающих в клетку вместе с рецептором, нельзя решить в общем виде ввиду многообразия лигандов. Судя по результатам экспериментов, в которых биологическое действие некоторых гормонов, медиаторов, антигенов на соответствующие клетки-мишени удавалось имитировать с помощью антител, способных «сшивать» между собой молекулы соответствующих рецепторов, сигнальной функцией обладают не лиганды, а распознающие их рецепторы. В этой и последующих главах указанной проблеме, имеющей ключевое значение для понимания всей проблемы клеточных рецепторов, будет уделено большое внимание.

Переходя ко второму из поставленных выше вопросов, а именно судьбе интернализованных рецепторов, следует прежде всего остановиться на свойстве рецепторов, уже попавших внутрь клетки, вновь перемещаться на ее поверхность. Это явление названо *рециклированием рецепторов*. Ниже описан один из демонстративных экспериментов, доказывающих существование указанного процесса.

Рециклирование. Клетки гепатомы (FaO), экспрессирующие рецепторы инсулина, инкубировали с ^{125}I -инсулином, полученным в виде фотореактивного аналога — [(2-нитро-4-азидфенилацетил)-2]-дезоксифен^{B1} (фен^{B1} означает, что фотореактивная группа присоединена к остатку фенилаланина В-цепи инсулина). Реакцию проводили в темноте, после чего препарат подвергали освещению. При этом радиоактивный инсулин присоединяется ковалентно к своему рецептору. Клетки в этих условиях сохраняют свою жизнеспособность. Если меченные инсулином клетки гепатомы обработать трипсином непосредственно после присоединения лиганда к рецепторам, происходит протеолитическое отщепление внеклеточной части рецептора вместе с лигандом. После инкубации меченных инсулином клеток при 37°C количество высвобождаемого с помощью трипсина лиганда уменьшается вплоть до полного его исчезновения. При этом радиоактивность выявляется внутри клеток. Выделенный из разрушенных клеток комплекс рецептор — лиганд, судя по его молекулярной массе, соответствует таковому на клеточной поверхности и, следовательно, в процессе интернализации не расщепляется (M. Fehlmann et al., 1982). Если продолжить инкубацию клеток при 37°C, поглощенный ранее клетками комплекс рецептор — лиганд вновь появляется на клеточной поверхности.

Существенно, что присутствие лиганда не влияет на течение событий при интернализации рецепторов. Как уже упоминалось, даже в отсутствие лиганда происходит спонтанная интернализация рецепторов и последующее их возвращение на клеточную поверхность, т. е. рециркуляция рецепторов. Вместе с тем роль лигандов велика в синхронизации процесса интернализации рецепторов. Лиганды осуществляют «сортировку» клеточных рецепторов, обеспечивая избирательную рециркуляцию одних при сохранении на клеточной поверхности большинства других (Н. J. Geuze et al., 1984). Все сказанное иллюстрирует схема, представленная на рис. 6.

При продолжительной инкубации клеток с определенным лигандом содержание рецепторов данной специфичности на клеточной поверхности снижается, несмотря на то, что процесс рециркуляции рецепторов остается неизменным. В самом деле, если удалить из среды лиганд и продолжить инкубацию клеток при 37°C, рецепторы вновь займут свое место на клеточной поверхности (J. Carpenter, 1984). Описанный процесс протекает особенно эффективно при концентрациях лиганда, достаточных для насыщения всех рецепторов данной специфичности (в иностранной литературе для описания этого явления используют термин *down regulation*).

В отличие от лигандов в мономерной форме димеры тех же лигандов или их более крупные агрегаты способны сшить между собой на клеточной поверхности несколько рецепторов одинаковой специфичности. Это приводит к формированию *агрегатов рецепторов*. Последние постепенно укрупняются, перемещаясь в плоскости мембраны к одному из полюсов клетки. Здесь собираются все агрегаты из рецепторов данной специфичности, образуя структуру наподобие шапочки (кэп — от англ. cap). Последующие события связаны с интернализацией агрегатов и (или) сбрасыванием их во внешнюю среду. При этом, судя по данным электронной микроскопии, вместе с агрегатами рецепторов во внешнюю среду попадает и часть клеточной мембраны (С. Быковская и др., 1985).

Описанное явление впервые установлено при изучении антигенсвязывающих рецепторов лимфоцитов: иммуноглобулиновых рецепторов В-лимфоцитов. Агрегацию иммуноглобулиновых рецепторов можно осуществлять с помощью антител против иммуноглобулинов (их бивалентных $F(ab')_2$ -фрагментов). Утрата иммуноглобулиновых рецепторов в описанных условиях носит обратимый характер при использовании в экспериментах высокодифференцированных лимфоцитов от взрослых животных. Если продолжить инкубацию клеток при 37°C, на клеточной поверхности вновь появятся рецепторы указанного типа за счет биосинтеза рецепторных иммуноглобулинов.

Процесс агрегации клеточных рецепторов с помощью агрегированных форм лигандов особенно важен для проявления биологического действия гормонов белковой природы. Об этом, в

частности, свидетельствуют эксперименты, выполненные с использованием химически модифицированного фактора роста кожи (J. Schlessinger, 1980). Упомянутый гормон содержит в своей молекуле единственный остаток метионина. При расщеплении метионил-пептидной связи с помощью бромциана образуются два фрагмента пептидной цепи, соединенные между собой дисульфидной связью. Модифицированный указанным способом гормон сохраняет только 10% присущей нативному препарату активности, если оценивать ее по взаимодействию гормона с соответствующими рецепторами на поверхности фибробластов. Если же оценивать активность гормона по усилению под его влиянием включения ^3H -тимидина в ДНК фибробластов, то после модификации она падает до 0,3% от активности нативного препарата.

Модифицированный гормон, меченный флуорохромом, сравнивали с аналогично меченым нативным гормоном по способности агрегировать рецепторы фибробластов, связывающие гормон роста. Оказалось, что модифицированный гормон этим свойством практически не обладал. Агрегация рецепторов происходила, однако, в том случае, если клетки последовательно обрабатывали модифицированным гормоном, а затем антителами против гормона роста. (Последние, благодаря наличию в их молекулах двух активных центров, «способны» сшивать между собой молекулы гормона.) В свою очередь было показано, что указанные антитела восстанавливают биологическую активность модифицированного гормона. Таким свойством не обладали, однако, Fab-фрагменты тех же антител, имеющие в отличие от нерасщепленного антитела только один активный центр. Следовательно, агрегация клеточных рецепторов для гормона является необходимым условием для реализации биологического действия гормона.

Сделанное выше заключение подтверждается данными, свидетельствующими о возможности имитации действия гормона бивалентными антителами, взаимодействующими непосредственно с рецептором. Так, инсулиноподобный эффект вызывают только бивалентные фрагменты антител против рецептора этого гормона, но не моновалентные Fab-фрагменты.

На основании изложенного материала, а также ряда фактов, которые будут рассмотрены в следующих главах, можно прийти к заключению, что *агрегация* рецепторов, *предшествующая* их интернализации, существенна для реализации присущих рецепторам эффекторных функций. В присутствии возрастающих концентраций гормонов белковой природы интернализация рецепторов сопровождается их расщеплением в клетке (J. Schlessinger, 1980). Так как присущая всем белкам способность к агрегации возрастает с увеличением концентрации белка, можно ожидать, что увеличение концентрации белкового лиганда в окружающей клетку среде будет сопровождаться увеличением пропорции агрегированной (димерная) формы лиганда. В такой форме лиганд приобретает способность «сшивать» между собой рецепторы, вызывая их агрегацию, что, как показано выше, слу-

жит необходимым условием для проявления биологического действия комплекса лиганд — рецептор.

Таким образом, следует разграничивать два сходных, но отличающихся по своим последствиям процесса: интернализацию рецепторов, протекающую спонтанно или под действием моновалентного лиганда, и интернализацию рецепторов в агрегированной форме. В последнем случае процесс интернализации связан, по крайней мере, с органичным расщеплением рецепторов и проявлением биологического действия лиганда, опосредуемого рецептором. Это позволяет предположить, что продукты ограниченного распада рецепторов могут обладать сигнальными функциями, оказывая в каждом случае строго определенное влияние на клеточный метаболизм. Функция собственно лиганда сводится к тому, чтобы обеспечить конформационные изменения в молекуле рецептора и избирательный эндоцитоз рецепторов данной специфичности.

Эффекторные функции клеточных рецепторов

2

Биологическая роль клеточных рецепторов не ограничена их способностью избирательно связывать те или иные лиганды. Помимо этой функции, которую можно обозначить как *афферентную*, рецепторные белки могут обладать рядом других функций, реализация которых зависит от строения участков их молекул, погруженных в цитоплазму и, следовательно, в известной степени изолированных от лигандсвязывающих участков в структурном отношении. Как будет обсуждаться ниже, рецепторные белки могут обладать, в частности, ферментативными свойствами. Для некоторых из них установлена способность взаимодействовать с ДНК, белками хроматина. В тех случаях, когда собственно рецепторный белок лишен ферментативной активности, он может приобрести ее за счет формирования комплексов с мембраносвязанными ферментами.

Биологические эффекты, возникающие при взаимодействии лиганда с клеточным рецептором, связаны не только с избирательной интернализацией молекул соответствующего рецептора, но и с аллостерической активацией центров, расположенных в пределах внутриклеточного участка рецептора. Таким образом, биологические функции рецепторов определяются как их способностью специфически связывать лиганд, так и теми эффектами, реализация которых зависит от свойств внутриклеточных участков рецепторов. На этом основании все функции клеточных рецепторов (помимо лигандсвязывающей) могут быть обозначены как *эффекторные*. Их анализу и посвящена настоящая глава.

2.1. Клеточные рецепторы как ферменты

Ферментативная активность обнаружена у разнообразных по специфичности рецепторов, хотя и не у всех. Из этого не следует, что у остальных рецепторов ферментативная активность отсутствует, скорее, такова степень изученности проблемы.

Так, два вида рецепторов: для инсулина и для эпидермального фактора роста — обладают *тирозинкиназной активностью*.

В случае *рецептора инсулина* тирозинкиназной активностью обладает β -субъединица рецептора (R. A. Roth, D. J. Cassel, 1983; van Obberghen E., 1983). Именно эта субъединица пронизывает мембранный бислой и не несет лигандсвязывающих функций. Инсулин, связываясь с α -субъединицей рецептора, индуцирует конформационную перестройку β -субъединицы, необходимую для проявления присущей этой субъединице ферментативной активности. Под влиянием инсулина происходит аутофосфорилирование рецептора по остаткам тирозина. Это явление наблюдали при добавлении инсулина к лимфоцитам, жировым клеткам, клеткам гепатомы.

Рецептор инсулина обеспечивает в присутствии лиганда не только аутофосфорилирование, но и фосфорилирование других субстратов (L. A. Stadmaner, O. Rossen, 1983; Y. Zick et al., 1983). Возможно, что именно благодаря ферментативной активности рецептора инсулина и зависимости этой функции рецептора от связывания гормона последний обеспечивает управление углеводным и липидным обменом в клетке-мишени.

Ферментативные свойства рецептора фактора роста кожи. Этот белок служит одним из важных объектов при изучении ферментативных свойств клеточных рецепторов. Получен ряд доказательств в пользу того, что этот рецептор также является тирозинкиназой и способен к аутофосфорилированию (S. Cohen, M. Kasuga, R. Roth, 1980—1983). От изолированного рецептора, обработанного трипсином, можно отщепить фрагмент с молекулярной массой 42 000, которая обладает протеинкиназной активностью. Этот фрагмент не содержит центр связывания гормона (M. Basu et al., 1984). Рецептор эпидермального фактора роста состоит из одной цепи с молекулярной массой 117 000. Аутофосфорилирование очищенного рецепторного белка в присутствии [32 P] АТФ как до, так и после его обработки трипсином показало, что вся радиоактивность локализуется во фрагменте с молекулярной массой 42 000, т. е. именно в том, который обладает тирозинкиназной активностью.

Поэтапный протеолиз рецепторного белка возрастающими концентрациями трипсина в сочетании с изучением первичной структуры рецептора позволил установить следующее. Вся молекула рецептора состоит из 1186 аминокислотных остатков, из которых 621 остаток приходится на внеклеточный участок с лигандсвязывающим центром (A. Ulrich et al., 1984). Вслед за коротким внутримембранным сегментом и прилегающим к нему участком цепи из 50 остатков следует погруженный в цитоплазму С-концевой домен из 250 аминокислотных остатков с активностью протеинкиназы. Именно в пределах этого домена, ближе к С-концу молекулы, находятся три остатка тирозина, подвергающиеся аутофосфорилированию (рис. 7).

Подобно инсулиновому рецептору, рецептор гормона роста приобретает более высокую тирозинкиназную активность после связывания лиганда. В этих условиях наиболее эффективно фос-

фосфорилируется остаток тирозина, находящийся в позиции 14 со стороны С-конца молекулы (J. Downward et al., 1984).

Приведенные выше данные имеют несомненное значение для оценки возможных механизмов реализации сигнальных функций рецепторов и, в частности, рецептора гормона роста. Очевидно, что под влиянием лиганда осуществляется аллостерическая активация ферментативной функции рецепторного белка, причем

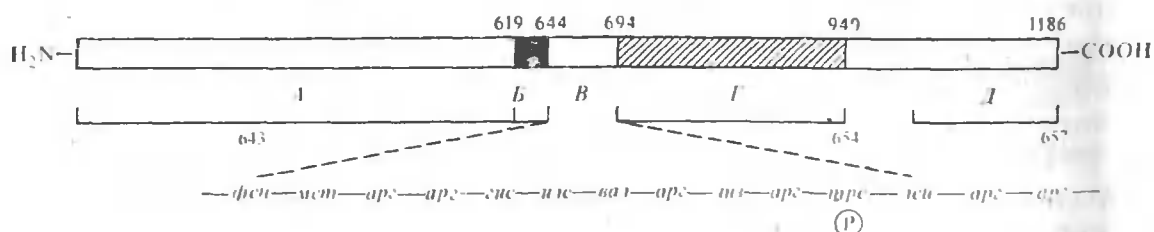


Рис. 7. Расположение функционально активных участков в молекуле рецептора эпидермального фактора роста:

А — внеклеточный участок, В — внутримембранный участок, В — участок с остатком тирозина, фосфорилируемым протеинкиназой С (представлена последовательность), Г — участок внутриклеточного домена с тирозинкиназной активностью, Д — участок внутриклеточного домена, подвергающийся фосфорилированию

обладающий каталитической активностью домен погружен в цитоплазму. Существенно, что в изолированном виде внутриклеточный домен рецептора обладает ферментативной активностью, хотя и не способен связывать гормон. Поэтому в случае внутриклеточного протеолиза рецепторного белка и высвобождения домена со свойствами тирозинкиназы он мог бы самостоятельно проявить свою каталитическую активность. Такая возможность существует при внутриклеточном расщеплении интернализированных рецепторов, которые до поглощения клеткой были агрегированы мультивалентным лигандом (см. разд. 1.4).

Гормоны роста, к числу которых принадлежит эпидермальный фактор роста, представляют собой достаточно большую группу ростовых факторов. К ним относятся также гормон роста нервов, продуцируемый тромбоцитами фактор роста, инсулиноподобный ростовой фактор. Для каждого из этих факторов существуют специализированные клеточные рецепторы. Это означает, что указанные рецепторы отличаются по строению лигандсвязывающих центров. Вместе с тем все эти рецепторы сходны между собой тем, что обладают протеинкиназной активностью, специфически фосфорилируя остатки тирозина (L. J. Pike et al., 1983; S. Jakobs et al., 1983). Это наводит на мысль, что тирозинкиназная активность необходима для реализации сигнальных функций самых разнообразных ростовых факторов.

Действие ростовых факторов на клетки-мишени состоит прежде всего в быстрой (в течение 12—24 ч) индукции биосинтеза ДНК, которой предшествует экспрессия целого ряда генов в клетке. Очевидно, что не фактор роста, а его рецептор обеспечивает реализацию указанных эффектов благодаря наличию у ре-

цепторного белка ферментативной активности. Последняя не ограничивается тирозинкиназной активностью. Согласно данным Б. Мрочковски и сотрудников (1984), полученные методами аффинной хроматографии препараты рецепторов гормона роста кожи обладают эндонуклеазной активностью. Фермент высоко-специфичен в отношении двухспиральной ДНК. Его активность проявляется в присутствии АТФ, но не его аналогов, не способных к гидролизу. По своим свойствам фермент, сцепленный с рецепторным белком, напоминает ДНК-топоизомеразу II. Последняя катализирует топологическую перегруппировку ДНК, т. е., процесс, который, как предполагают, имеет существенное значение для регуляции репликации и транскрипции.

В последнее время в клеточной биологии выявлена связь фактора роста кожи с активацией топоизомеразы. Установлено увеличение активности ДНК-топоизомеразы II под влиянием гормона роста в фибробластах эпидермиса кожи, а также при регенерации печени (R. Miskimins, 1983; M. Duguet et al., 1983). Весьма значим для обсуждаемой проблемы тот факт, что топоизомераза ковалентно связана с 5'-концом растущей нити ДНК посредством фосфотирозиновых связей (Y.-C. Tse et al., 1980). Как было показано выше, внутриклеточный домен рецептора для эпидермального гормона роста кожи обладает активностью тирозинкиназы.

Выше обращали внимание на необходимость тщательной проверки чистоты препаратов клеточных рецепторов, выявление в изучаемом препарате примеси клеточных ферментов. Так, например, было установлено присутствие в препаратах рецептора гормона роста фермента — фосфотидилинозиткиназы. Последняя выделяется вместе с рецептором даже при использовании для его очистки методов аффинной хроматографии на иммобилизованном гормоне или иммобилизованных моноклональных антителах против рецептора (D. M. Thompson et al., 1985). Несмотря на эти факты, существуют веские основания утверждать, что у рецептора гормона роста имеется собственная ферментативная активность, в том числе эндонуклеазная. Об этом свидетельствуют следующие наблюдения.

Показано, что белки, являющиеся продуктами онкогенов вируса саркомы Рауса, содержат в своем составе тирозинкиназу. Последняя на 90% повторяет первичную структуру цитоплазматического домена рецептора гормона роста (J. Downward et al., 1984; A. Ulrich et al., 1984; C. R. Lin et al., 1984). Упомянутый белок, обозначенный как *v-erb*, помимо тирозинкиназной активности обладает также активностью эндонуклеазы. Продемонстрирована в свою очередь высокая степень гомологии кДНК для рецептора гормона роста и *v*-онкогенов, кодирующих белок *v-erb* и другие белки с активностью тирозинкиназы.

Разумеется, на многие вопросы, возникающие в связи с приведенными данными, еще предстоит дать ответ. Существенно, однако, что упоминавшиеся онкобелки представляют подобие

изолированных внутриклеточных доменов рецепторов гормона роста. Изолированные внутриклеточные домены указанного рецептора могут образоваться и в процессе расщепления агрегированных гормоном рецепторов (см. разд. 1.4). Поэтому они, подобно онкобелкам, способны проявлять свою ферментативную активность и обеспечивать реализацию сигнальных функций рецептора для гормона роста.

Протеинкиназа С. Этот фермент играет важную роль в реализации сигнальных функций рецептора гормона роста. Он принадлежит к числу мембраносвязанных и может быть обнаружен в клетках самых различных органов и тканей. Протеинкиназа С содержит внеклеточный домен, избирательно связывающий такие индукторы опухолевого роста, как форболовые эфиры, например 12-*о*-тетрадеканойлфорбол-13-ацетат (сокращенно ТРА). Это соединение содержит в качестве одного из радикалов структуру, подобную диацилглицерину. Связывание последнего протеинкиназой С приводит к ее активации и, как следствие этого, фосфорилированию в присутствии Ca^{2+} остатков серина и треонина во внутриклеточных белках. Субстратом для протеинкиназы С в числе других, служит рецептор гормона роста. Его модификация протеинкиназой С препятствует аллостерической активации тирозинкиназы рецептора с помощью гормона роста (Y. Nishizuka, 1984). Установлено, что в этих условиях фосфорилируется остаток треонина в положении 654 полипептидной цепи рецептора гормона роста кожи. Положение этого остатка указано на рис. 7. Он расположен в участке цепи, непосредственно прилежащем к клеточной мембране со стороны цитоплазмы (T. Hunter, 1984). Участок построен преимущественно из основных аминокислот. Это позволяет предположить, что появление в его составе отрицательно заряженной группы ведет к существенной конформационной перестройке, исключающей аллостерическую активацию тирозинкиназы, которая происходит в норме при связывании гормона внеклеточным участком рецептора.

Начальный этап активации клеток под влиянием самых различных факторов связан с быстрым распадом фосфатидилинозита, входящего в состав фосфолипидов клеточной мембраны. Так как при гидролизе этого субстрата образуется диацилглицерин, то активации клеток сопутствует кратковременная активация протеинкиназы С. В случае действия на клетки канцерогенов происходит, видимо, продолжительное образование диацилглицерина и, как следствие, неконтролируемая активация протеинкиназы С (Y. Nishizuka, 1984). «Выключая» тирозинкиназу рецептора гормона роста, протеинкиназа в этих условиях изменяет характер внутриклеточного фосфорилирования белков, что может служить одной из существенных причин неконтролируемой гормоном роста пролиферации клеток под действием канцерогена.

Активация рецептора лигандом. Ферментативная активность клеточных рецепторов зависит от связывания ими лигандов и

обусловлена конформационными изменениями молекул рецептора. Даже в том случае, когда собственно рецепторный белок не обладает ферментативной активностью, обусловленные лигандом изменения его конформации могут привести к изменению активности ферментов, образующих комплекс с молекулой рецептора. В качестве примера можно привести влияние лигандов на свойства рецептора макрофагов мыши, связывающего гомологичный Ig G (Ig G2-подкласс этих белков). Указанный рецептор принадлежит к гетерогенной по функциональным свойствам группе Fc-рецепторов, т. е. рецепторов, связывающих иммуноглобулины через Fc-участок последних. Цитоплазматический домен рецептора связан с фосфолипазой А, находящейся в мембране макрофага. В результате взаимодействия рецептора с Ig G2 происходит активация ассоциированной с рецептором фосфолипазы А (T. Suzuki et al., 1982).

Описываемые здесь эксперименты были выполнены на изолированном комплексе фермент — рецептор. Однако их результаты позволяют предположить, что аналогичный процесс происходит и в клетке, играя важную роль в реализации биологического действия Fc-рецепторов: их участия в захвате макрофагами комплексов антигена с Ig G-антителами. Активация фосфолипазы, приводящая к расщеплению мембранных фосфолипидов и образованию их мезоформ, будет способствовать локальной дестабилизации мембраны, впячиванию этого участка внутрь клетки и тем самым поглощению ассоциированного с Fc-рецептором комплекса антиген — антитело.

Другим примером функционально-активного комплекса между клеточным рецептором и мембранными белками служит комплекс β_2 -адренергического рецептора, белка N_s , связывающего гуанозинтрифосфат (ГТФ) и аденилатциклазу. Изучение поведения системы указанных белков в мембране показало, что взаимодействие с белком N_s приводит к увеличению сродства рецептора к аналогам катехоламина. В свою очередь взаимодействие белка N_s с ГТФ сопровождается потерей сродства этого белка к рецептору и, как следствие этого, к уменьшению сродства последнего к своему лиганду. Под действием аденилатциклазы происходит расщепление ГТФ до ГДФ, что приводит к возвращению белка N_s к конформации, способствующей его взаимодействию с рецептором (D. Cassel, Z. Selinger, 1976; T. Pfeuffer, 1979; В. А. Ткачук, 1983). Таким образом, сложный комплекс, включающий β_2 -адренергический рецептор, способен претерпевать ряд конформационных превращений, обратимо влияющих на лигандсвязывающие свойства рецептора и функциональную активность ассоциированных с ним белков. В самом деле, участие белка N_s в расщеплении ГТФ зависит от структуры лиганда, связываемого рецептором. Так, при связывании им β -адренергического агониста — изопротеренола — активность белка N_s возрастает в 2—5 раз. Напротив, связывание рецептором другого агониста — алпренолола сопровождается подавлением фер-

ментативной активности белка N_S . Эти результаты свидетельствуют о различиях в конформационных превращениях рецептора в зависимости от строения связываемого им лиганда.

2.2. Взаимодействие рецепторов с белками клеточного ядра и ДНК

Реализация эффекторных функций рецепторов в случае отсутствия у них собственной ферментативной активности может быть достигнута благодаря их избирательному сродству к структурам клеточного ядра.

Взаимодействие с ядерными белками. Характерным свойством клеточных рецепторов стероидных гормонов является их способность связываться с определенными белками ядерного матрикса. Последний играет, вероятно, важную роль в процессах транскрипции, поскольку с ядерным матриксом связаны именно те гены, которые транскрипционно активны (B. Nelkin et al., 1980; S. I. Robinson et al., 1982).

В модельных экспериментах *in vitro* получены важные данные о механизме взаимодействия рецепторов андрогенов с ядерным матриксом. В опытах использовали частично очищенные препараты рецепторов, которые выделяли или из клеточных мембран, или непосредственно из ядер (D. S. Colvald, E. M. Wilson, 1984). В присутствии Zn^{2+} и меркаптоэтанола сродство рецептора дигидротестостерона к матриксу очень велико ($K_a = 10^{13} \text{ M}^{-1}$). Более 50% от общего количества молекул рецептора, связанных с ядрами клеток опухоли простаты крыс, удается элюировать в присутствии ЭДТА или пиродоксаль-5'-фосфата. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что связывание рецептора ядерным матриксом осуществляется с образованием хелатного комплекса при участии ионов Zn . Другие двухвалентные катионы либо вовсе неэффективны, либо значительно менее активны, чем Zn^{2+} .

Эти данные хорошо согласуются с наблюдениями, согласно которым ионы Zn играют важную роль в половом созревании самцов. В норме у последних происходит накопление ионов Zn в яичках и простате, где концентрация Zn^{2+} достигает высокого уровня. В случае дефицита цинка в диете наблюдается дегенерация яичек и снижение продукции сперматозоидов. У крыс с генетическим дефектом в продукции андрогенных рецепторов (синдромом тестикулярной феминизации) наряду с отсутствием чувствительности к андрогенам снижен уровень Zn в яичках по сравнению с нормальными мужскими особями того же вида.

Сравнительные исследования показали, что рецепторы андрогенов значительно эффективнее связываются с ядерным матриксом клеток простаты, чем с ядерным матриксом клеток печени. Это указывает на специфичность связывания рецептора матриксом ядер клеток именно тех органов, функция которых регулируется

андрогенами. Если принять во внимание, что рецепторы андрогенов связываются преимущественно негистоновыми белками хроматина, богатыми основными аминокислотами (L. Koop, T. Spelsberg, 1982), то можно предсказать существование различий в продукции негистоновых белков указанного типа в клетках разных органов.

Рецепторы андрогенов взаимодействуют с белками клеточного матрикса структурами, находящимися вне лигандсвязывающего центра. В пользу этого свидетельствует, во-первых, тот факт, что уже фиксированный на матриксе рецептор способен связывать меченые андрогены; во-вторых, участие особого регуляторного белка в связывании рецепторов белками матрикса. Установлено (D. S. Colvald, E. Wilson, 1984), что в клетках-мишенях содержится белок, взаимодействующий с рецепторами андрогенов. Если последние имеют константу седиментации, равную 4,5 S, то константа седиментации образующегося комплекса составляет около 8,0 S. В комплексе с регуляторным белком рецептор утрачивает сродство к матриксу. Другие белки (яичный альбумин, мнोगлобин, гамма-глобулин) не оказывали влияния на связывание рецепторов ядерным матриксом. Регуляторный белок (к которому удалось получить моноклональные антитела) сходен или идентичен белкам, выявленным в составе неактивных в биологическом отношении рецепторов для эстрогенов (прогестерон) и глюкокортикостероидов (B. Monclarmont et al., 1982). Полагают, что рецепторы разных стероидных гормонов обладают сходными эффекторными функциями, причем экранирование центров, ответственных за реализацию этих функций (а именно фиксации в ядрах клеток-мишеней), осуществляется группой сходных по строению регуляторных белков.

Известно, что к негистоновым белкам хроматина, богатым лизинном и аргинином, принадлежит группа так называемых *высокомобильных белков*, которым приписывают важную роль в регуляции активности генов, в том числе в процессах транскрипции (J. M. Walker, 1982). Эти белки разнообразны по своему строению и, вероятно, их набор неодинаков в ядрах клеток различных органов и тканей. Можно допустить, что рецепторы стероидных гормонов реагируют с определенными белками этой группы, вызывая конформационную перестройку последних, следствием чего будет изменение сродства этих белков к ДНК и активация определенных участков генома. При этом конформирующему влиянию рецептора стероидного гормона на белки ядерного матрикса предшествует изменение конформации самого рецептора, обусловленное гормоном. Такая аллостерическая модификация рецептора называется *активацией рецептора* (K. Yamamoto, B. M. Alberts, 1976). В пользу описанной схемы свидетельствует, в частности, следующий факт: с помощью двумерного электрофореза можно установить изменение электрофоретических свойств около 1% всех белков ядра клеток печени после добавления к ним глюкокортикоидов (R. D. Ivarie, P. O'Farrel, 1978).

Взаимодействие с ДНК. Существуют сведения, согласно которым рецепторы глюкокортикоидов способны взаимодействовать непосредственно с ДНК (D. D. Moog, 1985). Принимая во внимание всю значимость этого факта, необходимо подробнее рассмотреть результаты указанного исследования.

Клонировали фрагмент ДНК человека, содержащий полный ген для гормона роста. С помощью набора рестриктаз были получены фрагменты гена и обнаружен тот его участок, который связывает меченый рецептор глюкокортикоида. Было показано, что в случае метилирования ДНК в условиях, приводящих к появлению примерно одного 7-метилгуанина на фрагмент, связывание рецептора с соответствующими фрагментами ДНК прекращается. Таким способом удалось установить, что центр связывания рецептора состоит из двух подцентров, каждый из которых образован шестью основаниями. При этом комплекс с ДНК формирует только активированный лигандом рецептор. Эти и другие данные позволили заключить, что глюкокортикоидный рецептор взаимодействует с тем участком полного гена гормона роста, который выполняет функцию регулятора транскрипции этого гена.

Особого внимания заслуживает тот факт, что модель комплекса ДНК — глюкокортикоидный рецептор напоминает структуру комплекса прокариотических репрессоров *lac*, *λс1*, *λсro* с соответствующими центрами бактериальной ДНК. Примерно ту же структуру имеет комплекс бактериальной ДНК и белка, связывающего циклический АМФ. Указанный рецепторный белок рассматривается в качестве плеотропного активатора транскрипции генов у бактерий. Его регуляторные функции, как предполагают, могут заключаться в формировании комплекса с РНК-полимеразой; при этом образованию комплекса должна предшествовать активация рецепторного белка за счет связывания им своего лиганда — циклического АМФ (B. de Crombrughe et al., 1984). Таким образом, механизм реализации эффекторных функций глюкокортикоидного рецептора, видимо, имеет древнее филогенетическое происхождение.

Из материалов, изложенных в настоящей главе, следует, что эффекторные функции клеточных рецепторов весьма многообразны и зависят от их функциональной роли. Это особенно отчетливо проявляется, когда идет речь о сходных по эффекторным функциям, но различающихся по лигандсвязывающим свойствам рецепторах. В самом деле, как рецептор инсулина, так и рецептор гормона роста обладают тирозинкиназной активностью. С учетом знаний о функциональной роли рецептора гормона роста (его способности выступать в качестве промотора пролиферации и дифференцировки клеток) можно ожидать проявления сходной функции у рецептора инсулина. И действительно, для адипоцитов, находящихся на ранних стадиях онтогенеза (*преадипоциты*), инсулин ведет себя подобно гормону роста, обеспечивая пролиферацию и дифференцировку этих клеток

(G. Serrero, J. Khoo, 1982). В то же время для высокодифференцированных адипоцитов и трансформированных преадипоцитов (линия клеток, происходящих из высокодифференцированных адипоцитов) инсулин выступает лишь в качестве регулятора жирового обмена (P. Grimaldi, 1983).

В обоих случаях действие гормона опосредуется одним и тем же по строению и свойствам рецептором, но возможности для реализации его эффекторных функций неодинаковы и зависят от стадии дифференцировки клетки-мишени. Уже на этом основании можно заключить, что *реализация эффекторных функций того или иного рецептора, опосредующего биологическое действие лиганда, зависит от комплекса факторов*. Эти факторы определяются конкретной программой клеточной дифференцировки, а роль рецепторов сводится лишь к регуляции отдельных звеньев этой программы.

К настоящему времени представляется возможным сформулировать в наиболее общей форме основные закономерности реализации эффекторных функций клеточных рецепторов.

1. *Избирательный эндоцитоз рецепторов под влиянием лигандов*. Этот процесс значим для реализации биологического действия многих изученных рецепторов. Он требует кооперативной активации ряда ферментативных систем клетки, связан с потреблением энергии и протекает в несколько этапов (более подробную информацию о механизме эндоцитоза рецепторов читатель может получить из книги Р. Н. Глебова «Эндоцитоз и экзоцитоз», выходящей в этой серии).

2. *Лигандозависимая активация рецептора*. На основе конформационного перехода в молекуле рецепторного белка происходит аллостерическая активация эффекторных центров, расположенных в цитоплазматическом домене рецептора. В зависимости от его строения процесс будет сопровождаться либо усилением ферментативной активности рецепторного белка, либо появлением «площадок» для связывания рецептора с белками хроматина или собственно ДНК. Иницилируемые лигандом конформационные переходы в молекуле рецепторного белка приобретают устойчивый характер при участии ряда ферментативных систем клетки. Важная роль здесь принадлежит, как предполагают, трансглутаминазе. Этот фермент гидрофобным участком встроен в клеточную мембрану. В покое клетки он не активен, но приобретает активность при изменении микровязкости клеточной мембраны, например при действии на клетку фосфолипаз или протеиназ (L. Fesus, 1984). В присутствии Ca^{2+} активированный фермент за счет переноса ацильной группы между остатками глутамина и первичными аминами способен, в частности, обеспечить формирование ковалентных связей в полипептидных цепях одного и того же или различных белков.

В прямых экспериментах установлено, что трансглутаминаза способна полимеризовать очищенные Fc-рецепторы (L. Fesus et al., 1982, 1984). За счет формирования внутримолекулярных

связей этот фермент способен стабилизировать конформацию рецептора, приобретенную им в результате связывания лиганда. Так, ингибиторы трансклутаминазы блокируют индуцированный лигандом переход низкоаффинного рецептора к α_2 -макроглобулину в высокоаффинную форму (R. B. Dickson, 1981).

3. *Образование макроэргических соединений.* Для ряда рецепторов гормонов и медиаторов (стероидные гормоны, β -адренергические лиганды и др.) установлена структурно-функциональная связь с аденозин- и гуанозинтрифосфатазами, а также с аденилатциклазами. Взаимодействие лиганда с рецептором, вызывающее его конформационную перестройку, сопровождается нарушением структурно-функциональных связей рецептора с другими мембраносвязанными белками. В результате прямо или опосредованно активируются упомянутые выше ферменты, обеспечивающие энергетически процесс эндоцитоза лиганд-рецепторного комплекса, а в некоторых случаях (например, для рецепторов, связывающих интерфероны) выполнение сигнальных функций.

2.3. Транспортные белки и клеточные рецепторы

Транспорт низкомолекулярных метаболитов в клетки эукариот осуществляется при участии специальных транспортных систем. Перенос в клетку сахаров, фосфорилированных пуриновых и пиримидиновых оснований, аминокислот осуществляется при участии *транспортных белков* — транспортеров, интенсивное изучение которых начато в последние годы. Транспортные белки образуют одну из самых больших групп белков клеточной мембраны. Достаточно сказать, что в эритроцитах человека только молекулы транспортера глюкозы составляют 2,5—5,0% всех мембранных белков (W. Allard, G. Lienhard, 1985).

Идентификацию и выделение транспортных белков осуществляют принципиально теми же методами, что и клеточных рецепторов (см. гл. 1). Для *идентификации белка* применяют конкурентные ингибиторы транспорта определенных метаболитов, способные ковалентно присоединяться к транспортеру. Так, например, ингибиторами транспорта глюкозы в клетки эукариот служат мальтозоил-изотиоцианат или цитохалазин В. При использовании, в частности, меченного (^3H) — цитохалазина В, удается зарегистрировать его связывание как с клеточной мембраной неразрушенных клеток, так и солюбилизованным материалом клеточных мембран (Y. Oka, M. P. Czech, 1984; W. Allard, G. Lienhard, 1985). Специфичность связывания цитохалазина В с транспортером D-глюкозы можно оценить по ингибированию этого процесса в присутствии избытка глюкозы.

Применение иммобилизованных лигандов позволяет получать транспортные белки в очищенном виде и исследовать их с помощью физико-химических и иммунохимических методов. Так, В. Аллард с соавторами (1985) получил моноклональные анти-

тела к транспортеру глюкозы и показал, что молекулярная масса этого белка, содержащегося в мембранах эритроцитов человека, составляет около 55 000. Эта величина близка к величине молекулярной массы транспортера глюкозы, выделенного И. Ока и М. Чехом (1984) из мембран адипоцитов крысы (46 000).

С помощью моноклональных антител установлено, что транспортер глюкозы имеет идентичное строение в различных клетках особей одного и того же биологического вида. Вместе с тем идентичные по функции транспортные белки у особей различных видов отличаются по своему строению. Так, антитела против транспортера глюкозы из клеток человека не реагировали с аналогичным транспортером из клеток жвачных животных и птиц.

Несмотря на отмеченные различия, транспортные белки вне зависимости от своей специфичности имеют, по-видимому, *общие принципы структурной организации*. В частности, различающиеся по специфичности транспортеры обладают сходными молекулярными массами. Так, различные транспортеры глюкозы имеют молекулярную массу порядка 45 000—55 000 (см. выше), а транспортер нуклеозидов характеризуется молекулярной массой 45 000—66 000 (J. D. Young et al., 1984).

При сравнении сродства транспортных белков к структурным аналогам метаболитов можно заключить, что некоторые из них имеют высокую специфичность связывания лигандов. Например, константа связывания транспортера нуклеозидов с нитрофенилтиоинозином (обратимо ингибирует транспорт нуклеозидов в клетку) составляет порядка 10^{-9} — 10^{-10} М. Связыванию этого лиганда с транспортером препятствует нитрофенилтиогуанозин, а аденозин оказывает на связывание нитрофенилтиоинозина выраженное ингибирующее влияние. Из этих данных следует, что упомянутый транспортный белок обладает весьма широким спектром специфичностей при высокой степени сродства к различным по строению лигандам. Можно допустить, что активный центр транспортера содержит несколько участков для связывания каждого из распознаваемых им лигандов. Тем самым он может быть уподоблен активному центру антитела, имеющему несколько неперекрывающихся (или частично перекрывающихся) участков для различных по строению антигенных детерминант (A. Nisonoff et al., 1975; А. Я. Кульберг, 1985). Действительно, если участки частично перекрываются между собой, то всего один конкурирующий за общую «площадку» ингибитор способен препятствовать связыванию, по меньшей мере, двух различающихся по структуре лигандов.

В пользу высказанного выше предположения свидетельствуют данные, полученные при изучении транспортных белков для аминокислот. Установлено, что транспорт 14 природных нейтральных аминокислот в клетки китайского хомячка подавляют всего два ингибитора: 2-метиламиноизомасляная кислота и 2-аминобицикло-[2,2,1]-гептан-2-карбоновая кислота. Существованием перекрывающихся участков в активных центрах транспортных

белков для аминокислот можно объяснить, в частности, тот факт, что перенос в клетку метионина, лейцина и цистеина блокируют оба использованных ингибитора, причем степень ингибирования для каждой аминокислоты неодинакова (M. A. Shotwell et al., 1983, 1984). В свете изложенного видно, что анализ лигандсвязывающих свойств транспортных белков открывает новые возможности для понимания общих принципов распознавания лигандов рецепторными и другими белками.

Транспортные белки и клеточные рецепторы функционально связаны между собой. Такая связь убедительно прослежена для транспортера глюкозы, чему способствовал уже сравнительно давно установленный факт стимулирующего действия инсулина на перенос глюкозы в клетку. Анализ этого явления привел к предположению, что под влиянием инсулина возрастает содержание молекул транспортера в цитоплазматической мембране, причем в форме, доступной для связывания глюкозы. Так как эффект достигается в течение нескольких минут после добавления инсулина к клеткам-мишеням и зависит от АТФ (Т. Кono et al., 1977), можно было связать его прежде всего с транслокацией транспортера, а не с какими-либо биосинтетическими процессами.

Проверка гипотезы была основана на определении содержания транспортера глюкозы в клеточной мембране. О содержании транспортера судили по связыванию им цитохалазина В. Оказалось, что инсулин действительно увеличивает содержание функционально активных транспортеров глюкозы в клеточной мембране (L. J. Wardzala et al., 1978). Этот процесс обусловлен быстрым и обратимым переходом транспортера из микросомальной мембранной фракции низкой плотности в цитоплазматическую мембрану (S. Cushman et al., 1981; Т. Кono et al., 1981—1984). При оптимальной для стимуляции транспорта глюкозы концентрации инсулина содержание транспортера в мембранах адипоцитов возрастает примерно в пять раз. Эффект достигается уже через 2,5 мин и обратим наполовину через 9 мин.

Существенно, что после обработки клеток трипсином инсулин уже не способен оказать влияние на транслокацию транспортера глюкозы в клеточную мембрану. Последнее можно объяснить отщеплением внеклеточного участка рецептора инсулина под действием трипсина. В результате распознавание инсулина клеткой становится уже невозможным.

С учетом имеющихся данных построена следующая схема транслокации транспортера глюкозы под влиянием инсулина (рис. 8). Связывание инсулина рецептором (стадия 1, 2) приводит к появлению неизвестного по смыслу сигнала, который обеспечивает в несколько этапов (стадия 3—5) транслокацию транспортера из цитоплазматических гранул в клеточную мембрану. В результате перенос глюкозы в клетку усиливается (стадия 6). Диссоциация комплекса инсулин — рецептор (стадия 7) прекращает этот процесс, так как в этих условиях транспортеры в фор-

ме цитоплазматических везикул перемещаются внутрь клетки. В целом процесс сходен с процессом рециркуляции клеточных рецепторов (см. гл. 1).

Для оценки ряда еще не вполне ясных этапов транслокации транспортных белков важно следующее. Некоторые вещества, в

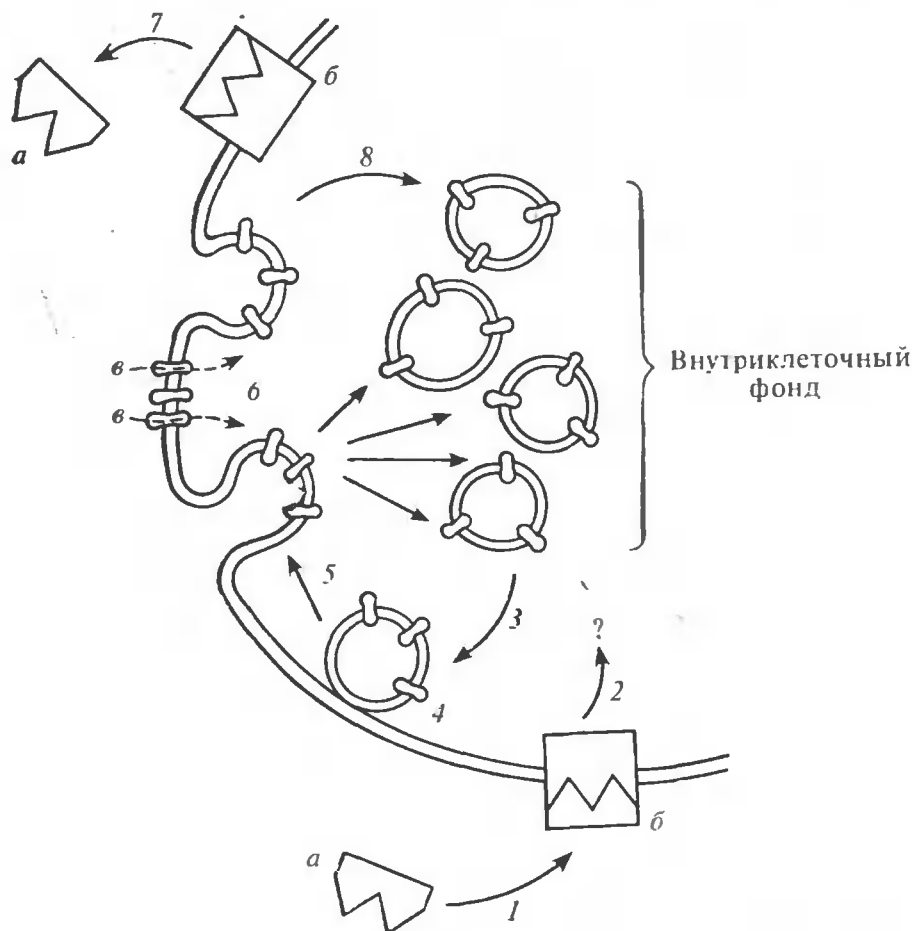


Рис. 8. Транслокация транспортера глюкозы с участием инсулина и его рецептора:

a — инсулин, *б* — рецептор инсулина, *в* — транспортер глюкозы; 1—8 — основные этапы транслокации; 1 — взаимодействие инсулина со своим рецептором, 2 — интернализация комплекса инсулин — рецептор, 3, 4 — перемещение транспортера из цитоплазмы к поверхности клетки, 5, 6 — встраивание транспортера в мембрану, 7 — возвращение (экстернализация) инсулинового рецептора на клеточную поверхность, 8 — возвращение транспортера, связавшего глюкозу, с клеточной поверхности в цитоплазму

том числе трис-буфер, усиливают процесс спонтанной (независимая от инсулина) транслокации транспортера в клеточную мембрану. В этих же условиях наблюдается спонтанная интернализация инсулиновых рецепторов клетками. Однако транспорт глюкозы в описанных условиях не возрастает. Только после добавления в среду инсулина перенос глюкозы в клетку усиливается. Следовательно, только после взаимодействия инсулина со своим рецептором переместившийся в мембрану клетки транспортер приобретает способность переносить глюкозу (I. Simpson,

1982). Но, как известно, взаимодействие инсулина со своим рецептором приводит к активации тирозинкиназы — внутриклеточного домена β -цепи рецептора. Следует также принять во внимание приведенные в этом разделе данные, свидетельствующие о зависимости транспорта глюкозы в клетку от наличия АТФ. В совокупности все эти факты могут означать, что *перенос глюкозы, осуществляемый транспортером, происходит лишь при условии его фосфорилирования по остаткам тирозина с помощью активированной инсулином тирозинкиназы инсулинового рецептора.* Разумеется, высказанное предположение нуждается в экспериментальной проверке.

Активные центры клеточных рецепторов

3

Клеточные рецепторы избирательно взаимодействуют с самыми разнообразными по химическому строению веществами — от органических соединений с небольшой молекулярной массой до высокомолекулярных белков. Размеры молекул рецепторных белков, число образующих их полипептидных цепей варьируют (табл. 1). Вполне закономерно поэтому стремление выявить характерные для каждого рецептора особенности структуры участка, ответственного за распознавание лиганда. Вместе с тем анализ функциональных свойств различных по специфичности (т. е. распознающих различные лиганды) рецепторов выявляет определенные черты сходства между ними. Как было показано в гл. 2, при взаимодействии рецепторов со своими лигандами происходит их активация, выражающаяся либо в усилении ферментативной активности рецепторов, либо в изменении их сродства к внутриклеточным белкам или ДНК. Этот процесс связан с глубокой конформационной перестройкой рецепторных белков, распространяющейся на участки, находящиеся на большом удалении от центров связывания лигандов (активные центры рецепторов). Последнее дает основание считать, что внеклеточные участки различных по специфичности рецепторов, в пределах которых находятся активные центры последних, должны использовать *сходные принципы структурной организации*, обеспечивающие при связывании любого по строению лиганда *изменение конформации внутриклеточных участков молекул рецепторов*.

При рассмотрении поставленной проблемы важное значение приобретает «эталон сравнения» — белок (семейство белков), с которым можно было бы сравнивать различные рецепторные белки по их структурно-функциональным свойствам. В качестве «эталонных белков» обоснованно использовать иммуноглобулины. Иммуноглобулины в качестве антител способны распознавать на специфической основе разнообразные лиганды (антигены, гаптены); участки молекул антител, отвечающие за организацию их активных центров, имеют высокую степень сходства принципов структурной организации. Вместе с тем участки молекул иммуноглобулинов, отвечающие за их эффекторные функ-

ции, различаются между собой. Реализация эффекторных функций иммуноглобулинов (антитела) связана с конформационной перестройкой их молекул, происходящей в результате связывания лиганда в активном центре молекулы антитела. Наконец, что весьма существенно, иммуноглобулины способны выполнять функции клеточных рецепторов у определенной категории лимфоцитов — так называемых В-клеток. В этой и последующих главах при рассмотрении вопросов, связанных со строением внеклеточных участков клеточных рецепторов и происхождением генов, кодирующих лигандсвязывающие участки рецепторов, будут приведены данные в пользу сходства на структурно-генетической основе активных центров рецепторов и антител. Однако прежде необходимо рассмотреть основные методические принципы изучения строения активных центров рецепторов.

3.1. Принципы исследования активных центров рецепторов

Локализация активного центра. С помощью протейназ, имеющих оптимум действия в нейтральной среде (например, трипсин), можно расщепить молекулу изолированного рецепторного белка на несколько функционально-активных доменов. В гл. 2 приведены результаты подобного исследования, выполненного на рецепторе эпидермального гормона роста. Кратковременная обработка самых разнообразных клеток трипсином позволяет отщепить внеклеточные участки рецепторов различной специфичности. При этом не происходит разрушения активного центра, расположенного в пределах этого участка, что позволяет с использованием иммобилизованного лиганда изолировать внеклеточные участки рецепторов данной специфичности.

В том случае, когда рецептор построен из нескольких субъединиц, необходимо установить вклад каждой из них в формирование активного центра. Для этого производят разделение субъединиц изолированного рецептора, прибегая при необходимости к восстановлению межсубъединичных дисульфидных связей. Подобный анализ, выполненный, например, на инсулиновом рецепторе, показал, что за связывание гормона отвечает α -субъединица, в то время как β -субъединица какого-либо вклада в этот процесс не вносит (см. гл. 1).

Так как рецепторы содержат в своем составе как углеводные, так и липидные компоненты, представляется необходимым установить роль углеводов и липидов в проявлении лигандсвязывающих свойств рецептора. Для этого прибегают к отщеплению углеводного компонента с помощью ферментов и (или) обработке очищенных препаратов рецептора органическими растворителями. Таким путем был установлен существенный вклад олигосахаридов, содержащихся в молекуле рецептора для третьего компонента комплемента (C3), в связывании этим рецептором

лиганда — активного фрагмента СЗ (СЗb). Обработывая лимфоциты с помощью нейраминидазы и проназы, удалось показать, что экспрессируемый этими клетками рецептор агглютинина фасоли представляет собой, видимо, гликолипид либо гликолипопротеин (E. Tugrin et al., 1984). В свою очередь удаление фосфолипидного компонента Fc-рецепторов макрофагов путем обработки очищенных препаратов рецептора с помощью анионного детергента приводило к утрате рецептором способности связывать Ig G (M. Itonaga et al., 1984).

Сведения об инаktivации рецептора после удаления его углеводного и липидного компонентов не могут служить достаточным основанием для заключения, что именно эти компоненты отвечают за лигандсвязывающие свойства рецептора. Вероятно, эти данные означают, что небелковые компоненты рецептора существенны для поддержания такой конформации его молекулы, которая необходима для обеспечения пространственной доступности активного центра для лиганда. Что касается собственно активного центра, то он, как правило, формируется полипептидной цепью (цепями) молекулы рецептора и находится в N-концевой части рецепторного белка.

Идентификация аминокислотных остатков в активном центре. С этой целью используют метод метки по сродству (см. гл. 1). Препараты рецепторов должны быть высокоочищенными. Лиганды с хорошо изученной структурой модифицируют с таким расчетом, чтобы они образовывали в активном центре рецептора ковалентные связи с боковыми аминокислотными остатками отрезков цепи, формирующих центр. Чаще других используют бромацетильные производные и фотоактивируемые производные лигандов. Доказательством фиксации лиганда именно в активном центре служит факт необратимого блокирования им центра, препятствующего связыванию немодифицированного меченого лиганда.

В качестве примера подобного исследования можно привести эксперименты по фиксации 11 α - или 16 α -(бромацетокси)прогестерона в активном центре рецептора этого гормона, полученного в очищенном виде из клеток матки человека (S. Holmes, R. Smith, 1983). После модификации рецептора с помощью лиганда производили гидролиз белка и определяли, с какими аминокислотами связан гормон. Производное 11 α -прогестерона оказалось связанным с гистидином, а производное 16 α -прогестерона — и с гистидином, и с метионином. Следующий этап исследований, выполняемых с использованием метода метки по сродству, должен состоять в получении продуктов ограниченного гидролиза меченого лигандом рецептора и изоляции пептидов, содержащих ковалентно присоединенный лиганд. Затем может быть изучена аминокислотная последовательность указанных пептидов и определено их положение в полипептидной цепи рецептора (в случае, если первичная структура рецептора уже исследована). Успешное применение указанной техники при исследовании

активных центров антител служит обнадеживающим основанием для проведения этих весьма трудоемких экспериментов.

Иммунологические методы. К очищенным рецепторам могут быть получены антитела как с помощью обычной техники иммунизации лабораторных животных, так и с использованием техники гибридом. Такие антитела можно использовать для сравнительной характеристики различных по специфичности рецепторов и для сопоставления строения активных центров рецепторов и антител, связывающих одни и те же лиганды.

Высокая чувствительность иммунологических методов открывает перед экспериментатором большие возможности как при сравнительном изучении строения, так и при исследовании биосинтеза клеточных рецепторов. Насколько эффективны эти методы для решения актуальных задач по изучению клеточных рецепторов, будет продемонстрировано в следующем разделе настоящей главы.

3.2. Существование общего принципа структурной организации активных центров рецепторов

Нетрудно представить себе, исходя из огромного разнообразия клеточных рецепторов, какой объем работы необходимо проделать, чтобы охарактеризовать строение активных центров рецепторов к достаточно большому числу лигандов. Если осуществлять такой анализ без предварительной гипотезы относительно возможных способов организации активных центров рецепторов, обобщить результаты химического анализа будет крайне затруднительно.

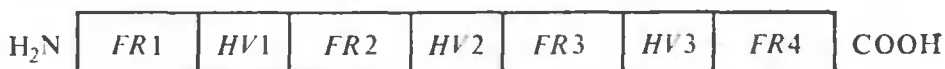
Большие возможности для формирования представлений о наиболее общих принципах организации активных центров рецепторов открываются в случае сравнения активных центров рецепторов и антител, направленных к одному и тому же лиганду.

Действительно, практически к любому лиганду: белкам, полисахаридам или низкомолекулярным соединениям, к которым существуют клеточные рецепторы или транспортные белки, могут быть получены антитела. На ряде экспериментальных моделей продемонстрировано, что *антитела и клеточные рецепторы конкурируют за один и тот же лиганд*. Это означает, что антитела и клеточные рецепторы способны, в принципе, распознавать одни и те же или близко расположенные в пространстве участки молекулы лиганда. Когда речь идет о таких лигандах, как, например, стероидные гормоны, то с помощью серии структурных аналогов последних представляется возможным с большой степенью достоверности ответить на вопрос, в какой степени совпадает специфичность антител и рецепторов, реагирующих с соответствующим гормоном. В других случаях, которые будут обсуждаться ниже, сравнительный анализ специфичности рецеп-

торов и антител требует использования таких характеристик, как идиотип антитела и клеточного рецептора.

Если антитела и клеточные рецепторы одним и тем же лигандом взаимодействуют с близкими константами связывания, существует ли сходство в строении их активных центров? Значимость ответа на этот вопрос весьма велика, так как с большой убедительностью доказано, что активные центры различных по специфичности антител построены по единому принципу и что активные центры любых по специфичности антител кодируют гены, принадлежащие к одному семейству, а именно семейству вариабельных генов для легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов. Более того, активным центрам антител полностью соответствуют по строению активные центры антигенсвязывающих рецепторов В — лимфоцитов, имеющих иммуноглобулиновую природу. Уже это означает, что, по меньшей мере, у клеток одного типа строение клеточных рецепторов (их активных центров) не имеет отличий от активных центров антител.

Здесь не рассматриваются подробно принципы организации активных центров антител (см.: М. Тернер, 1983; А. Я. Кульберг, 1985, 1986), однако необходимо напомнить, что специфичность им придают так называемые *гипервариабельные участки (HV)* вариабельных районов тяжелой (H) и легкой (L) полипептидной цепей. Как в тяжелой, так и легкой цепях находится по три гипервариабельных участка, которые разделены отрезками аминокислотной последовательности (FR), характеризующимися крайней консервативностью своего строения.



Гипервариабельные участки для каждого антитела, продуцируемого индивидуальной особью данного биологического вида и даже отдельными лимфоидными клетками данного индивидуума, уникальны по своему строению и отличаются от аналогичных участков антитела другой специфичности и даже от антитела той же специфичности, но синтезируемого другой лимфоидной клеткой. Таким образом, даже к такому простому химическому соединению, как например, динитрофенильная группа или арсанитовая кислота, существует большой набор вариабельных генов (V-генов), кодирующих целый спектр антител, каждое из которых будет иметь характерные для него особенности первичной структуры гипервариабельных участков.

Разделяющие гипервариабельные участки отрезки полипептидных цепей характеризуются выраженным консерватизмом первичной структуры. Они не только мало отличимы по своему строению у антител одинаковой специфичности, продуцируемых индивидуальными лимфоидными клетками, но и весьма сходны

у антител различной специфичности, продуцируемых особью данного биологического вида. На основе атласа аминокислотных последовательностей моноклональных иммуноглобулинов¹, составленного Т. Wu и Е. Kabat (1983), был осуществлен сравнительный анализ строения

четырёх консервативных участков варибельного района тяжелой цепи иммуноглобулинов мыши и четырех аналогичных участков варибельных районов легких цепей иммуноглобулинов того же животного (А. Я. Кульберг, 1986).

Прежде чем перейти к рассмотрению полученных результатов, необходимо напомнить, что в состав иммуноглобулинов могут входить два типа легких цепей — κ и λ , причем гены, кодирующие эти типы легких цепей, включая варибельные гены V_L , находятся в разных хромосомах. Поэтому первоначально осуществляли сравнение консервативных участков аминокислотных последовательностей V_{κ} - и V_{λ} -районов². Оказалось (рис. 9), что V -участки κ - и λ -цепей имеют несомненное сходство первичной структуры, а их короткие отрезки, входящие в $FR3$, практически идентичны. Высокая степень гомологии по $FR4$

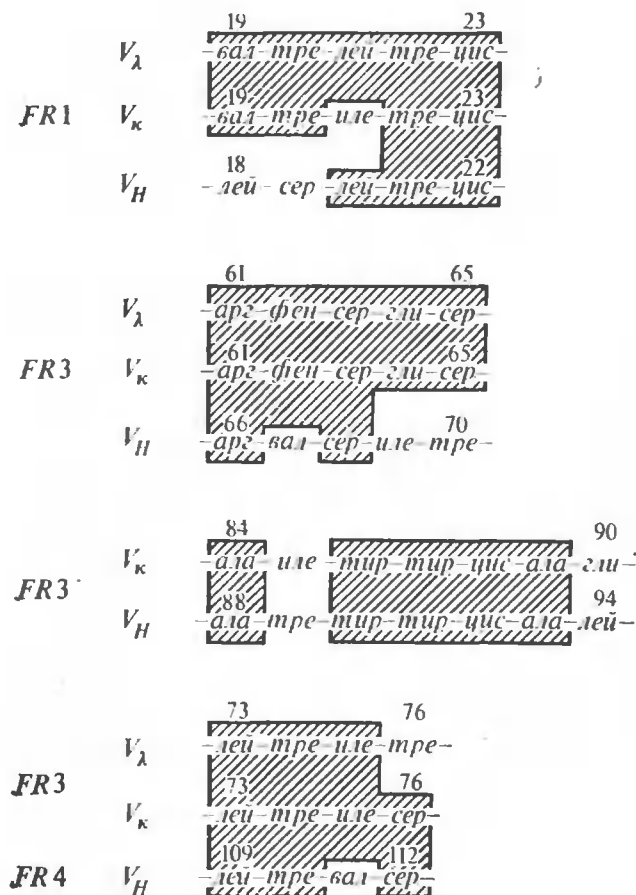


Рис. 9. Сходные аминокислотные последовательности в консервативных участках ($FR1$ — $FR4$) варибельных районов κ - и λ -цепей и тяжелой цепи иммуноглобулинов мыши

отмечена другими авторами (Н. Saito et al., 1984). При рассмотрении сходных последовательностей FR -участков κ - и λ -цепей как эволюционно наиболее устойчивых, установлено, что между этими участками и FR -участками V -района тяжелых цепей иммуноглобулинов мыши также существует определенное сходство первичной структуры (рис. 9).

¹ Моноклональными называют однородные иммуноглобулины, продуцируемые потомками одной лимфоидной клетки — клоном клеток.

² Консервативные участки V -районов получили сокращенное наименование FR (от англ. framework — скелетные, опорные).

Для развития приведенных выше данных необходимо указать, что иммуноглобулины различного видового происхождения также имеют выраженные черты сходства по V-участкам легкой и тяжелой цепей. При этом сравниваемые белки могут принадлежать животным, далеко отстоящим друг от друга на эволюционной лестнице. Последнее можно проиллюстрировать данными сравнительного изучения аминокислотной последовательности V-районов тяжелых цепей (V_H) иммуноглобулинов мыши и крокодила (рис. 10).

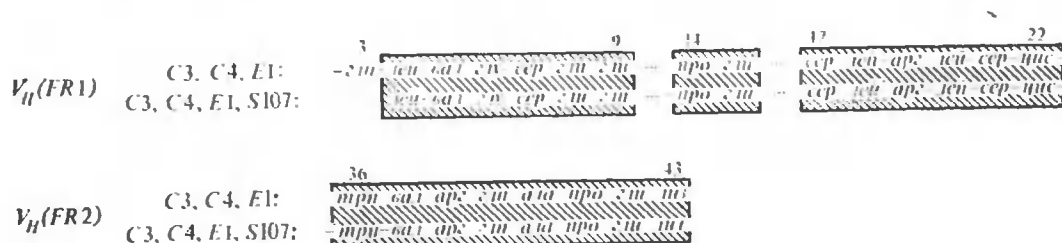


Рис. 10. Консервативные участки аминокислотных последовательностей V_H — районов иммуноглобулинов крокодила и мыши:

Первоначально устанавливали совпадающую последовательность в трех моноклональных иммуноглобулинах *Caiman crocodilus crocodilus* (C3, C4, E1), которую сопоставляли с последовательностью консервативных участков V-района моноклонального иммуноглобулина мыши S 107 (эталонный)

Строение консервативных участков переменных районов иммуноглобулинов было рассмотрено подробно для того, чтобы показать *высокую эволюционную устойчивость генетических элементов, кодирующих эти структуры*. Если предположить, что гены, кодирующие активные центры рецепторов нелимфоидных клеток, и переменные гены для полипептидных цепей иммуноглобулинов имеют единое эволюционное происхождение, то в таком случае и те и другие могут включать в себя элементы, кодирующие сходные по строению консервативные участки.

Ниже будут приведены данные сравнительного анализа первичных структур полипептидных цепей иммуноглобулинов и внеклеточных доменов некоторых рецепторных белков, подтверждающие существование в рецепторах нелимфоидных клеток участков аминокислотной последовательности, гомологичных FR-участкам полипептидных цепей иммуноглобулинов. В настоящем разделе рассмотрены данные иммунологического анализа, свидетельствующие в пользу сходства строения активных центров антител и клеточных рецепторов.

К консервативным участкам аминокислотной последовательности переменных доменов полипептидных цепей иммуноглобулинов могут быть получены антитела, так как эти участки формируют антигенные детерминанты. Эти детерминанты получили наименование *вариотипических* (или framework), а антитела к ним обозначают как *антивариотипические* (или anti-framework).

Установлено, что антивариотипические антитела реагируют с переменными районами антител самой разнообразной специфичности одного и того же видового происхождения. Кроме того, антитела против вариотипических детерминант иммуноглобулинов одного биологического вида реагируют с аналогичными детерминантами иммуноглобулинов другого биологического вида. Эти результаты полностью согласуются с результатами анализа первичных структур переменных районов, которые, как указывалось выше, свидетельствуют о сходстве строения *FR*-участков переменных районов у различных антител одного биологического вида и у аналогичных районов иммуноглобулинов различного видового происхождения.

Структура переменных районов полипептидных цепей иммуноглобулинов включает гиперпеременные участки. Именно эти участки определяют специфичность связывания антителами лигандов и именно с ними связаны находящиеся в активных центрах лиганды (гаптены, детерминантные группы антигенов). Что касается консервативных участков, то они образуют как бы «рамку» активного центра антитела, не участвуя в то же время в связывании лиганда.

К гиперпеременным участкам также можно получить антитела. Совокупность гиперпеременных участков, характерных для антитела определенной специфичности, обозначают как *идиотип*, а направленные к ним антитела называют *антиидиотипическими*. Существуют прямые экспериментальные доказательства в пользу того, что антиидиотипические антитела способны распознавать гиперпеременные участки переменных районов иммуноглобулинов (С. Köhler et al., 1985; А. Я. Кульберг, 1986).

Таким образом, два вида антител — антивариотипические и антиидиотипические — можно использовать для того, чтобы установить, существуют ли в активных центрах клеточных рецепторов структуры, подобные таковым в активных центрах антител. При этом антиидиотипические антитела служат для сравнения активных центров антител и рецепторов, распознающих одни и те же лиганды. Антивариотипические антитела применяют для обнаружения сходных с консервативными участками *V*-районов иммуноглобулинов отрезков цепей во внеклеточных доменах любого по специфичности рецептора.

Ряд выполненных к настоящему времени исследований свидетельствуют в пользу того, что антиидиотипические и антивариотипические антитела реагируют со структурами в активных центрах рецепторов, не имеющих иммуноглобулиновой природы. С использованием в качестве антигена антител против инсулина были получены антиидиотипические анти-антитела, способные реагировать не только с активным центром антител против инсулина, но и активным центром рецептора инсулина на клетках бурого жира (адипоциты). Инкубация адипоцитов с указанными антиидиотипическими антителами приводила к утрате клетками

способности связывать инсулин посредством рецепторов указанного гормона.

Блокирование активного центра рецептора в этих условиях может означать, что в нем присутствуют структуры, подобные идиотипспецифическим детерминантам антител против инсулина. А так как идиотип антитела определяется прежде всего гипервариабельными участками V-районов его полипептидных цепей, то, следовательно, иммунологическими методами можно показать существование в активном центре клеточного рецептора и антитела к одному и тому же лиганду сходных по строению участков, определяющих специфичность сравниваемых белков (K. Sege, P. Peterson, 1981).

Эксперименты, аналогичные описанным выше, были выполнены с использованием антител против аналогов (агонисты) β -адренергических лигандов, в частности алпренолола. Антитела против алпренолола служили антигеном для получения антиидиотипических антител. Эти анти-антитела обладали свойством связываться с β_2 -адренергическими рецепторами клеток (эритроциты индюка) и препятствовать взаимодействию с указанными рецепторами алпренолола. Кроме того, анти-антитела указанной выше специфичности имитировали действие алпренолола, усиливая активацию аденилатциклазы в клетках с помощью катехоламинов (A. Schreiber et al., 1979; Ch. Homcy et al., 1981).

Влияние антиидиотипических и антивариотипических антител на лигандсвязывающие свойства рецепторов испытывали также на рецепторах одного из компонентов системы комплемента — C1q. Рецепторы к этому белку продуцируют в том числе перитонеальные макрофаги, способные по этой причине связывать на холоду меченный радиоактивным иодом C1q Fab-фрагменты анти-антител к C1q, предварительно добавленные к макрофагам, в значительной степени подавляют связывание C1q этими клетками. Аналогичные фрагменты антител против вариотипических детерминант V-района тяжелой цепи полностью отменяли связывание указанными клетками C1q (А. Я. Кульберг и др., 1986).

<i>Fab-фрагменты антител</i>	<i>Количество связанного клетками меченого C1q, имп/мин</i>
Вариотипических (анти- V_L)	1068
Вариотипических (анти- V_H)	0
Антиидиотипических (анти-анти-C1q) . . .	498
Анти-C1q	1056
Контроль (препараты не добавляли) . . .	1085

Приведенные данные и ряд других результатов свидетельствуют о том, что *клеточные рецепторы различных лигандов способны взаимодействовать с антителами против антител к соответствующему лиганду*, т. е. с антиидиотипическими антителами. Специфичность взаимодействия подтверждается как фактом конкуренции антиидиотипического антитела и лиганда за рецептор,

так и способностью антиидиотипического антитела имитировать действие лиганда. Кроме того, по крайней мере для одного из видов рецепторов (рецепторы Clq-компоненту комплемента) показано существование в его активном центре вариабельных детерминант, характерных для V_H -домена (см. разд. 3.3). Изученные рецепторы принадлежали клеткам, не продуцирующим иммуноглобулины. И тем не менее методами антигенного анализа в их активных центрах были найдены структуры, сходные с таковыми в вариабельных районах иммуноглобулинов вообще и конкретно — вариабельных районах антител к тому же лиганду.

3.3. R-белки

Сходство строения активных центров клеточных рецепторов, распознающих гормоны, медиаторы, другие белки (типа Clq), и антител, распознающих в качестве антигенов те же вещества, представляется, на первый взгляд, удивительным в свете традиционных взглядов на проблему иммунологического распознавания. Общепринято мнение, что вариабельные гены, кодирующие активные центры антител и иммуноглобулиновых (по своей природе) рецепторов лимфоцитов, экспрессируются только в В-лимфоцитах и их более дифференцированных потомках — плазматических клетках. При этом из большого набора вариабельных генов определенный В-лимфоцит в ходе своей дифференцировки из клеток-предшественниц «выбирает» только один (редко два) вариабельный ген для тяжелой и один — для легкой цепей. В результате, В-лимфоциты экспрессируют, как правило, иммуноглобулиновые рецепторы только для одного лиганда, а плазматические клетки всегда продуцируют только одно, строго определенное по специфичности антитело.

Однако, как известно (см. гл. 4), иммуноглобулины и иммуноглобулиновые рецепторы лимфоцитов кодируют два вида генов: вариабельные (V) и константные (C). Только при их совместной экспрессии синтезируются полипептидные цепи иммуноглобулинов. А что если V-гены для иммуноглобулинов или родственные им гены экспрессируются в самых разнообразных клетках сами по себе или совместно с иными генами, нежели C-гены для иммуноглобулинов? Такие белки, в том числе рецепторные, будут сходны с иммуноглобулинами лишь по своим активным центрам, отличаясь строением других участков молекулы и, как следствие этого, биологической функцией. Такое предположение было выдвинуто автором еще в 1975 г. Согласно этой гипотезе вариабельные гены, экспрессируемые в нелимфоидных клетках, кодируют белки, которые принадлежат к категории рецепторных; лигандами для них служат гормоны, витамины, другие индукторы и регуляторы клеточного метаболизма. Постулировано также, что экспрессия вариабельных генов в составе рецепторных белков является филогенетически наиболее

древним способом реализации информации, кодируемой V-генами¹.

Приведенные в разд. 3.2 данные о сходстве антигенного строения активных центров ряда изученных к настоящему времени рецепторов, с одной стороны, и антител к тем же лигандам — с другой, согласуются с изложенной выше гипотезой. Однако оставался вопрос, на который еще не было получено ответа. Как известно, гормоны белковой природы (например, инсулин) и еще более сложные по строению белки, каким является C1q-компонент комплемента, имеют различные по строению антигенные детерминанты. При изучении рецепторов нелимфоидных клеток, распознающих такие сложные по строению лиганды, как перечисленные белки, невозможно достаточно простыми средствами строго доказать, действительно ли одни и те же структуры в молекуле лиганда распознаются клеточным рецептором и антителами к тому же лиганду, так как к каждой антигенной детерминанте этого лиганда образуется особое по специфичности антитело. При сравнении строения активных центров рецептора сложного по строению лиганда, с одной стороны, и антитела к одной из детерминант этого лиганда — с другой, недостаточно установить факт конкуренции за лиганд рецепторного белка и антиидиотипического антитела. Следует считаться с тем, что рецептор через свой активный центр может распознать значительно больший по величине участок молекулы лиганда, нежели активный центр сравниваемого антитела. Антиидиотипическое антитело и в этом случае может создать стерическое препятствие для связывания рецептором лиганда. Вот почему для более строгого доказательства обсуждаемой гипотезы необходимо обнаружить на нелимфоидных клетках рецепторы, способные распознавать простые по строению гаптены, и изучить строение активных центров таких рецепторов, сопоставив его со строением активных центров антитела к тому же простому гаптenu.

В последнее время такие работы были проведены с использованием в качестве клеток-мишеней покоящихся перитонеальных макрофагов и одного из клонов (P388 D₁) трансформированных макрофагоподобных клеток мыши (А. Я. Кульберг и др., 1985), а также клонированных костно-мозговых фибробластов кролика (Л. М. Бартова и др., 1987). Осуществляли поиск и последующее изучение рецепторов указанных клеток, распознающих такие простые гаптены, как *p*-азофениларсанилаттирозин (АРС) и ϵ -динитрофениллизин (ДНФ).

Клетки культивировали *in vitro* в среде, содержащей меченные по углероду глицин или лизин. Как правило, использовали клетки, полученные через 72 ч от начала культивирования с радиоизотопом. В большинстве экспериментов изучали внеклеточные участки (домены) рецепторных белков, для изоляции кото-

¹ См.: Кульберг А. Я. Иммуноглобулины как биологические регуляторы. М., 1975. С. 50—53.

рых с помощью протеолиза кратковременно инкубировали клетки при 37°C с трипсином. Протеолиз прекращали добавлением соевого ингибитора трипсина. Другой способ солюбилизации рецепторов (включая рецепторы к простым гаптенам) состоял в обработке клеток неионным детергентом нонидетом Р-40. С целью

обнаружения в составе «снятых» с поверхности клеток (с помощью трипсина) фрагментов белков, реагирующих с упомянутыми гаптенами, использовали метод аффинной хроматографии, для чего АРС, ДНФ или взятый для сравнения гомологичный (неиммунный) IgG кролика иммобилизовали на бромциансефарозе. Аналогично вели поиск специфичных к упомянутым соединениям клеточных белков в материале, солюбилизованном неионным детергентом.

Выполненные эксперименты показали, что макрофаги, клетки линии Р388D₁ и фибробласты из костного мозга синтезируют мембраносвязанные белки, взаимодействующие с иммобилизованными АРС, ДНФ и IgG. Связывание носило специфический характер, что можно проиллюстрировать данными, полученными в опытах с фибробластами (рис. 11).

Порцию материала, «снятого» с фибробластов с помощью трипсина, пропускали через колонку, содержащую иммобилизованный АРС. Другую порцию того же материала пропускали последовательно через колонки с иммобилизованным IgG, а затем иммобилизованным АРС. Полноту сорбции на каждом сорбенте контролировали. Оказалось, что при пропускании только через им-

мобилизованный АРС и при последовательном пропускании через иммобилизованные IgG и АРС количество радиоактивности, связавшееся с АРС, было одинаковым. Следовательно, IgG не связывает материал, фиксирующийся на АРС.

Аналогичные эксперименты были выполнены с материалом, «снятым» с помощью трипсина с макрофагов и клеток линии Р388D₁. В этих случаях последовательно пропускали материал через АРС и ДНФ или только через один из сорбентов. Количе-

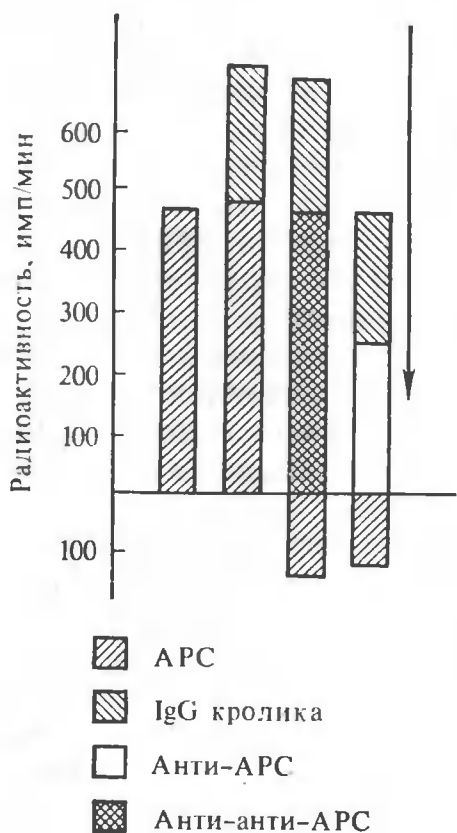


Рис. 11. Гаптенсвязывающие структуры, экспрессируемые фибробластами из костного мозга кролика:

стрелкой показана последовательность пропускания пробы через различные иммуносорбенты; ниже оси абсцисс — остаточная радиоактивность, связывающаяся с иммобилизованным АРС, после пропускания проб через соответствующие иммуносорбенты, остальные пояснения см. в тексте

ство радиоактивности, связавшееся при пропускании через один или последовательно два различных сорбента, было сходным.

В других опытах о присутствии на поверхности макрофагов рецепторов для простых гаптенов судили по специфичности связывания этими клетками изоэлогичного белка (IgG), боковые аминокислотные остатки которого (лизин) были модифицированы с помощью динитрофторбензола. Такой антиген с ДНФ-груп-

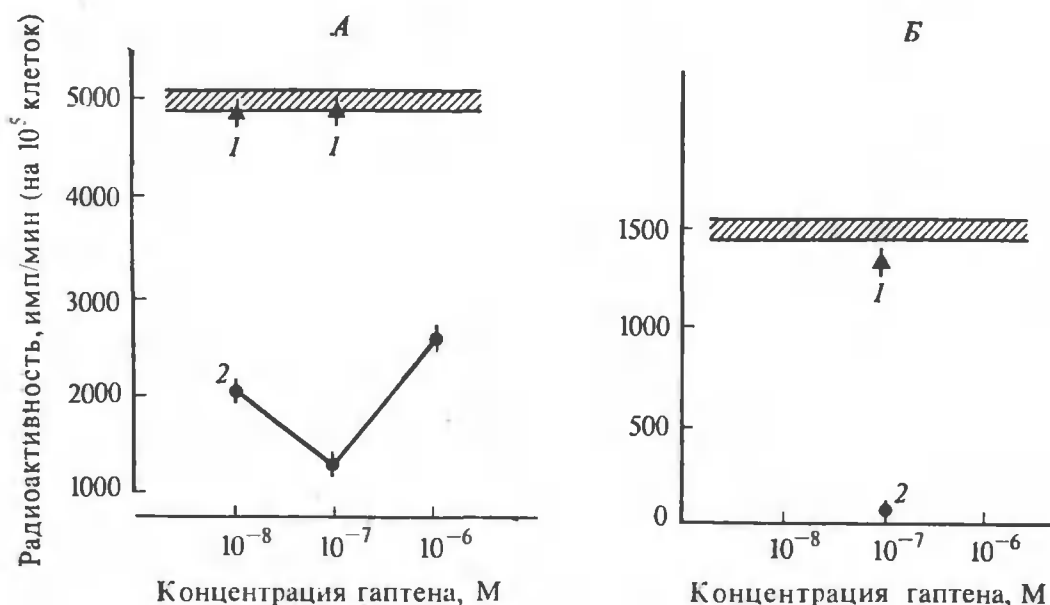


Рис. 12. Влияние простых гаптенa на связывание (А) и поглощение (Б) макрофагами динитрофенилированного изоэлогичного IgG (антиген):

1 — в присутствии APC, 2 — в присутствии ДНФ; заштриховано связывание (поглощение) антигена клетками в отсутствие гаптенa

пами связывался на холоду макрофагами и поглощался ими при 37°C (для оценки этих процессов входящий в антиген IgG метили с помощью ^{125}I). В присутствии гомологичного гаптена (ДНФ) связывание указанного антигена клетками резко подавлено, а фагоцитоз вообще не происходит. Гетерологичный гаптен (APC) никакого влияния на связывание и поглощение ДНФ—IgG не оказывает (рис. 12).

Приведенные выше данные указывают на то, что нелимфоидные клетки различного происхождения синтезируют мембранные белки, специфически взаимодействующие с простыми гаптенами. К этим гаптенам без труда могут быть получены антитела, способные специфически их распознавать. С целью обозначения внеклеточных участков рецепторов нелимфоидных клеток, солибилизируемых с помощью трипсина (рис. 13), был предложен термин *R-белки* (А. Я. Кульберг, 1985) (от англ. regulator).

R-белки содержат структуры, сходные с таковыми в вариабельных доменах иммуноглобулинов вообще и вариабельных доменах антител к тем же лигандам. Вне зависимости от своей специфичности *R-белки* фиксируются на иммобилизованных ан-

тителах против вариотипических детерминант переменных районов тяжелой и легкой цепей иммуноглобулинов. Этот факт, установленный для *R*-белков, взаимодействующих с АРС и ДНФ, а также для ряда других по специфичности *R*-белков, свидетельствует в пользу существования во внеклеточных доменах рецеп-

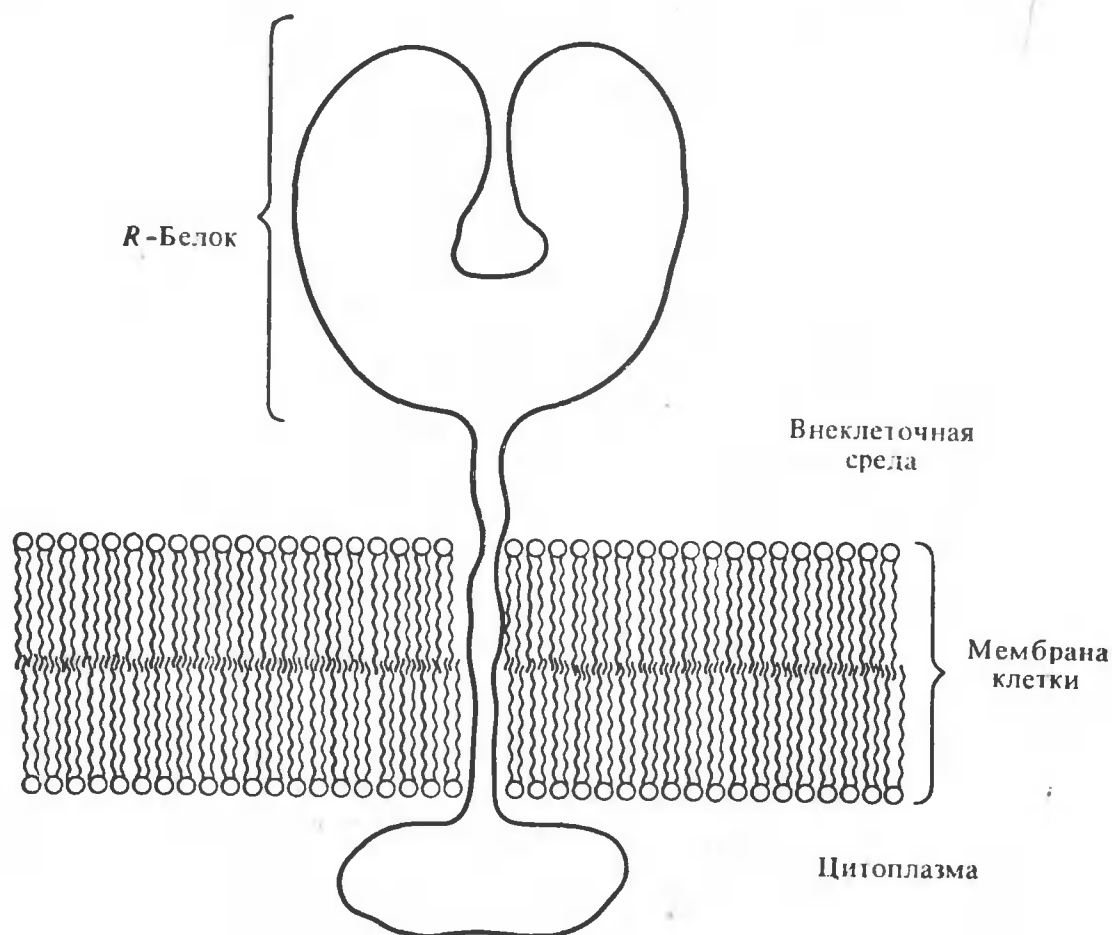


Рис. 13. *R*-белки — изолированные внеклеточные участки клеточных рецепторов

торов (вне зависимости от их специфичности) структур, сходных с консервативными участками аминокислотной последовательности переменных районов полипептидных цепей иммуноглобулинов.

Другие эксперименты указывают на существование в *R*-белках, распознающих гаптены, антигенных детерминант, которые взаимодействуют с антителами против антигенов к соответствующим гаптенам, т. е. с антиидиотипическими антителами. Эти данные хорошо согласуются с результатами изучения рецепторов к таким белковым лигандам, как инсулин и С1q. В своей совокупности они могут означать, что антитела и рецепторы нелимфоидных клеток, распознающие идентичные структуры в лигандах, сходны по идиотипу, т. е. по строению гипервариабельных участков переменных районов их полипептидных цепей. Кроме

того, как рассматривалось выше, в активных центрах рецепторов имеются структуры, подобные консервативным (framework) участкам переменных доменов иммуноглобулинов. Все это свидетельствует в пользу существования в *R*-белках всех элементов структуры переменных доменов полипептидных цепей иммуноглобулинов. Этот вывод, основанный на данных сравнительного антигенного анализа переменных районов иммуноглобулинов и *R*-белков, подтверждается результатами, полученными при сравнительном анализе первичных структур полипептидных цепей иммуноглобулинов и клеточных рецепторов (см. разд. 3.4).

3.4. Первичная структура лигандсвязывающих участков

Установление первичной структуры клеточных рецепторов, за исключением иммуноглобулиновых рецепторов В-лимфоцитов, начато лишь недавно. Практически все сведения получены на основании данных о нуклеотидной последовательности генов для полипептидных цепей соответствующих рецепторных белков. Следовательно, первичная структура рецепторных белков в большинстве случаев лишь предсказана. Такой подход к изучению клеточных рецепторов исключает необходимость проведения трудоемких процедур, связанных с их получением в достаточных для препаративного изучения количествах и в максимально очищенном виде (см. гл. 1). Поэтому использование методов генетической инженерии для накопления рекомбинантной кДНК создает благоприятные возможности как для изучения генов клеточных рецепторов, так и для построения соответствующей им аминокислотной последовательности полипептидных цепей рецепторных белков.

Поскольку лигандсвязывающие участки рецепторов расположены во внеклеточных доменах этих белков, в настоящем разделе мы рассмотрим строение именно этих районов. В табл. 2 представлены данные о размерах внеклеточных частей различных рецепторных белков в сравнении с размерами всего белка. Обращает на себя внимание большая степень сходства размеров внеклеточных районов различных по специфичности рецепторов при большом разнообразии их по размеру внутриклеточных районов (см. табл. 1). Если сходство рецепторов по протяженности их внутримембранных участков не удивительно (оно определяется толщиной клеточной мембраны), то сходство размеров внеклеточных районов уже само по себе наводит на мысль о существовании единого принципа структурной организации этих районов полипептидных цепей рецепторных белков.

В предыдущих разделах этой главы было показано, что антигена и иммуноглобулиновые рецепторы В-лимфоцитов можно использовать в качестве эталона для сравнительного изучения лигандсвязывающих центров рецепторов, экспрессируемых нелимфоидными клетками. Эффективность такого подхода демон-

стрируют данные сравнительного антигенного анализа активных центров антител и различных по специфичности клеточных рецепторов. Здесь приводятся результаты сравнительного изучения первичных структур переменных районов полипептидных цепей иммуноглобулинов и внеклеточных районов рецепторов неиммуноглобулиновой природы, экспрессируемых различными типами клеток.

Таблица 2. Размер внеклеточных участков рецепторов

Рецептор	Число аминокислотных остатков	Молекулярная масса ¹
Эпидермального фактора роста	621	55 000
Инсулина (α -субъединица)	735	65 000
Липопroteина низкой плотности	767	65 000
Трансферина	632	55 000
Трансэпителиального транспорта	629	55 000
IgA и IgM (поли-IgR)		
Сывороточные R-белки	—	55 000 ¹

¹ Рассчитана на основании данных о первичной структуре рецепторов. Молекулярная масса R-белков установлена методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия.

Антигенсвязывающие рецепторы Т-лимфоцитов. Как известно, лимфоциты, происходящие из тимуса (Т-лимфоциты), не продуцируют антител, но экспрессируют рецепторы, специфически распознающие антигены. К настоящему времени предсказана аминокислотная последовательность полипептидных цепей антигенсвязывающих рецепторов, экспрессируемых двумя категориями Т-лимфоцитов: Т-хелперами и цитотоксическими Т-лимфоцитами (S. Hedrick et al., 1984; H. Saito et al., 1984, J. Yanagi et al., 1984). Ниже приведены результаты сравнительного анализа внеклеточных районов рецепторов Т-клеток и иммуноглобулинов.

Рецепторы Т-лимфоцитов состоят из двух полипептидных цепей, формирующих, судя по регулярному расположению в их цепях остатков цистеина, несколько идентичных по размеру доменов, стабилизированных дисульфидными связями (рис. 14). Сопоставление аминокислотных последовательностей рецепторов ряда клонов Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов показало, что аминоконцевые домены их полипептидных цепей принадлежат к числу переменных, так как имеют характерные для каждого клона клеток особенности первичной структуры. Остальные домены по тому же признаку могут быть отнесены к числу константных. Таким образом, по этим характеристикам полипептидные цепи, образующие антигенсвязывающие рецепторы Т-клеток, с одной стороны, и полипептидные цепи иммуноглобулинов — с другой, имеют принципиальное сходство.

Степень гомологии аминокислотных последовательностей переменных районов полипептидных цепей рецепторов Т-лимфоцитов (а именно им приписывают лигандсвязывающие функции) и полипептидных цепей иммуноглобулинов (их V-домены) особенно выразительна по консервативным участкам аминокислотной последовательности. Так как строение консервативных участков переменных районов иммуноглобулинов не зависит от их лигандсвязывающей специфичности (см. разд. 3.2), сравнение переменных районов пептидных цепей иммуноглобулинов и переменных доменов рецепторов Т-клеток именно по этим участкам будет носить корректный характер даже в том случае, когда их специфичность не совпадает. Именно с такой ситуацией сталкиваются исследователи, изучающие Т-хелперы и цитотоксические Т-лимфоциты: их антигенсвязывающие рецепторы распознают в антигене, как правило, иные структуры, нежели антигена.

Анализ показал, что по консервативным участкам переменные домены полипептидных цепей рецепторов Т-клеток и иммуноглобулинов имеют высокую степень гомологии. Она особенно велика по четвертому консервативному участку (FR4) (рис. 15). Сходство строения переменных районов сравниваемых белков служит веским основанием общности происхождения генов, кодирующих антигенсвязывающие рецепторы Т-лимфоцитов и иммуноглобулины (иммуноглобулиновые рецепторы В-лимфоцитов). Эти вопросы рассматриваются в гл. 4.

Рецептор эпидермального фактора роста. Белок состоит из одной полипептидной цепи, первичная структура которой описана А. Ulrich и сотрудниками (1984). Сравнительный анализ аминокислотной последовательности внеклеточных доменов этого рецептора и аминокислотных последовательностей полипептидных цепей иммуноглобулинов осуществлен А. Я. Кульбергом (1987).

Внеклеточный район рецептора фактора роста может быть разделен на основании особенностей первичной структуры на

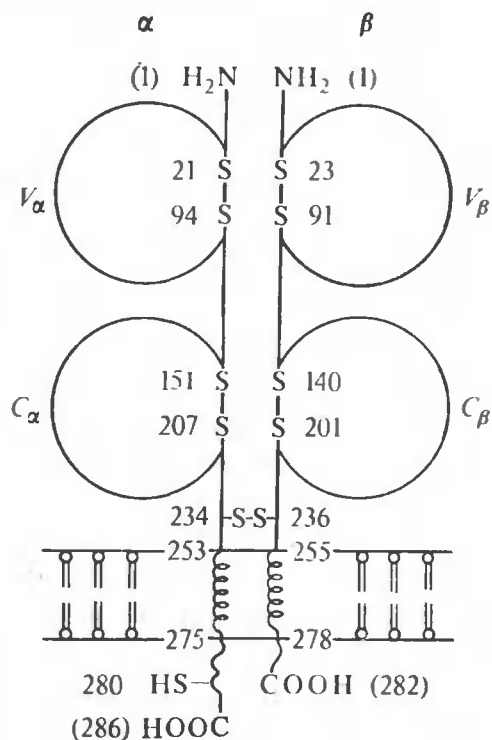


Рис. 14. Антигенсвязывающие рецепторы Т-лимфоцитов:

α и β — соответствующие полипептидные цепи (субъединицы) рецептора, Vα, Vβ и Cα, Cβ — соответственно переменные и константные домены; цифрами отмечено положение некоторых аминокислотных остатков

две пары участков. В двух из них (между остатками 163 и 313 и 475—612) содержится большое число остатков цистеина и пролина. В первом из этих участков — 24 остатка цистеина и 10 остатков пролина, во втором — 20 и 10 остатков соответственно. Сочетание высокой плотности остатков цистеина и пролина характерно для шарнирной области молекулы IgG. Сравнение первичной структуры этого участка IgG с аналогичными участками рецептора фактора роста свидетельствует об определенной сте-

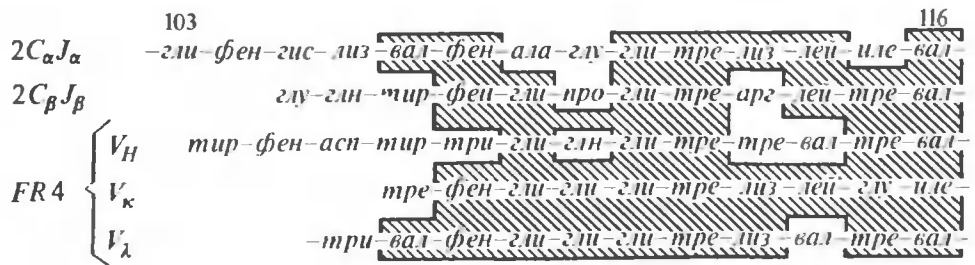


Рис. 15. Гомологичные участки аминокислотной последовательности переменных районов легкой и тяжелой цепей иммуноглобулинов (мышь) и антигенсвязывающих рецепторов цитотоксических Т-лимфоцитов

пени их гомологии (см. гл. 1, рис. 5). Если условно обозначить богатые цистеином и пролином участки рецептора гормона роста так же, как шарнирные, то положение первого участка таково, что он как бы разделяет всю внеклеточную часть рецептора на два района, сходных по своей протяженности.

В пределах каждого района имеется по два остатка цистеина; в первом районе эти остатки находятся в позициях 34 и 134 и разделены 100 остатками, во втором — остатки цистеина расположены в позициях 338 и 446 и разделены 108 остатками. Такое регулярное расположение остатков цистеина дает основание предположить, что они принадлежат к числу остатков полуцистеинов, формирующих попарно две внутрицепочечные дисульфидные связи соответственно в первом и втором из рассматриваемых районов. В таком случае пространственная структура внеклеточной части рецептора гормона роста может быть представлена в виде двух доменов, разделенных шарнирным участком (рис. 16). Второй шарнирный участок отделяет оба домена от внутримембранного участка рецептора. Можно допустить, что расположенный между доменами первый шарнирный участок позволяет им сблизиться и сформировать компактную глобулярную структуру наподобие переменных доменов легкой и тяжелой цепей иммуноглобулинов и переменных доменов таких двухцепочечных рецепторов, как антигенсвязывающий рецептор Т-лимфоцитов (см. рис. 14).

В пределах домена, первого с N-конца рецептора гормона роста, обнаружены аминокислотные последовательности, характеризующиеся значительной степенью гомологии с консерватив-

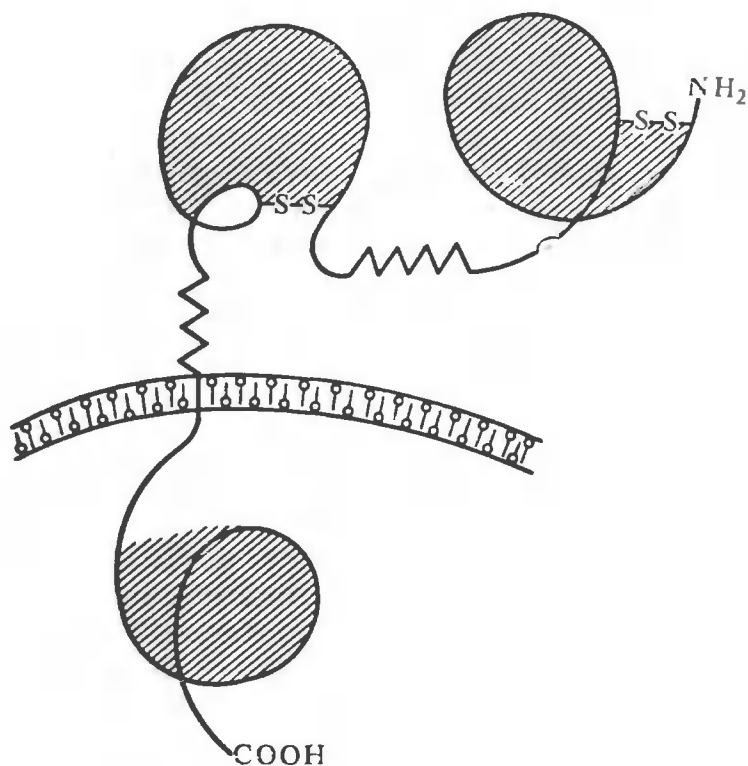
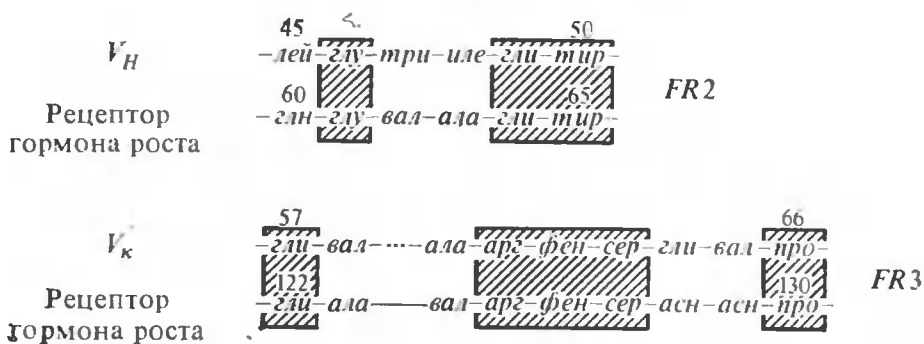


Рис. 16. Структура рецептора эпидермального фактора роста, предсказанная по данным его первичной структуры

ными участками переменных районов легкой и тяжелой цепей иммуноглобулинов. В указанном домене существуют участки, сходные по аминокислотной последовательности с *FR 2* и *FR 3* переменных доменов иммуноглобулинов.



Наблюдается также гомология первичной структуры между первым и вторым внеклеточными доменами рецептора гормона роста, причем по участкам, сходным с *FR 3* переменных доменов иммуноглобулинов.

Выполненный анализ свидетельствует о перспективности дальнейшего углубленного сравнительного изучения строения лиганд-связывающего участка рецептора гормона роста и переменных доменов иммуноглобулинов.

Рецептор трансэпителиального транспорта Ig A и Ig M (поли-Ig R). Те же принципы анализа были использованы (А. Я. Кульберг, 1986) для сравнительного изучения первичной структуры переменных районов полипептидных цепей иммуноглобулинов и указанного выше рецепторного белка — поли-Ig R. При описании структуры этого рецептора (К. Е. Mostov et al., 1984) было сделано заключение о существовании в его внеклеточной части нескольких доменов. Этот вывод обосновывался регулярным расположением в пептидной цепи этого белка (его внеклеточной части) остатков цистеина, которые, как предположили авторы, участвуют в формировании внутридоменных дисульфидных связей.

В самом деле, в пределах первых с N-конца 420 остатков можно выделить четыре домена. Авторы выделили во внеклеточной части поли-Ig R еще два домена, которые, по их мнению, формируют участок цепи, непосредственно примыкающей к внутримембранной части рецептора. Выполненный анализ показал, однако, что район между остатками 460 и 600 следует, скорее, отнести к участку шарнирного типа (А. Я. Кульберг, 1986). Действительно, содержание остатков цистеина и пролина в этом районе значительно выше, чем в N-концевом участке. Так, если на первые 420 остатков приходится всего 9 остатков цистеина и 15 остатков пролина, то район цепи между остатками 440—600 (160 остатков) содержит 8 остатков цистеина и 16 остатков пролина. Существенно также, что в этом районе находятся регулярно повторяющиеся последовательности, содержащие в том числе остатки пролина. Ниже приведены позиции таких последовательностей в молекуле указанного рецептора.

Последовательность: —цис—тре—гли—про— —цис—иле—гли—цис—

Позиции аминокислотных остатков

Первый «шарнирный» участок	216—219	—
	305—308	—
Второй «шарнирный» участок	491—494	531—534
	604—607	553—556
	547—550	—

Этим анализируемый район напоминает шарнирный участок Ig G человека (принадлежащей к третьему подклассу этих белков — Ig G3), в котором неоднократно повторяется одна и та же последовательность аминокислотных остатков, включающих остатки цистеина и пролина (А. Nisonoff et al., 1975).

В аминоконцевых доменах поли-Ig R установлены участки, характеризующиеся выраженной гомологией с консервативными (FR 1 и FR 4) участками переменных доменов иммуноглобулинов. При сравнении поли-Ig R и переменных доменов иммуно-

глобулинов по участку, соответствующему *FR3*, удастся также с уверенностью установить гомологичные последовательности (рис. 17).

Результаты приведенного выше анализа согласуются с данными сравнительного изучения первичной структуры поли-Ig R и переменных доменов полипептидных цепей иммуноглобули-

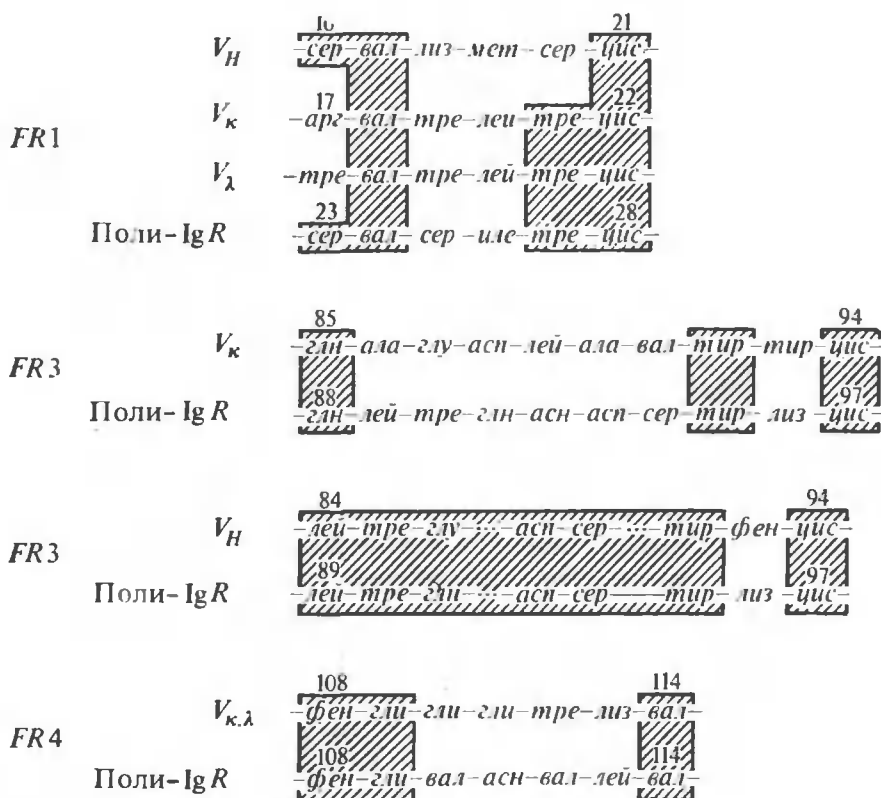


Рис. 17. Гомологичные участки аминокислотной последовательности переменных районов легкой и тяжелой цепей иммуноглобулинов (мышь) и рецептора трансэпителиального транспорта иммуноглобулинов (поли-IgR)

нов на всей их протяженности (К. Е. Mostov et al., 1984). Во внеклеточных доменах этого рецептора 28% остатков гомологичны остаткам переменных доменов легкой χ цепи моноклонального иммуноглобулина человека SCW, использованного в качестве эталонного. Наибольшая степень гомологии найдена для первого с N-конца домена поли-Ig R, где она составляет 36%. Именно в пределах этого домена находятся участки, гомологичные переменным доменам иммуноглобулинов по консервативным участкам аминокислотной последовательности (рис. 17).

В заключение этого раздела следует сказать об открывающихся возможностях сравнительного изучения аминокислотных последовательностей рецепторных белков между собой и с иммуноглобулинами. Уже в ходе предварительного анализа первичной структуры внеклеточных районов α -субъединицы инсулинового

рецептора и рецептора интерлейкина 2 удалось выявить участки, характеризующиеся гомологией с консервативными участками переменных доменов иммуноглобулинов (А. Я. Кульберг, 1987). Это позволяет с еще большей уверенностью считать существующим *единый принцип структурной организации лигандсвязывающих участков рецепторных белков*, который характерен и для организации переменных доменов полипептидных цепей иммуноглобулинов.

Молекулярно- генетические основы биосинтеза рецепторов

4

Принципиальную по своей значимости проблему биосинтеза рецепторов и регуляции этого процесса начали изучать лишь в последнее время. Одним из центральных объектов изучения оказались антигенсвязывающие рецепторы лимфоцитов и прежде всего иммуноглобулиновые рецепторы В-лимфоцитов. Этому в значительной степени способствовало углубленное изучение генетики иммуноглобулинов и биосинтеза этих белков. Затем на основе сведений о подобии некоторых структурных элементов иммуноглобулинов и антигенсвязывающих рецепторов Т-лимфоцитов (см. разд. 3.4) было начато исследование генов этих рецепторных белков, не имеющих иммуноглобулиновой природы. Таким образом, как при изучении строения клеточных рецепторов, так и при исследовании генов этих белков большая роль принадлежит сравнительному анализу, где в качестве эталона сравнения выступают иммуноглобулины. Принимая во внимание сказанное, представляется необходимым прежде всего кратко обобщить основные сведения относительно генетики иммуноглобулинов и биосинтезе этих белков.

4.1. Гены полипептидных цепей иммуноглобулинов и их экспрессия

Существование в иммуноглобулинах двух видов полипептидных цепей: *легких* и *тяжелых* — определяет участие в их биосинтезе двух основных групп структурных генов. Гены легких цепей подразделяются, в свою очередь, на две группы, одна из которых кодирует биосинтез легких цепей κ -типа, а другая — аналогичных цепей λ -типа.

Находящиеся в полипептидных цепях иммуноглобулинов (как в легких, так и в тяжелых) переменные и константные участки определяют принципиальное сходство в организации генов обоих типов цепей, которые образуют молекулу этого белка. Каждую полипептидную цепь кодируют две группы генов — *переменные* (для легких и тяжелых цепей соответственно) и *константные* гены (*V*- и *C*-гены соответственно).

Структура *вариабельных районов легких цепей* закодирована в большом числе сегментов ДНК (V_L -гены) и нескольких коротких сегментах ДНК, получивших наименование J_L -генов или J -сегментов (от англ. joining — соединяющие). Гены для легких цепей κ - и λ -типа находятся в различных хромосомах, поэтому существуют два набора вариабельных — соответственно V_κ - и V_λ -генов и два набора J -генов (J_κ и J_λ).

Вариабельные районы тяжелых цепей кодируют большая группы V_H -генов и две группы коротких сегментов ДНК, обозначаемых соответственно как D_H (от англ. diversity — разнообразие) и J_H -гены.

Константный район легкой κ -цепи кодирует C_κ -ген, расположенный в той же хромосоме, что и V_κ - и J_κ -гены. Для константных районов легкой λ -цепи известны четыре C_λ -гена (мышь). Для каждого C_λ -гена существует свой набор J_λ -сегментов. Набор V_λ -генов единственный и находится в той же хромосоме, что и C_λ -гены.

Константные районы тяжелых цепей иммуноглобулинов кодируют C_H -гены. Их число соответствует числу классов и подклассов иммуноглобулинов. Как известно, число классов иммуноглобулинов равно пяти: IgG, IgM, IgA, IgE, IgD. Соответствующие им тяжелые полипептидные цепи обозначают как γ , μ , α , ϵ , δ , а гены, кодирующие константные районы этих цепей, — как C_γ , C_μ , C_α , C_ϵ , C_δ . Все гены для тяжелых цепей располагаются в одной хромосоме.

В недифференцированных (зародышевые) клетках структурные гены для полипептидных цепей иммуноглобулинов содержат большое число интронов. Большие по протяженности интроны разделяют вариабельные гены и D -сегменты тяжелых цепей, а также D_H -, J_H - и C_H -сегменты. Существуют интроны между J_L -сегментами и генами константных районов легких цепей. Кроме того, интронированы собственно C_H -гены. В этом случае интроны разделяют между собой сегменты ДНК, кодирующие отдельные домены константного района соответствующей тяжелой цепи. Некоторые особенности интронирования генов константных районов тяжелых цепей будут рассмотрены ниже.

Число вариабельных генов, передаваемых по наследству, достаточно велико. Так, у мыши наследуется приблизительно 150—400 V_κ -генов. Все эти гены можно подразделить на ряд семейств, в пределах каждого из которых содержатся гены со сходной, но неидентичной нуклеотидной последовательностью. В процессе индивидуального развития данной особи число вариантов V -генов возрастает за счет точечных мутаций, происходящих в гипервариабельных районах наследуемых V -генов.

Аналогичный процесс происходит и в клетках гибридом¹, культивируемых *in vitro*.

¹ Гибридомы получают путем слияния трансформированных (опухолевых) плазматических клеток с нормальными лимфоидными клетками. В гибридомах происходит экспрессия генов нормальных клеток.

Существенно, что мутационные изменения, происходящие в онтогенезе, характерны не только для V -генов, но и для D_H -сегментов. Причем за счет соматических гипермутаций число качественно новых матриц для антител, очевидно, не увеличивается. Соматические мутации переменных генов (как об этом, в частности, свидетельствуют данные, полученные с использованием гибридной техники) способны таким образом изменить переменные гены, что кодируемые ими антитела изменяют лишь степень сродства к тому же лиганду (G. Köhler, 1985).

В процессе дифференцировки предшественников лимфоцитов осуществляется дифференцировка и генетического материала, приводящая, в том числе, к слиянию одного из переменных генов для легкой цепи (κ или λ) с одним из J_L -сегментов (J_κ или J_λ). Одновременно происходит «вырезание» части интронизирующей последовательности, разделяющей соответствующий J -сегмент и C_L -ген. Наблюдается также процесс слияния одного из V_H -генов с одним из D_H - и одним J_H -сегментом; одновременно за счет «вырезания» части интрона образующийся VDJ -ген сближается с C_H -генами.

Описанные перегруппировки генов уникальны для каждой клетки-предшественницы. В силу этого и ее потомкам присущ уникальный характер нуклеотидной последовательности генов для переменных районов легкой и тяжелой цепей. Уникальность этой последовательности определяется не только составляющими ее генетическими элементами (V_L - и J_L -, V_H -, D_H - и J_H -сегментами), но и тем обстоятельством, что стыковка сегментов осуществляется не вполне строго по одним и тем же точкам. В силу этого протяженность переменных районов оказывается неодинаковой, а вместе с этим неодинаковой окажется и структура переменных доменов антител. Таким образом, многообразие транскрибируемых матриц для переменных районов полипептидных цепей иммуноглобулинов больше числа передаваемых по наследству переменных генов как за счет соматических гипермутаций в этих генах, так и за счет флуктуации мест стыковки отдельных сегментов ДНК, кодирующих переменные районы.

Слияние экзонов, кодирующих переменные домены легкой и тяжелой цепей, служит необходимым этапом подготовки и экспрессии иммуноглобулиновых генов. Однако, как уже отмечалось, в «собранном» виде ген переменного района цепи еще отделен интроном от генов, кодирующих константные районы тяжелых и легких полипептидных цепей. Не обсуждая здесь проблемы реаранжировки генетического материала при формировании транскрипционной единицы для тяжелых цепей, необходимо лишь отметить, что транскрибируемые матрицы как для легкой, так и для тяжелой цепей включают нетранслируемые последовательности. Последние в виде «РНКовых копий» входят в состав первичного транскрипта и последовательно «вырезаются» в процессе сплайсинга пре-мРНК. Только в составе «зрелой»

цитоплазматической мРНК полностью отсутствуют нетранслируемые последовательности. Процесс созревания мРНК полипептидных цепей иммуноглобулинов (процессинг пре-мРНК) схематически изображен на рис. 18.

Зрелые В-лимфоциты не секретируют иммуноглобулины, но содержат иммуноглобулиновые рецепторы, которые могут при-

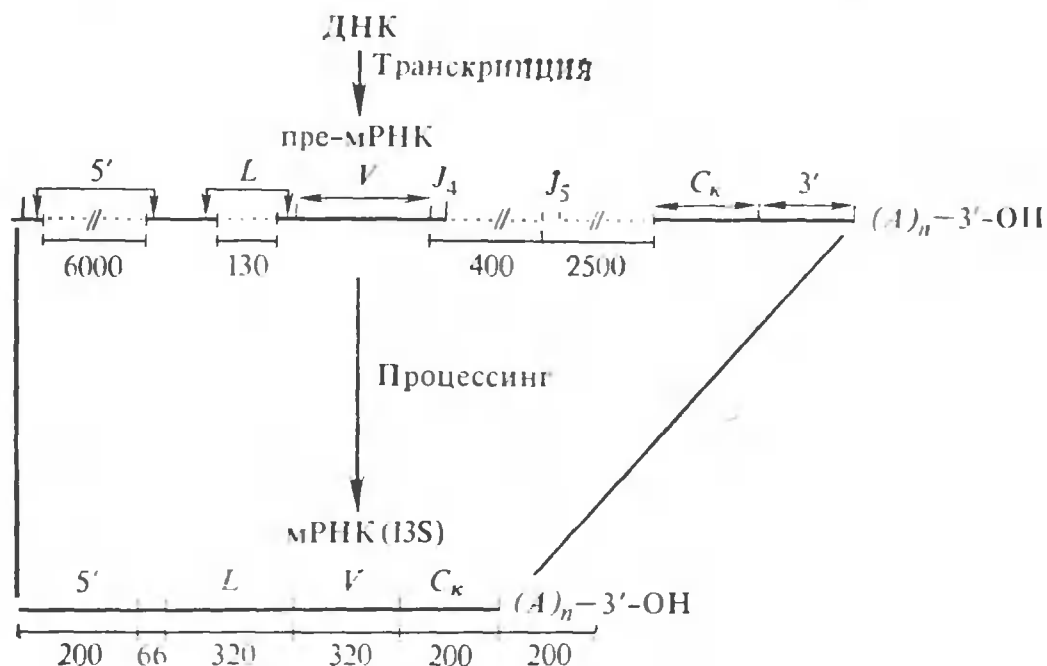


Рис. 18. Процессинг пре-мРНК для полипептидных цепей иммуноглобулинов:

L — лидерный полинуклеотид, $(A)_n$ — полиадениловый 3'-конец (нетранслируемый); цифрами обозначены размеры копий нитронов (пре-мРНК) и транслируемых копий сегментов ДНК (мРНК)

надлежать к любому классу (подклассу) иммуноглобулинов. Матричные РНК для рецепторного и секретируемого иммуноглобулинов различаются строением матриц для тяжелых цепей. Тяжелые цепи рецепторного иммуноглобулина вне зависимости от его класса имеют гидрофобный участок, который пронизывает оба слоя мембраны, и короткий цитоплазматический участок (рис. 19). Оба эти участка кодирует особый сегмент ДНК, расположенный в 3'-конце транскрипционной единицы для тяжелых цепей. Здесь же располагается короткий сегмент ДНК, кодирующий С-концевую аминокислотную последовательность тяжелых цепей секретируемой формы иммуноглобулина данного класса. «Выбор» между двумя вариантами биосинтеза тяжелых цепей (для секреторного или рецепторного иммуноглобулинов) осуществляется, видимо, в процессе сплайсинга пре-мРНК.

Каким образом контролируется этот процесс, неизвестно. Что же касается переключения с синтеза тяжелых цепей для рецепторного иммуноглобулина на синтез тех же цепей для секрети-

руемого иммуноглобулина, то он служит *одним из важнейших элементов дифференцировки лимфоидных клеток В-ряда*. Действительно, плазматические клетки, являющиеся прямыми потомками В-лимфоцитов, не экспрессируют иммуноглобулиновые рецепторы, однако в очень больших количествах продуцируют

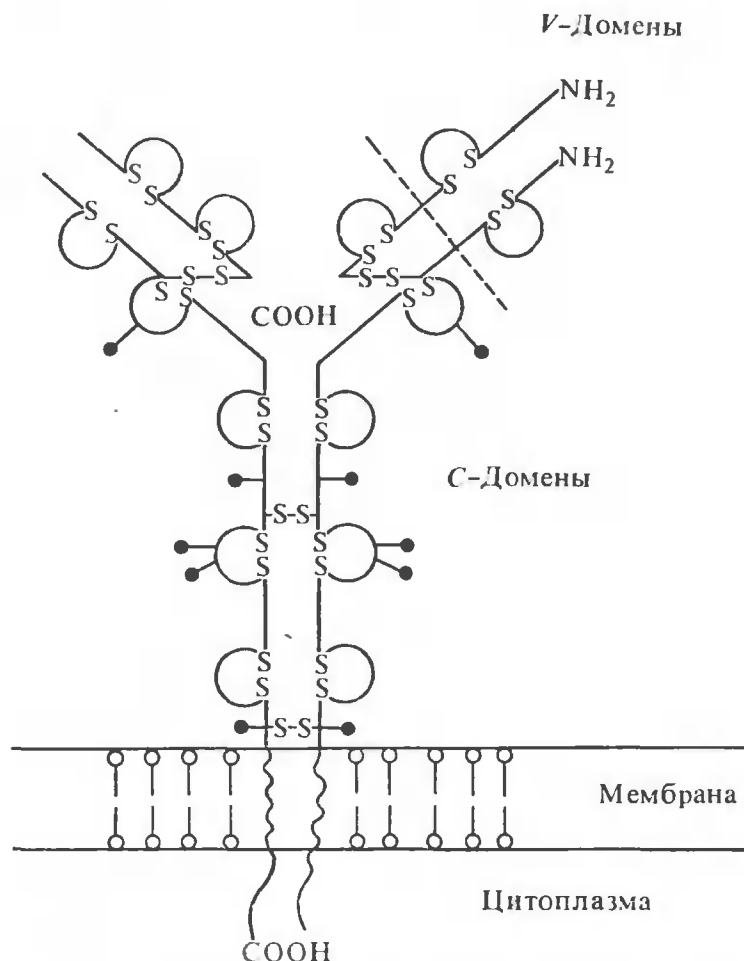


Рис. 19. Иммуноглобулиновые (IgM) рецепторы В-лимфоцитов

и секретируют иммуноглобулины. Следует отметить, что переходные формы между В-лимфоцитом и плазматической клеткой, так называемые *бластные формы лимфоцитов*, способны как секретировать иммуноглобулин определенного класса, так и экспрессировать иммуноглобулиновые рецепторы, принадлежащие (на основании типа их тяжелых цепей) к тому же классу иммуноглобулинов. Можно допустить, что в этих клетках на уровне первичного транскрипта для тяжелых цепей осуществляется процесс альтернативного сплайсинга. При этом в одной копии транскрипта вырезается последовательность, кодирующая С-концевую последовательность тяжелых цепей рецепторного иммуноглобулина, а в другой копии — последовательность для тяжелых цепей секретируемой формы иммуноглобулинов. В пользу именно такого механизма свидетельствует также и тот факт,

что рецепторные и секретируемые лимфобластами иммуноглобулины идентичны по своим лигандсвязывающим свойствам и, следовательно, не только легкие, но и тяжелые цепи идентичны по переменным районам. А так как ни переменные, ни константные гены иммуноглобулинов (речь идет об идентичных по строению генах) не амплифицированы и содержатся только в одной копии, то возникновение двух вариантов мРНК для тяжелых цепей возможно лишь путем альтернативного сплайсинга первичного транскрипта.

4.2. Биосинтез иммуноглобулиновых рецепторов и его регуляция

В предыдущем разделе было указано, что различия в строении секретируемой и рецепторной форм иммуноглобулинов определяются короткими С-концевыми участками их тяжелых полипептидных цепей. Чтобы представить размер участка тяжелой цепи, от которого зависит принадлежность иммуноглобулина к рецепторному типу, можно рассмотреть данные о строении μ -цепи иммуноглобулина класса М (IgM) — белка, выполняющего функции антигенсвязывающего рецептора В-лимфоцитов, не контактировавших ранее с антигеном (см. рис. 20). μ -цепь секретируемой формы IgM насчитывает 577 аминокислотных остатков. У рецепторного IgM вслед за четвертым доменом константного участка μ -цепи находится участок из 12 гидрофильных аминокислотных остатков, за которым расположен трансмембранный сегмент, построенный из 26 преимущественно гидрофобных аминокислот, и, наконец, С-концевой трипептид: —лиз —вал —лиз —COOH, погруженный в цитоплазму. Еще раз необходимо подчеркнуть, что трансмембранный и цитоплазматический участки тяжелых цепей рецепторных иммуноглобулинов различных классов очень сходны по своему строению.

Замечательно, что столь незначительные различия в строении секретируемых и рецепторных форм иммуноглобулинов существенно изменяют процесс их биосинтеза. В обоих случаях трансляция мРНК для легких и тяжелых цепей происходит независимо. В плазматических клетках (продуцируют только секретируемую форму иммуноглобулинов) полирибосомы для легких и тяжелых цепей фиксированы на поверхности шероховатого эндоплазматического ретикулума. В его цистерны поступают новообразованные полипептидные цепи, здесь осуществляется процессинг цепей, их гликозилирование и ассоциация с образованием полностью построенной молекулы иммуноглобулина. По мере гликозилирования новообразованные молекулы иммуноглобулина переходят из ретикулума в аппарат Гольджи. Выход иммуноглобулинов из клетки осуществляется без участия секреторных вакуолей, а за счет, как допускают, выдавливания их из цистерн через поры в местах присоединения вакуолей аппарата Гольджи к цитоплазматической мембране.

Для тяжелых цепей рецепторной формы иммуноглобулина существуют собственные полирибосомы, которые, например, можно обнаружить в лимфобластах наряду с полирибосомами тяжелых цепей для секретируемой формы иммуноглобулина. Они фиксированы не на поверхности шероховатого ретикулума, а на особых вакуолях. Каковы причины различий в топографии полирибосом для весьма близких по строению полипептидных цепей, остается неизвестным. Мало изучен вопрос и о механизме встраивания новообразованных молекул рецепторного иммуноглобулина в цитоплазматическую мембрану клетки.

Скорость биосинтеза рецепторных иммуноглобулинов неодинакова на различных этапах онтогенеза В-лимфоцитов. Она возрастает при появлении у этих клеток способности отвечать на специфический индуктор — *антиген*. Для В-лимфоцитов человека этот период совпадает с началом внеутробной жизни; у мыши — третья неделя внеутробной жизни.

Биосинтез иммуноглобулиновых рецепторов изменяется под влиянием веществ, являющихся *митогенными* для В-лимфоцитов (например, липополисахарид из грамотрицательных бактерий), а также антигенов и антииммуноглобулиновых антител (их бивалентных $F(ab')_2$ -фрагментов). Антигены, в молекулах которых содержится несколько идентичных по строению детерминантных групп, способны «сшивать» между собой иммуноглобулиновые рецепторы, которые специфически распознают соответствующие антигенные детерминанты. Бивалентные $F(ab')_2$ -фрагменты антииммуноглобулиновых антител способны «сшить» иммуноглобулиновые рецепторы вне зависимости от того, какой антиген они распознают на специфической основе. При этом на указанные фрагменты антииммуноглобулиновых антител реагируют практически все В-лимфоциты, поэтому данный процесс можно подробно изучить.

Оказалось, что обработанные антииммуноглобулиновыми реагентами В-лимфоциты достаточно быстро теряют свои иммуноглобулиновые рецепторы. Механизм утраты рецепторов обсуждается в гл. 5. Здесь будет рассмотрен процесс их *восстановления*. Если обработать антииммуноглобулином (анти- μ -антитела) В-лимфоциты взрослых мышей, затем заменить питательную среду и культивировать клетки при 37°C в отсутствие анти- μ -антител, через 48 ч на клеточной поверхности появятся новообразованные IgM-рецепторы. Их количество не будет отличаться от того, которое было до обработки клеток. Иная ситуация наблюдается в случае обработки анти- μ -антителами В-лимфоцитов, полученных от эмбриона мыши. Даже после кратковременной обработки этих клеток антииммуноглобулинами они утрачивают способность ресинтезировать своим IgM-рецепторы по меньшей мере в течение пяти суток (M. Raff, 1975; C. Sidman, E. Unanue, 1975).

Клетки эмбриона и взрослой особи отличаются, по крайней мере, в 10 раз по содержанию на своей поверхности иммуногло-

булиновых рецепторов (у взрослой мыши на поверхности В-лимфоцита содержится от 10^5 до $4 \cdot 10^5$ рецепторных иммуноглобулинов). По этой причине, вероятно, эффективность «сшивания» между собой рецепторов на клетке эмбриона и взрослой особи неодинакова. Анти- μ -антитела, действуя на клетки эмбриона, не способны по стерическим причинам вызвать агрегацию рецепторов (как это происходит в тех же условиях на поверхности В-лимфоцитов взрослых мышей). Поэтому на клетке эмбриона анти- μ -антитела как бы «замораживают» рецепторы на клеточной поверхности. Такой процесс, как предполагают, приводит за счет активации аденилатциклазной системы к продолжительному накоплению в клетке-мишени цАМФ. Как известно, следствием этого будет активация олигоаденилатсинтазы с последующим подавлением биосинтеза белка по механизму, описанному для действия интерферона на клетки-мишени. В свете изложенного можно заключить, что внеклеточные агенты посредством регуляции процессов биосинтеза и распада циклических мононуклеотидов способны влиять на скорость биосинтеза клеточных рецепторов.

4.3. Структурные гены антигенсвязывающих рецепторов Т-лимфоцитов

В гл. 3 показано, что изучение строения антигенсвязывающих рецепторов Т-лимфоцитов и кодирующих их генов начало осуществляться после получения методами генетической инженерии кДНК для рецепторов, экспрессируемых Т-хелперами и цитотоксическими Т-лимфоцитами (S. Hedrick et al, 1984; J. Yanagi et al., 1984; H. Saito et al., 1984).

Каждый рецепторный белок Т-лимфоцитов образован двумя полипептидными цепями, обозначаемыми как α - и β -субъединицы¹. Каждую из субъединиц кодирует определенная группа генов, включающая гены для переменных районов, константных районов, трансмембранного и внутриклеточного участков. Переменные районы каждой субъединицы кодируются тремя генными сегментами: V , D и J . Уже из приведенных обозначений видно, что по принципам кодирования переменных районов полипептидные цепи рецепторов Т-лимфоцитов и иммуноглобулиновые рецепторы В-лимфоцитов обладают значительным сходством.

Наиболее подробно изучены гены для β -субъединицы (рис. 20). Три генных сегмента, кодирующих переменный район, — V_β , D_β и J_β — разделены интронами в недифференцированных предшественниках Т-лимфоцитов. В процессе их дифференцировки происходит реаранжировка генетического материала

¹ В последнее время для некоторых категорий Т-лимфоцитов описана третья субъединица их антигенсвязывающих рецепторов — γ , функциональную роль которой интенсивно изучают (M. Collins, M. Owen, 1985).

ла, приводящая к слиянию одного из V_β -генов с одним из двух D_β -сегментов и одним из шести функциональных J_β -сегментов. Последние формируют два кластера генов ($J_{\beta 1}$ и $J_{\beta 2}$), которые располагаются каждый перед генами, кодирующими константные районы β -субъединиц: $C_{\beta 1}$ и $C_{\beta 2}$. Константный район β -субъединицы кодирует только один из двух C_β -генов. Из этого следует, что должны существовать два типа субъединиц, отличаю-

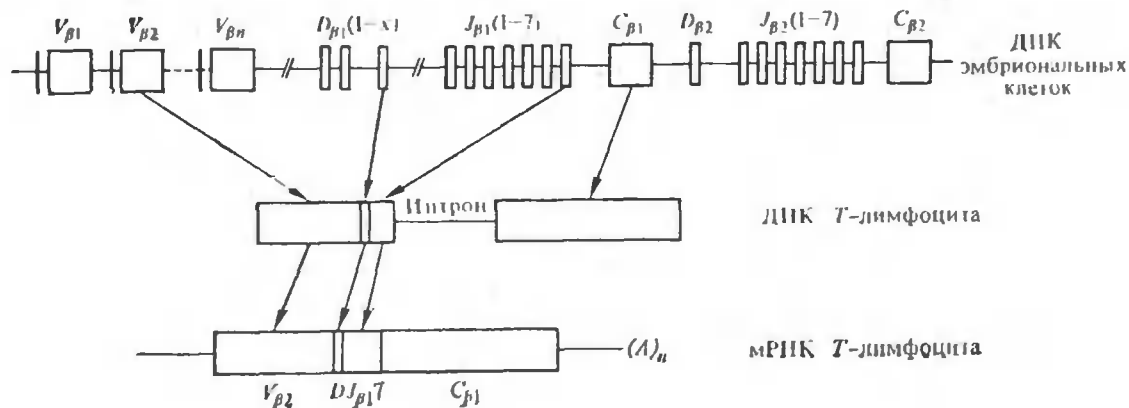


Рис. 20. Гены β -цепей (субъединицы) антигенсвязывающего рецептора T -лимфоцитов, их перегруппировка (указана стрелками) с формированием ДНК индивидуального T -лимфоцита, содержащего ген β -цепи (обозначения указаны в тексте)

щиеся друг от друга строением константных районов подобно тяжелым цепям иммуноглобулинов.

Еще два сегмента ДНК участвуют в кодировании β -субъединицы: один для трансмембранного участка из 21—22 аминокислотных остатков и второй для цитоплазматического C -концевого отрезка цепи из пяти аминокислотных остатков.

Характерными особенностями переменных генов β -субъединицы рецептора T -лимфоцитов является то, что число V_β -генов, передаваемых по наследству, значительно меньше числа наследуемых генов переменных районов полипептидных цепей иммуноглобулинов. Согласно убедительным данным, полученным группой L. Hood (1985), число наследуемых мышью V_β -генов составляет не более 21. К этому следует добавить, что в ходе индивидуального развития в генах переменного района β -субъединицы соматические мутации, очевидно, не возникают. В силу этого индивидуальные вариации строения переменных районов β -субъединиц могут возникать лишь в результате флуктуации мест слияния всех трех сегментов ДНК (V_β , D_β и J_β), кодирующих этот район.

Принимая во внимание принципиальное сходство структуры кДНК для α - и β -субъединиц рецептора T -лимфоцитов, можно утверждать, что реаранжировка генов, кодирующих α -субъеди-

ницу, протекает аналогично таковой для генов, кодирующих β -субъединицу рецептора.

Несомненно значимая степень гомологии между генами, кодирующими полипептидные цепи иммуноглобулинов и иммуноглобулиновых рецепторов, с одной стороны, и антигенсвязывающих рецепторов Т-лимфоцитов — с другой, установленная при сравнительном изучении кДНК для этих цепей, свидетельствует в пользу филогенетического родства этих двух групп структурных генов (см. также гл. 3). Как было установлено группой, руководимой М. Davis (1984), ген для β -субъединицы антигенсвязывающего рецептора Т-лимфоцитов локализован у мыши в принципиально том же районе шестой хромосомы, где и гены легкой (κ) цепи иммуноглобулинов. Авторы считают, что это служит еще одним признаком общности эволюционного происхождения генов, кодирующих антигенраспознающие молекулы как Т-, так и В-клеток.

Таким образом, не будучи иммуноглобулинами по своей природе, антигенсвязывающие рецепторы Т-лимфоцитов кодируются генами, сходными по своему строению и принципам реаранжировки с генами, кодирующими полипептидные цепи иммуноглобулинов. Подобие сравниваемых генетических систем свидетельствует в пользу того, что они происходят от одного родоначального (анцестральное) семейства генов. В заключение целесообразно проиллюстрировать сходство строения J-сегментов генов полипептидных цепей иммуноглобулинов и субъединиц, образующих рецептор Т-лимфоцитов, на основе аминокислотных последовательностей соответствующих участков сравниваемых цепей (см. рис. 15), предсказанных по данным секвенциального анализа.

4.4. Гены рецепторов, экспрессируемых нелимфоидными клетками

Ген рецептора, распознающего эпидермальный гормон роста, локализуется у человека в седьмой хромосоме. Косвенные данные свидетельствуют в пользу того, что ген этого белка интронирован таким образом, что сегменты ДНК, кодирующие внеклеточный, внутримембранный и внутриклеточный участки молекулы рецептора, разобщены. Этот факт также подтверждают данные, полученные при изучении экспрессии указанного рецептора опухолевыми клетками. Оказалось, в частности, что клетки эпидермальной карциномы A431, имеющие хромосомальные транслокации, в том числе хромосомы 7, синтезируют мРНК для белка с молекулярной массой 70 000. Этот белок, представляющий собой, по существу, внеклеточный участок рецептора эпидермального гормона роста, секретируется клетками карциномы

(E. Mayes, M. Waterfield, 1984). В тех же клетках были обнаружены транскрипты для трансмембранной и внутриклеточной частей указанного рецептора.

Приведенные данные можно объяснить в свете предположения, согласно которому в опухолевых клетках не достигается реаранжировка сегментов ДНК, приводящая к появлению единого гена рецептора. Другое объяснение может основываться на экспериментальных наблюдениях, касающихся процессинга первичного транскрипта для рецепторного белка (C. R. Lin et al., 1984). Транскрипционная единица для рецепторного белка включает помимо экзонов также нетранслируемые участки последовательности. Первичные транскрипты (ядерная мРНК) могут подвергаться альтернативному сплайсингу, в ходе которого возможно появление зрелых мРНК, кодирующих отдельные фрагменты молекулы рецептора.

Секретируемый опухолевыми клетками внеклеточный участок рецептора гормона роста с полным основанием можно отнести к категории R-белков (см. гл. 3 и 5). Появление в жидкостях организма (а при культивировании клеток *in vitro* — культуральной среде) внеклеточных участков рецепторных белков (R-белки) трактуется как результат катаболического расщепления клеточных рецепторов (см. гл. 5). Кроме того, необходимо учитывать также возможность поступления в жидкости организма (в первую очередь в кровь) внеклеточных частей рецепторов (R-белки), синтезируемых на матрицах, подобных тем, которые обнаружены в опухолевых клетках для внеклеточной части рецептора гормона роста.

Изучение кДНК для инсулинового рецептора человека (A. Ulrich et al., 1985) показало, что обоим типам субъединиц (α и β), из которых построен этот белок, соответствует один структурный ген. Первоначально синтезируется белок, состоящий из одной полипептидной цепи (прорецептор). Он процессируется в синтезирующих его клетках с образованием двух фрагментов. N-концевой фрагмент с молекулярной массой 82 500 представляет собой α -субъединицу, а C-концевой с молекулярной массой 69 700 — β -субъединицу. После гликозилирования молекулярная масса α -субъединицы достигает 120 000—130 000, β -субъединицы — 90 000. Молекула рецептора формируется в окончательном виде из двух пар α - и β -субъединиц (см. рис. 4).

Сравнение инсулинового рецептора (его α -субъединицы) и внеклеточного участка рецептора гормона роста свидетельствует об очень высокой степени гомологии кодирующих эти участки сегментов ДНК (анализ осуществляли путем сравнения кДНК для этих рецепторов). Для первых с N-конца 444 остатков α -субъединицы инсулинового рецептора и первых 461 остатков рецептора гормона роста гомология достигает 27%. Кроме того, в клетках, продуцирующих инсулиновый рецептор (плацента, моноклональные лимфобласты), обнаружено несколько различающихся по размеру мРНК, гомологичных кДНК для инсулинового

прорецептора. В их числе и низкомолекулярная мРНК, которая могла бы быть матрицей для биосинтеза только α -субъединицы. Если дальнейший анализ подтвердит данную гипотезу, это позволит предположить возможность продукции в изолированном виде внеклеточного участка инсулинового рецептора подобно биосинтезу внеклеточного участка рецептора гормона роста (см. выше). Насколько это значимо с биологической точки зрения, будет обсуждаться в гл. 6.

Катаболизм рецепторных белков

5

5.1. Обмен клеточных рецепторов

Клеточные рецепторы, как и другие компоненты цитоплазматической мембраны, подвергаются обновлению за счет распада существующих структур и их новообразования. Эти процессы в случае стационарного состояния клеточного метаболизма находятся в равновесии, вследствие чего содержание рецепторных белков остается в каждую единицу времени постоянным.

При кратковременной инкубации культивируемых *in vitro* клеток с меченой аминокислотой можно оценить скорость биосинтеза рецепторного белка той или иной специфичности. Для этого после солюбилизации рецепторов с использованием детергентов рецептор определенной специфичности извлекают из смеси на иммобилизованном лиганде. Скорость катаболизма того же рецептора можно оценить после введения в его молекулу радиоактивного иода в мягких условиях. Для этого используют ферментативный метод иодирования (окисляют иод в анионной форме до атомарного в присутствии пероксидазы и пероксидов в качестве субстрата). Клетки с иодированными рецепторами (иодируются только внеклеточные участки рецепторов) сохраняют жизнеспособность. В процессе их культивации можно оценить время, за которое они потеряют меченый рецептор. Для извлечения солюбилизованного рецептора используют как иммобилизованный лиганд, так и направленные против этого рецептора антитела, в том числе моноклональные. Измерение скоростей биосинтеза и катаболизма данного рецептора позволяет оценить время его обмена в мембране данного типа. На практике прибегают к определению времени полуобмена рецептора, т. е. периода, за который произойдет обновление данного рецептора на клеточной поверхности на 50%.

Исследование времени полуобмена различных рецепторных белков, продуцируемых одной и той же клеткой, показало, что скорость обмена каждого рецептора строго индивидуальна. Она может варьировать в широких пределах для рецепторов

различной специфичности, что согласуется с другими фактами, свидетельствующими о независимости «биологической жизни» каждого вида рецепторов. Скорость полуобмена конкретного рецептора может, в свою очередь, существенно меняться в зависимости от активности метаболических процессов в клетке и периода клеточного цикла. Это иллюстрируют данные, полученные при изучении В-лимфоцитов.

Находящиеся в селезенке неиммунизированных мышей В-лимфоциты обменивают свои иммуноглобулиновые рецепторы на 50% за 4—6 ч. Аналогична скорость обмена иммуноглобулиновых рецепторов, характерная для лимфоцитов, полученных из селезенки мышей спустя 9 дней после иммунизации этих животных чужеродными эритроцитами. В этот период индуцированная антигеном пролиферация лимфоидных клеток прекращается и лимфоциты по показателям своего метаболизма становятся подобными тем же клеткам от животного, не подвергнутого иммунизации. Иная ситуация наблюдается в случае активации В-лимфоцитов и превращения их в лимфобласты. Скорость полуобмена иммуноглобулиновых рецепторов при этом возрастает в очень большой степени: время полуобмена уменьшается до 20 мин.

По данным С. Н. Комиссаренко (1986), на стадии G_1 клеточного цикла лимфоциты практически теряют свои иммуноглобулиновые рецепторы. Последнее можно объяснить разобщением в этот период скоростей биосинтеза и катаболизма рецепторов за счет значительного увеличения скорости их сброса с клеточной поверхности.

Представляется, что описанные выше изменения скорости полуобмена иммуноглобулиновых рецепторов лимфоцитов отражают закономерности обмена самых различных по специфичности рецепторов как лимфоцитов, так и других клеток. Наблюдаемое при активации клеток ускорение обмена рецепторов может быть связано с их агрегацией на клеточной поверхности; она подобна агрегации, происходящей при «сшивании» рецепторов мультивалентным лигандом (см. гл. 1) или антителами, направленными против рецепторного белка (см. гл. 1 и 4). Электронно-микроскопический анализ активированных митогенами лимфоцитов подтверждает факт изменения равномерного распределения мембранных структур у этих клеток, формирование кластеров и последующий отрыв от клетки агрегатов мембранных белков вместе с участками клеточной мембраны (С. Быковская и др., 1985).

Продолжая обсуждение проблемы, необходимо специально подчеркнуть, что при сшивании рецепторов каждого типа специфичным мультивалентным реагентом первоначально формируются агрегаты, каждый из которых состоит из рецепторов только одного типа. Так, если на лимфоциты, несущие иммуноглобулиновые рецепторы и Fc-рецепторы, подействовать антииммуноглобулиновыми антителами, то первоначально произой-

дет микроагрегация иммуноглобулиновых рецепторов, затем укрупнение агрегатов и, наконец, перемещение их к одному из полюсов клетки, где сформируется структура в форме шапочки, кэп. В ходе этого процесса равномерное распределение Fc-рецепторов на поверхности того же лимфоцита не изменится, равно как не изменится распределение на поверхности этой клетки других мембранных белков (Р. Grammer, В. Pernis, 1976). Перечисление экспериментов подобного типа можно было бы продолжить. Следовательно, в случае индуцированной какими-либо реагентами агрегации рецепторов определенного типа общих «возмущений» клеточной поверхности не происходит: реагент, действие которого направлено на определенный рецептор, не оказывает влияния на поведение других типов рецепторов.

Следовательно, во-первых, сбросу рецепторов с поверхности клетки предшествует, очевидно, агрегация рецепторов строго определенного типа, во-вторых, сброс рецепторов данного типа с поверхности клетки не связан с изменением в этот период свойств мембраны как таковой.

Если спонтанный сброс клеточных рецепторов, как составной части процесса их обмена, протекает также через стадию их агрегации, то каков механизм этого специфического в своей основе процесса? Иными словами, что заставляет рецепторы к определенному лиганду начать агрегировать без участия какого-либо внешнего агента? Для ответа на этот вопрос, равно как и на другие важные вопросы, касающиеся функционирования клеточных рецепторов, следует познакомиться с данными, указывающими на существование *антирецепторов* (термин предложен автором).

5.2. Антирецептор

При иммунохимическом анализе внеклеточных участков рецепторов, «снятых» с клеточной поверхности с помощью трипсина, был установлен, на первый взгляд, удивительный факт. Оказалось, что в составе протеолитических фрагментов клеточных белков содержатся такие продукты, которые взаимодействуют не только с иммобилизованными лигандами, но и с иммобилизованными антителами к тем же лигандам. В описываемых экспериментах клетки культивировали в среде, содержащей меченую аминокислоту. Источником клеток служили либо покоящиеся макрофаги из брюшной полости, либо костно-мозговые фибробласты кролика, подвергнутые клонированию *in vitro*. Ряд ключевых экспериментов выполняли на клетках макрофагоподобной линии P388 D₁ (мышь).

Как было показано в гл. 3, все указанные клетки экспрессируют рецепторы к простым гаптенам — азофениларсанилат-тирозину (АРС) и динитрофениллизину (ДНФ). В материале, «снятом» с поверхности клеток с помощью трипсина, содержатся

фрагменты рецепторов, которые специфически взаимодействуют с указанными иммобилизованными лигандами. То, что эти фрагменты рецепторов содержат радиоактивную метку, свидетельствует об их биосинтезе клетками-мишенями. Помимо способности фиксироваться на упомянутых лигандах, трипсиновые фрагменты рецепторов, включившие радиоактивность, связываются с иммобилизованными гомологичными антителами к тем же лигандам (А. Я. Кульберг и др., 1985; Л. Н. Бартова и др., 1986).

В качестве примера можно привести результаты изучения фрагментов рецепторов, «снятых» трипсином с поверхности фибробластов. Как следует из рис. 11, радиоактивный материал, связывающийся с иммобилизованным APC, способен взаимодействовать с иммобилизованными антителами кролика против APC. Действительно, после пропускания материала, «снятого» с поверхности фибробластов, через иммобилизованные анти-APC-антитела, в вытекающей из колонки жидкости примерно на 70% снижается содержание белка, способного взаимодействовать с иммобилизованным APC. В аналогичных опытах на клетках линии P388 D₁ было показано, что один и тот же продукт специфически связывается с гаптенем и антителами к этому гаптenu. Так как клетки линии однородны и являются потомками одной трансформированной клетки, можно заключить, что обе составляющие изучаемых трипсиновых фрагментов белков цитоплазматической мембраны продуцируются одной и той же клеткой. Поскольку мембранные белки, распознающие те или иные лиганды, обозначают как рецепторы, то белки мембраны, взаимодействующие с антителами против лиганда, правомерно обозначить как антирецепторы.

Из предыдущего следует, что один и тот же продукт, содержащийся в растворе после обработки клеток трипсином, обладает лигандсвязывающими свойствами и способностью взаимодействовать с антителами к тому же лиганду. Означает ли это, что оба свойства присущи одному и тому же белку? Экспериментальные данные, полученные при изучении макрофагального рецептора для C1q, позволили дать ответ на этот вопрос (А. Я. Кульберг и др., 1986).

Как было показано, Fab-фрагменты антител против C1q не способны заблокировать непосредственно на клеточной поверхности активный центр рецептора для C1q (см. с. 151). Вместе с тем этим свойством обладают Fab-фрагменты антител против антител к C1q, т. е. фрагменты антиидиотипических антител. Ингибирующим действием обладают также Fab-фрагменты антивариотипических (анти-V_H) антител. Все это может означать, что рецептор для C1q на клеточной поверхности пространственно изолирован от антирецептора, комплементарного антителам против C1q.

Иная ситуация наблюдается при изучении внеклеточной части рецептора для C1q, изолированной в результате обработки макрофагов трипсином. Как и в других экспериментах, макро-

фаги культивировали в присутствии изотопа глицина. Внеклеточный участок рецептора изолировали с использованием иммобилизованного $C1q$. Полученный препарат обладал свойством фиксироваться на иммобилизованных антителах против $C1q$ (А. Я. Кульберг, Н. Д. Ивановска, И. А. Тарханова, 1986). Тем самым в изолированном виде внеклеточный участок рецептора для $C1q$ вел себя подобно изолированным внеклеточным участкам рецепторов для АРС и ДНФ, т. е. соединял в себе свойства как рецепторного, так и антирецепторного белков.

Эти данные позволяют сделать важное заключение: будучи пространственно изолированными на клеточной поверхности рецептор и антирецептор способны своими внеклеточными участками взаимодействовать между собой; такое взаимодействие реализуется, в частности, в растворе после «срезания» внеклеточных участков рецептора и антирецептора с помощью трипсина. Описываемое взаимодействие происходит, как представляется, по типу взаимодействия идиотип-антиидиотип. Носителем идиотипспецифических структур является активный центр рецептора (см. разд. 3.3). Что касается антирецептора, то по признаку сродства к антителам против данного лиганда его следует рассматривать в качестве носителя антиидиотипических структур.

Обнаружение антирецепторов и продукция этих мембраносвязанных белков теми же клетками, которые синтезируют комплементарный ему рецептор, крайне важно для понимания биологической роли рецепторов в регуляции клеточного гомеостаза (см. гл. 6). Эти данные существенны также для объяснения механизма обмена клеточных рецепторов. Становится понятным механизм спонтанной макроагрегации рецепторов, которая происходит без участия агентов, способных извне «сшивать» определенные рецепторы.

Как известно, положение рецепторного белка в мембране клетки не является постоянным, он как бы плавает в ней, медленно перемещаясь в плоскости мембраны (J. Schlessinger, 1980). В ходе этих перемещений ранее разобщенные рецептор и комплементарный ему антирецептор могут сблизиться и прореагировать посредством своих внеклеточных участков. Это приведет к формированию микроагрегатов, способных за счет активации мембранных ферментов обеспечить локальное снижение микровязкости мембраны. Следствием его будет ускоренное формирование в этом участке более крупных агрегатов рецепторов данного типа и последующий их сброс с клеточной поверхности. Правомерно предположить, что индивидуальные скорости обмена рецепторов каждого типа зависят от плотности на клеточной поверхности молекул как рецептора, так и антирецептора. А их соотношение не обязательно должно быть равно единице.

Предложенное объяснение механизма обмена клеточных рецепторов в настоящее время по существу является единственным. Читателю нетрудно заметить его известную фрагментар-

ность. Однако на основе высказанной гипотезы могут быть сформулированы новые экспериментальные подходы для расшифровки всей проблемы метаболизма клеточных рецепторов.

5.3. Промежуточные продукты катаболизма рецепторных белков

Немногочисленные сведения о катаболизме рецепторных белков свидетельствуют в пользу того, что после «сбрасывания» с клеточной поверхности (или в ходе этого процесса) рецепторы подвергаются протеолитическому расщеплению подобно другим белкам. При этом следует разграничивать процессы интернализации и катаболизма рецепторов. В гл. 1 рассматривали судьбу клеточных рецепторов, интернализация которых обусловлена лигандом или протекает спонтанно. Прямые экспериментальные данные, полученные при изучении рециклирования рецепторов инсулина, указывают на то, что в ходе интернализации и последующей реэкспрессии рецептора не происходит каких-либо изменений в его строении (Bin Tao Pan, R. Johnstone, 1984). Это может означать, что процессы рециклирования и катаболического распада рецепторов разобщены.

Судьба рецепторов в решающей степени зависит от того, в какой форме они находятся: мономерной или агрегированной. Если рецепторы агрегированы (с помощью поливалентного лиганда или антирецепторного антитела), они вступают на путь катаболического расщепления (см. разд. 1.3; 5.1 и 5.2). При этом возможны *два пути катаболических превращений агрегированных рецепторов*. Первый — поглощение агрегата клеткой, поступление агрегатов в лизосомы и их расщепление непосредственно в лизосомах. В ходе этого процесса могут образовываться сравнительно устойчивые к расщеплению промежуточные продукты распада, сохраняющие свою функциональную активность (см. разд. 1.3). Второй путь связан со сбросом агрегированного материала (одновременно с фрагментами мембраны) во внешнюю среду (см. разд. 5.1). Указанные направления катаболических превращений клеточных рецепторов детально прослежены при изучении судьбы иммуноглобулиновых рецепторов В-лимфоцитов, агрегации которых достигали с помощью бивалентных фрагментов антииммуноглобулиновых антител.

Проблемы, связанные с природой и биологическими свойствами промежуточных продуктов распада клеточных рецепторов, одинаково значимы, идет ли речь о продуктах катаболизма рецепторов, образующихся в клетке, или о фрагментах молекулы рецептора, которые образуются после сброса последнего с поверхности клетки во внешнюю среду.

В гл. 1 и 2 обсуждались вопросы, связанные с функциональной ролью внутриклеточных доменов рецепторов различной специфичности и существованием у некоторых внутриклеточных доменов структурной и функциональной автономии. Появляясь

в изолированном виде в форме промежуточных продуктов внутриклеточного распада рецепторных белков, изолированные внутриклеточные домены ряда рецепторов благодаря своей ферментативной активности обеспечивают реализацию сигнальных функций пептидных гормонов и некоторых других регуляторных молекул (см. гл. 2). В настоящем разделе будут рассмотрены структурно-функциональные свойства фрагментов рецепторных белков, сбрасываемых в ходе катаболизма с клеточной поверхности.

В недавнее время появились сведения о том, что фрагменты рецепторов, сбрасываемых с клетки, включают внеклеточные участки их молекул (*R*-белки). Это было установлено при изучении состава культуральной жидкости от клеток макрофагоподобной линии P388D₁, выращивание которых производили в присутствии ¹⁴C-глицина. При пропускании культуральной жидкости через колонку с иммобилизованным арсанилаттирозином был обнаружен и выделен меченый белок. Последний характеризовался избирательным сродством к указанному выше гаптenu и имел молекулярную массу, не превышающую 60 000. Аналогичный по специфичности белок, как показано в гл. 3, удается «снять» с поверхности тех же клеток с помощью трипсина. Поскольку макрофаги не продуцируют антител, белок, содержащийся в культурной жидкости этих клеток, который взаимодействует с простым гаптеном, можно отнести к продуктам катаболического распада рецепторов, распознающих указанный гаптен.

В организме продукты катаболического распада сбрасываемых с клетки рецепторов окажутся в сыворотке крови. Таким образом, если в сыворотке появляются белки, сходные по лигандсвязывающим свойствам и особенностям строения с внеклеточными доменами рецепторных белков, их можно рассматривать как промежуточные продукты распада рецепторов. Разумеется, при этом невозможно дать ответ на вопрос, каким именно клеткам принадлежал данный рецептор.

Ряд наблюдений свидетельствует о возможности выявления в сыворотке человека и экспериментальных животных белков, сходных по строению и лигандсвязывающим свойствам с внеклеточными доменами рецепторов. Рассмотрим первоначально сведения об обнаружении у неиммунизированных животных белков, связывающих простые гаптены, и об их иммунохимическом анализе.

Сыворотку от неиммунизированных мышей различных инбредных линий пропускали через колонки с иммобилизованными гаптенами: АРС и ДНФ. После удаления несвязавшихся белков производили элюцию фиксированного на колонках материала 2М КІ. После разделения элюированного материала методом молекулярных сит на две фракции они были изучены с помощью электрофореза в полиакриламиде (в присутствии додецилсульфата натрия). В высокомолекулярной фракции содержался материал с молекулярной массой свыше 150 000. В низкомоле-

кулярной фракции в качестве основного компонента присутствовал белок с молекулярной массой около 55 000.

Этот белок по ряду характеристик был подобен *R*-белку к тому же лиганду, который удается «снять» с поверхности макрофагов и фибробластов с помощью трипсина. Он имел в доступной форме антигенные детерминанты, с которыми взаимодействуют антивариотипические антитела (см. разд. 3.2), реагировал с антителами против того же лиганда (см. разд. 5.2). На этом основании было сделано заключение, что присутствующие в сыворотке белки, связывающие простые гаптены и имеющие молекулярную массу около 55 000, представляют собой *R*-белки, т. е. изолированные внеклеточные участки соответствующих по специфичности клеточных рецепторов (А. Я. Кульберг и др., 1986). Эти белки не относятся к фрагментам молекулы антитела, так как не реагируют с антителами к константным участкам пептидных цепей иммуноглобулинов. Кроме того, в иммуноглобулинах и их Fab-фрагментах вариотипические детерминанты находятся в скрытой форме и не доступны для антител к ним. В описанном белке они экспонированы подобно тому, как это наблюдается во внеклеточных частях рецепторных белков.

Большой интерес представляет тот факт, что значительная часть сывороточных *R*-белков способна формировать комплексы с сывороточными γ -глобулинами. Комплекс формируется за счет нековалентных взаимодействий, и для отделения *R*-белка достаточно обработать препараты таким детергентом, как дезоксихолат натрия (А. Я. Кульберг, И. А. Елистратова, 1985). Изолированный в указанных условиях *R*-белок сохраняет свои лиганд-связывающие свойства. В качестве иммуноглобулинов, связывающих *R*-белки, выступают IgG и IgA (А. Я. Кульберг с соавт., 1986). Для того чтобы оценить общее количество комплекса *R*-белок — иммуноглобулины в различных препаратах иммуноглобулинов (включая коммерческие), был использован следующий методический прием. Поскольку в отличие от *R*-белков собственно иммуноглобулины имеют вариотипические детерминанты в скрытой форме, антитела к этим детерминантам были иммобилизованы на сефарозе, и через колонки с таким иммуносорбентом пропускали препараты иммуноглобулинов. Последние в комплексе с *R*-белками связывались иммуносорбентом за счет *R*-белков, а иммуноглобулины, не содержащие *R*-белка, проходили через колонку с иммуносорбентом. Таким способом удалось установить, что комплекс иммуноглобулинов с *R*-белками составляет в среднем около 5% от общего количества иммуноглобулинов.

Содержащиеся в препаратах иммуноглобулинов и сыворотке крови неиммунизированных особей (человек и экспериментальные животные) комплексы *R*-белков с иммуноглобулинами ведут себя в серологических реакциях (например, реакция гемагглютинации) подобно антителам. Уже давно было известно, что в норме в сыворотке крови присутствуют антитела к различным

антигенам и гаптенам. В отличие от антител, синтез которых индуцирован в результате иммунизации, такие антитела получили название *естественных*. В свете новых фактов, изложенных выше, становится очевидно, что *естественные антитела представляют собой комплексы иммуноглобулинов с R-белками*, причем именно R-белок в составе комплекса выполняет лигандсвязывающие функции, а собственно иммуноглобулин служит лишь носителем. При этом источником R-белка могут быть и нелимфоидные клетки. Так, в частности, удается искусственно получить *in vitro* комплексы R-белка, извлеченного из культуральной жидкости клеток макрофагального ряда (этот белок специфически связывал APC) и иммуноглобулинов класса G.

Среди внеклеточных участков рецепторов, содержащихся в изолированном виде в культуральной жидкости и сыворотке крови, находятся также фрагменты Fc-рецепторов. Они высвобождаются лимфоцитами, активированными митогенами растительного происхождения (фитомиогены), и обладают (подобно соответствующему рецептору) способностью взаимодействовать с Fc-участками иммуноглобулинов различных классов. Белки указанной специфичности получили групповое наименование *иммуноглобулинсвязывающих* (IBF от англ. immunoglobulin-binding factor). По своему родству к иммуноглобулинам различных классов указанные факторы подразделяют на IBF_{γ} , IBF_{μ} , IBF_{α} , IBF_{ϵ} (W. Fridman et al., 1975—1979; K. Ishizaka, 1980—1983; Y. Yodoi et al., 1983, 1984; H. Kiyono et al., 1985).

Существенно, что высвобождению IBF клетками способствуют два фактора — *активация клеток* (антигеном или поликлональным митогеном) и *присутствие специфического лиганда* (т. е., иммуноглобулина определенного класса). При этом, если клетка способна экспрессировать два вида Fc-рецепторов (например, рецепторов для IgG и IgA), то в присутствии IgA в культуральную жидкость поступает только IBF_{α} (Y. Yodoi et al., 1983). Если принять во внимание, что в препаратах иммуноглобулинов всегда присутствуют агрегаты этих белков, то нетрудно представить себе, что такие поливалентные лиганды способны сшивать между собой соответствующие по специфичности Fc-рецепторы. Последнее, как уже обсуждалось (см. разд. 5.1) служит необходимым условием для «сброса» с клеточной поверхности того или иного рецептора. На этом основании, а также исходя из того, что молекулярная масса IBF существенно меньше молекулярной массы Fc-рецептора, эти белки можно отнести к промежуточным продуктам катаболизма Fc-рецепторов.

К числу продуктов катаболизма клеточных рецепторов принадлежит, очевидно, и содержащийся в сыворотке белок, взаимодействующий с активированным третьим компонентом комплемента — C3b. Этот белок получил наименование *фактора H*. Антитела к фактору H (включая моноклональные) взаимодействуют также с рецептором для C3b, экспрессируемым В-лимфоцитами (M. Dierich, T. Schulz, 1984). Так как указанные

антитела способны блокировать активный центр рецептора для СЗб, это свидетельствует о сходстве фактора *H* именно с внеклеточным участком упомянутого рецептора.

Таким образом, приведенные данные свидетельствуют в пользу того, что в ходе катаболического расщепления рецепторов образуются и могут поступить в жидкости организма фрагменты рецепторных белков, соответствующие их внеклеточным участкам. Кроме того, существует возможность поступления в жидкости организма синтезируемых в виде самостоятельных белков внеклеточных участков рецепторов, что характерно для опухолевых клеток (см. разд. 4.4). Внеклеточные участки рецепторов в изолированном виде сохраняют свои лигандсвязывающие свойства. Это обстоятельство обуславливает возможность проявления ими биологических свойств. Рассмотрению этой проблемы будет посвящена заключительная глава настоящей книги.

Клеточные рецепторы и регуляция биосинтеза белка

6

Находясь в постоянно изменяющемся микроокружении, клетки и системы клеток многоклеточного организма поддерживают постоянство своей внутренней среды и адаптируются к изменениям окружающей среды благодаря эффективным и специфическим регуляторным механизмам. Одним из важнейших механизмов является *регуляция биосинтеза белка*. Гомеостатический принцип регуляции биосинтеза белка предполагает функционирование системы обратной связи, т. е. участие новообразованного белка в подавлении его биосинтеза. Когда речь идет о регуляции биосинтеза белков, продуцируемых клеткой во внешнюю среду, *принцип обратной связи* в его простейшем варианте должен включать в себя рецепцию клеткой секретированного ею белка и оценку его концентрации во внешней среде. Обе эти функции способны выполнять клеточные рецепторы белков, синтезируемых данной клеткой. Следовательно, элементами системы регуляции биосинтеза белка служат как этот белок, так и распознающие его клеточные рецепторы.

Можно привести немало примеров того, что клетки, продуцирующие определенный белок, экспрессируют также рецепторы к этому белку. Так, клетки печени, синтезирующие, как известно, сывороточный альбумин, способны рецептировать этот белок. Макрофаги, продуцирующие ряд белков системы комплемента, экспрессируют рецепторы, распознающие упомянутые белки. На лимфоцитах В-ряда находятся рецепторы иммуноглобулинов. Они сохраняются на активированных лимфоцитах — *лимфобластах*, способных уже секретировать новообразованные иммуноглобулины. Существенно при этом, что биосинтез иммуноглобулинов лимфобластами носит регулируемый характер. В то же время их потомки — плазматические клетки, будучи лишенными способности экспрессировать рецепторы иммуноглобулинов (Fc-рецепторы), характеризуются постоянным и высоким уровнем биосинтеза иммуноглобулинов. Последнее может рассматриваться как косвенное доказательство важной роли рецепторов данного белка в регуляции его биосинтеза.

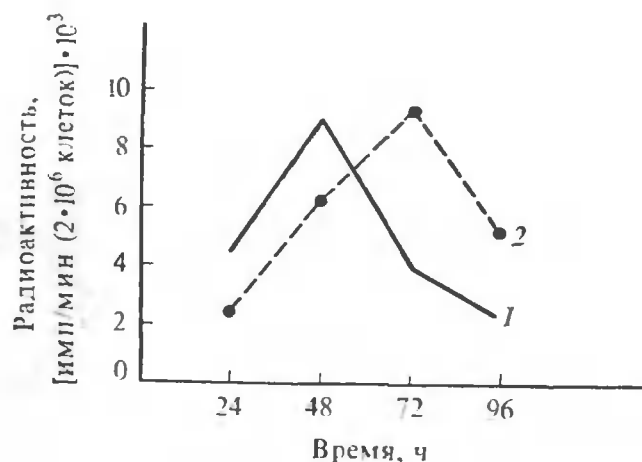


Рис. 21. Изменение содержания новообразованного C1q-компонента комплемента в экстракте перитонеальных макрофагов (1) и в культуральной жидкости при культивировании клеток *in vitro* (2)

На рис. 21 представлены данные о накоплении в клетках и среде меченого C1q при культивировании макрофагов в среде с радиоактивной аминокислотой. Максимальное содержание меченого C1q в среде наблюдается к 72 ч. Уменьшение фиксируемого на иммуносорбенте внеклеточного C1q к 96 ч можно объяснить его протеолитическим расщеплением под действием высвободившихся из клеток протеиназ.

Как известно, макрофаги экспрессируют рецептор для C1q (см. гл. 3 и 5). Активный центр этого рецептора содержит структуры, являющиеся детерминантами для антител против антител к C1q (см. разд. 3.2). Моновалентные Fab-фрагменты указанных антиидиотипических антител блокируют активный центр рецептора для C1q, эффективно конкурируя с последним. Это определяет возможность использования Fab-фрагментов антиидиотипических антител для оценки роли рецептора в регуляции биосинтеза белка, распознаваемого этим рецептором. Как показали выполненные эксперименты (А. Я. Кульберг и др., 1986), добавление в среду Fab-фрагментов антител против антител к C1q приводит к подавлению биосинтеза C1q полежащими перитонеальными макрофагами (рис. 22). Одновременно в этих же условиях был исследован биосинтез других белков, продуцируемых макрофагами. Для этого с помощью иммобилизованных антител из препаратов извлекали C1q, а остальные белки (как внутриклеточные, так и присутствующие в культуральной жидкости) осаждали трихлоруксусной кислотой и определяли их радиоактивность. Оказалось, что в присутствии Fab-фрагментов антиидиотипических антител биосинтез водорастворимых белков макрофага (за исключением C1q) не изменяется. Таким образом, избирательное блокирование активного центра рецептора для C1q сопровождается подавлением биосинтеза только C1q.

В последнее время роль рецепторов, распознающих данный белок в регуляции его биосинтеза, была подвергнута детальному анализу. В качестве модельной служила система биосинтеза полежащими макрофагами C1q-компонента комплемента. Опыты выполняли *in vitro* в среде 199, не содержащей сыворотки крови, что позволяло исключить влияние не подающихся точной оценке сывороточных факторов. Источником глицина служил ¹⁴C-глицин.

Поскольку остаточный синтез C1q макрофагами, культивируемыми в среде, которая содержит Fab-фрагменты антиидиотипических антител, носил конститутивный (постоянный) характер (рис. 22), было сделано заключение, что *блокирование активного центра рецептора для C1q строго избирательно подавляет процесс индуцибельного синтеза C1q макрофагами* (А. Я. Кульберг и др., 1986).

Выше были представлены данные, согласно которым биосинтез C1q культивируемыми макрофагами *in vitro*, затормаживается после 48 ч без каких-либо внешних воздействий на клетки (см. рис. 21). Это может означать, что в среде накапливается фактор, способный блокировать рецептор для C1q и тем самым влиять на биосинтез этого белка. Для того чтобы проверить это предположение, сравнивали между собой скорость биосинтеза C1q на разных сроках культивирования клеток и экспрессию клеточных рецепторов для C1q. Меченый глицин добавляли за 2 ч до определения новообразованного C1q; об экспрессии рецепторов судили по связыванию меченого C1q макрофагами.

Из рис. 23 следует, что скорость биосинтеза C1q в процессе культивирования клеток непостоянна. Она существенно снижается к 48 ч, а затем постепенно восстанавливается к 96 ч. Экспрессия рецепторов для C1q на поверхности макрофагов также претерпевает изменения; их динамика практически повторяет динамику биосинтеза C1q. Обращает на себя внимание также и тот факт, что восстановление скорости биосинтеза C1q к 96 ч, как и восстановление к этому периоду начального уровня экспрессии рецепторов для этого белка, происходит на фоне снижения в культуральной жидкости C1q (см. рис. 21). Иными словами, биосинтез C1q находится в прямой зависимости от экспрессии макрофагами рецепторов этого белка и в обратной зависимости от содержания C1q во внешней среде (А. Я. Кульберг и др., 1987).

Если принять, что ключевым фактором в регуляции биосинтеза того или иного белка служит степень экспрессии рецепторов этого белка, то основное внимание следует сосредоточить на поиске эндогенных причин, влияющих на экспрессию рецептора

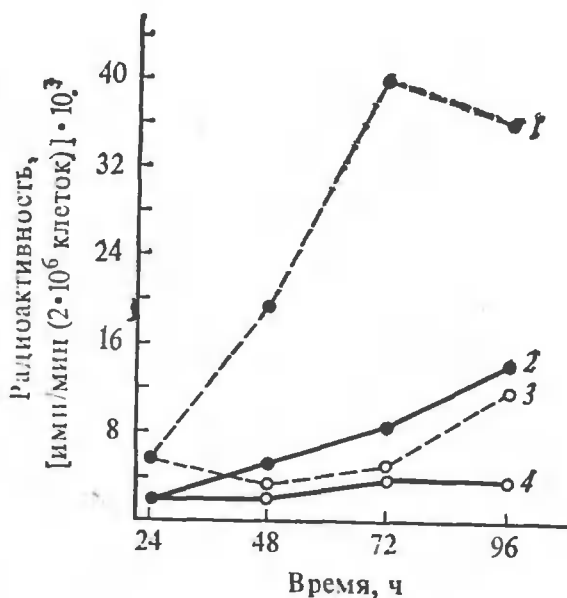


Рис. 22. Влияние антител против антител к C1q (Fab-фрагменты) на биосинтез C1q культивируемыми *in vitro* перитонеальными макрофагами:

1, 3 — биосинтез внутриклеточного C1q без добавления Fab-фрагмента и в его присутствии. 2, 4 — то же, для новообразованного внеклеточного C1q

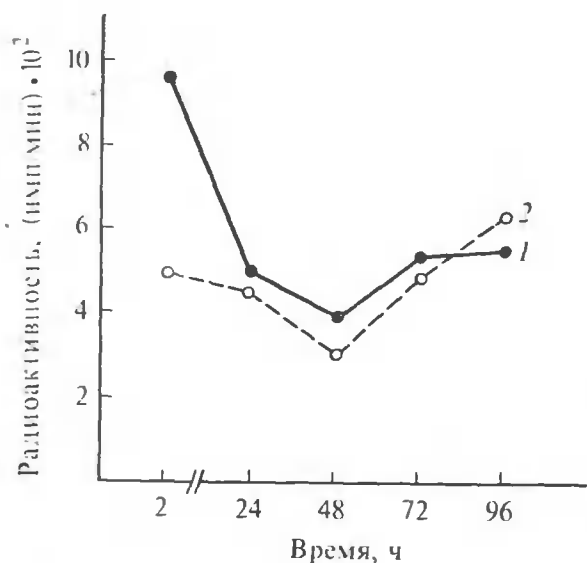


Рис. 23. Скорость биосинтеза С1q в различные сроки культивирования перитонеальных макрофагов *in vitro* (1) и экспрессия рецепторов для С1q макрофагами в те же сроки (2):

радиоактивную аминокислоту (¹⁴С-глицин) вводили за 2 ч до определения количества меченого С1q в экстрактах клеток и культуральной жидкости

(доступность его активного центра для лиганда). Прежде всего необходимо учитывать возможность блокирования активного центра рецептора новообразованным белком (специфическим для рецептора лигандом), накапливающимся вне клетки. Это предположение не находит прямого подтверждения при изучении процесса регуляции биосинтеза С1q макрофагами. В самом деле, наименьшая доступность рецепторов С1q для меченого лиганда отмечается к 48 ч, в то время как наибольшее содержание новообразованного С1q в среде приходится на 72 ч (см. рис. 21 и 23). Следовательно, не только от С1q в среде, но и от какого-то другого фактора зависит

доступность рецепторов для своего лиганда. Этим фактором может быть один из продуктов катаболического расщепления рецепторов, а именно изолированный внеклеточный участок рецептора для С1q и (или) изолированный внеклеточный участок антирецептора (см. разд. 5.2).

С целью экспериментальной проверки этого предположения следовало получить в очищенном виде внеклеточный участок рецептора для С1q и испытать его влияние на биосинтез С1q макрофагами. (Внеклеточный участок рецептора изолировали путем обработки клеток трипсином и очищали его от фрагментов других белков с помощью иммобилизованного С1q.) Добавление внеклеточного участка рецептора в среду, в которой культивировали макрофаги, приводило к постепенному уменьшению биосинтеза С1q. Как видно из рис. 24, наибольшая степень ингибирования наблюдалась к 72 ч. В первые 2 ч культивирования препарат вообще не оказывал влияния на биосинтез С1q. Ингибирующее действие внеклеточного участка рецептора для С1q на биосинтез этого белка было высоко специфичным, так как он не оказывал ингибирующего действия на биосинтез других водорастворимых белков макрофага, как внутриклеточных, так и внеклеточных.

При сопоставлении динамики ингибирующего действия внеклеточного участка рецептора для С1q и нарастания содержания новообразованного С1q в культуральной жидкости нетрудно установить прямую корреляцию между сравниваемыми процес-

сами (см. рис. 21 и 24). Это означает, что регулярное действие изолированного внеклеточного участка рецептора (относящегося к *R*-белкам) реализуется лишь в присутствии лиганда, т. е. *Clq*. Таким образом, на модели биосинтеза *Clq*-компонента компонента макрофагами получены убедительные доказательства в пользу того, что *регуляция биосинтеза белка по типу обратной связи требует участия клеточного рецептора, распознающего данный белок, изолированного внеклеточного участка рецептора и собственно белка во внешней (по отношению к клетке) среде*. Описанный механизм имеет, как представляется, универсальный характер и реализуется во всех случаях регуляции биосинтеза белка по типу обратной связи. Дальнейшее исследование позволит углубить сведения о механизме этого процесса.

В свете рассматриваемой проблемы становится очевидной важная роль поступающих в циркуляцию (кровь, другие биологические жидкости) *промежуточных продуктов катаболизма клеточных рецепторов*, а именно их *внеклеточных участков*. В разд. 5.3 приводились факты, свидетельствующие в пользу того, что изолированные внеклеточные участки рецепторов (*R*-белки) находятся в сыворотке крови либо в свободном виде, либо в комплексе с иммуноглобулинами. В последнем случае, благодаря сходству их серологических свойств с антителами, они были отнесены к так называемым естественным антителам.

Циркулирующие *R*-белки, представляющие собой фонд изолированных внеклеточных участков рецепторов самой разнообразной специфичности, служат, по-видимому, регуляторами биосинтетических процессов в самых разнообразных клетках организма. Поэтому от содержания *R*-белка определенной специфичности будет зависеть скорость биосинтеза распознаваемо-

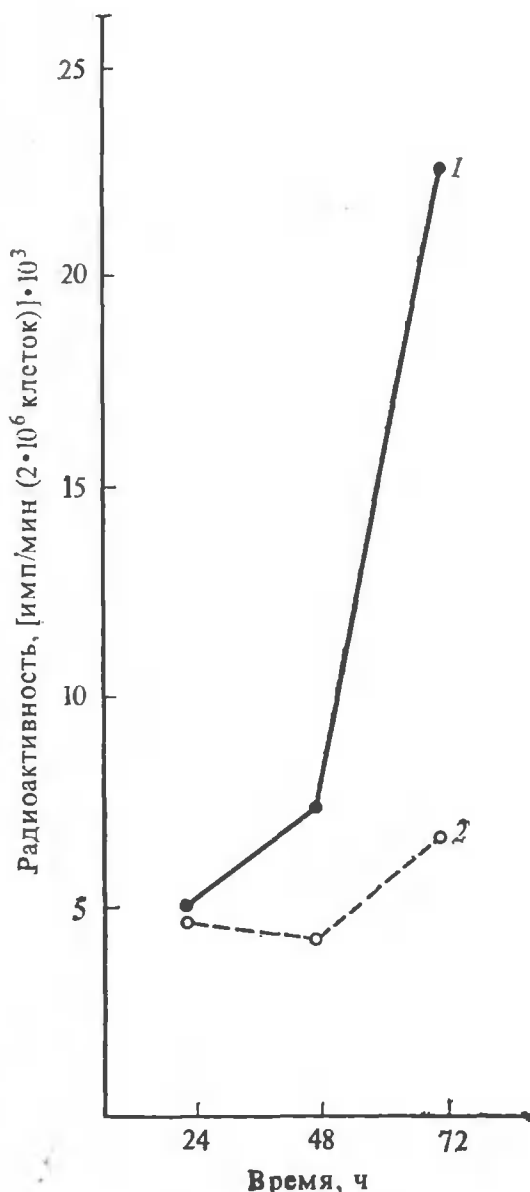


Рис. 24. Влияние изолированного внеклеточного участка рецептора для *Clq* на биосинтез *Clq* культивируемыми *in vitro* перитонеальными макрофагами:

1, 2 — новообразованный *Clq* без добавления внеклеточного участка рецептора и в его присутствии

го им белка. Связь между циркулирующим *R*-белком данной специфичности и регулируемым им биосинтетическим процессом далеко не всегда столь проста, как в проанализированной выше модельной системе биосинтеза *Clq*-компонента комплемента. Определенный *R*-белок может участвовать в регуляции биосинтеза какого-либо индуктора и, подавляя его биосинтез, опосредованно влиять на метаболические процессы в клетках, находящихся под влиянием этого индуктора. Опираясь на знания в области динамической биохимии, читатель может представить себе многообразие опосредованных путей реализации регуляторного действия *R*-белков различной специфичности на клеточный метаболизм.

В свете рассматриваемых положений можно объяснить ряд установленных ранее данных о регуляторной роли естественных антител. Впечатляющее по своим результатам исследование было выполнено J. Muggay еще в 1967 г. Он проанализировал значение естественных антител против эритроцитов барана, содержащихся в сыворотке крыс, на продукцию этими животными антител против того же антигена (эритроцитов барана). Следует напомнить, что у человека и различных экспериментальных животных, не подвергавшихся иммунизации, в сыворотке крови содержатся в низких концентрациях естественные антитела как против эритроцитов барана, так и против ряда других антигенов и гаптепов. Эти естественные антитела, в том числе естественные антитела против эритроцитов барана, представляют собой комплексы *R*-белков определенной специфичности с циркулирующими иммуноглобулинами, причем последние выполняют только функцию носителя (см. гл. 5):

В своих опытах J. Muggay осуществил удаление из крови крысы естественных антител против эритроцитов барана. Для этого у животного производили кровопускания, адсорбировали плазму крови эритроцитами барана и возвращали тому же животному. Тщательными контролями было исключено попадание в плазму в процессе ее адсорбции антигенов эритроцитов барана. Дальнейшие наблюдения за подопытными крысами показали, что у них началась интенсивная продукция антител против эритроцитов барана и накопление в селезенке клеток, продуцирующих эти антитела. Таким образом, без всякого участия специфического индуктора — антигена удается развить иммунный ответ в результате удаления из организма естественных антител или, как теперь стало очевидно, *R*-белков, специфически взаимодействующих с конкретным антигеном. Таким образом, *R*-белки, будучи изолированными внеклеточными участками рецепторов неиммуноглобулиновой природы (см. разд. 5.3), выполняют роль ингибиторов процесса пролиферации и дифференцировки В-лимфоцитов, которые способны продуцировать антитела против антигена, распознаваемого этими *R*-белками.

При разнообразных патологических состояниях человека (инфекционные, аутоиммунные и другие заболевания) содержа-

ние естественных антител к ряду лигандов (в частности, так называемых гомореактантов или агглютинаторов) значительно возрастает. Возрастает также содержание других естественных антител и суммарное содержание всех R-белков. В свете современных знаний эти факты очень важны для понимания механизмов патологического процесса, достоверной оценки его тяжести и прогнозирования исхода. При некоторых патологических процессах, изученных к настоящему времени, достоверность прогноза заболевания, основанная на определении содержания в крови естественных антител другой специфичности, равно как и определения общего содержания в сыворотке R-белков, оказывается высокозначимой (А. Я. Кульберг, 1978; А. Я. Кульберг и др., 1986). Представляется, что с углублением знаний в этой области откроются принципиально новые возможности для патогенетической терапии целого ряда заболеваний человека. В свою очередь появятся новые возможности для профилактики различных патологических состояний. Таким образом, исследования по проблеме клеточных рецепторов имеют не только большое теоретическое значение, но, несомненно, высокозначимы для решения ряда ключевых прикладных задач медико-биологического плана.

Принципиальное значение в свете обсуждаемой проблемы имеет вопрос об участии *антирецепторов* в регуляции гомеостаза индивидуальной клетки и многоклеточного организма. Выше в этой главе были приведены данные, согласно которым блокирование с помощью антиидиотипических антител (их Fab-фрагментов) рецептора Clq приводит к подавлению биосинтеза Clq макрофагами. Эквивалентом антиидиотипических антител служат антирецепторы (см. разд. 5.2), в том числе антирецепторы Clq-рецептора, которые продуцируются наряду с рецепторами для этого белка. Можно было допустить, что в рассматриваемом случае (регуляции биосинтеза Clq) макрофагами и в регуляции биосинтеза самых разнообразных белков макрофагами и другими клетками антирецепторам принадлежит определяющая роль.

Последнее не противоречит уже приводившимся фактам, свидетельствующим в пользу важной роли изолированных внеклеточных участков рецепторов (в том числе подобного участка рецептора Clq) в регуляции биосинтеза белка. Так как антирецепторы также принадлежат к числу мембранных белков, при воздействии протеиназ на клетку с отщеплением внеклеточных частей рецепторов будет происходить отщепление внеклеточных частей антирецепторов. При этом фрагменты рецепторов и антирецепторов вступят между собой во взаимодействие (см. разд. 5.2). Поэтому при изоляции с помощью аффинной хроматографии на лиганде того или иного рецептора (его изолированного внеклеточного участка) будет захвачен, по крайней мере, частично ассоциированный с ним антирецептор. Это предположение было подтверждено экспериментально (А. Я.

Кульберг и др., 1987), что послужило основанием для изучения роли изолированного внеклеточного участка антирецептора Clq-рецептора в регуляции биосинтеза Clq макрофагами.

Для того чтобы выделить указанный антирецептор, использовали иммобилизованные антитела против Clq. Источником антирецептора служил материал, изолированный с помощью иммобилизованного Clq из продуктов трипсинового гидролиза мембранных белков макрофагов. Тем самым одновременно проверяли предположение, согласно которому в составе изолированных внеклеточных участков рецепторов содержатся ассоциированные с ними фрагменты антирецепторов.

Выполненные эксперименты подтвердили факт присутствия в изучаемом материале антирецепторов, которые были получены в очищенном виде. Полученный продукт добавлял в среду и культивировали в ней макрофаги. В этих условиях биосинтез Clq прекращался почти полностью сразу после добавления антирецептора и оставался на крайне низком уровне в последующие 48 ч. Подавление биосинтеза Clq в описанных условиях носило специфический характер и было крайне эффективным: выраженное подавление биосинтеза наблюдали при добавлении всего 0,15 мкг фрагмента антирецептора на 1 мл среды (А. Я. Кульберг и др., 1987).

Описанные выше эксперименты свидетельствуют о существовании ранее совершенно не известного механизма поддержания биологического равновесия. Они означают, что регуляция биосинтеза белка на уровне клетки осуществляется с участием не только рецептора белка, но и антирецептора, который по своим свойствам как бы имитирует указанный белок. Принципиальное значение имеет также и то, что как рецепторы, так и соответствующие им антирецепторы продуцируются одной и той же клеткой, что было доказано при изучении индивидуальных клонов клеток. Одновременно было установлено, что наряду с рецепторами антирецепторы встроены в мембраны внутриклеточных компартментов, а именно лизосом и других клеточных везикул. Уже на этом основании можно предположить, что система рецептор — антирецептор участвует в регуляции биосинтеза не только белков, «экспортируемых» клеткой, но и внутриклеточных белков.

Изложенные выше результаты служат предпосылкой для исследований, направленных на выяснение всех этапов регуляции гомеостатического равновесия с участием рецепторов и антирецепторов (эндогенных имитаторов лигандов). Один из начальных этапов, как представляется, состоит в следующем. В мембране клетки, находящейся в среде (или биологических жидкостях) с низкой концентрацией определенного лиганда, рецептор этого лиганда и соответствующий ему антирецептор пространственно разобщены. О фактических данных, подтверждающих указанное положение, сообщалось в разд. 5.2. При увеличении концентрации лиганда в среде ситуация изменится.

В результате реакции все большего числа рецепторов с лигандом в липидном бислое мембраны возникнут возмущения, которые приведут к изменению ее микровязкости (А. А. Болдырев, 1986; J. Schlessinger, 1980). Указанный процесс рассматривался в гл. 5 в связи с проблемой подвижности мембранных белков в липидном бислое мембраны.

С увеличением подвижности рецепторов, находящихся во взаимодействии с лигандом, существенно возрастет вероятность встречи рецептора и антирецептора (имитатора лиганда) непосредственно на клеточной поверхности. Результатом их взаимодействия окажется неизвестная пока по смыслу команда для прекращения биосинтеза белка, распознаваемого указанным рецептором. В более общем виде взаимодействие определенного рецептора и антирецептора будет сопровождаться исключением из «работы» той метаболической системы клеток, функция которой регулируется соответствующим лигандом через его рецептор.

На основании предлагаемого механизма нетрудно представить, что активность того или иного процесса в клетке опосредованно зависит от концентрации подходящего лиганда: последний не только способствует при определенных концентрациях сближению рецептора и антирецептора в мембране, но и на конкурентных началах регулирует взаимодействие рецептора и антирецептора. В случае ауторегуляции биосинтеза белка, секретируемого клеткой во внешнюю среду, процесс его синтеза приобретет пульсирующий характер, причем колебания скорости процесса будут коррелировать с колебаниями в содержании поступившего во внешнюю среду белка и доступностью для него соответствующих рецепторов. В пользу этого свидетельствуют данные экспериментов, результаты которых приведены на рис. 23.

Экспериментальные данные, свидетельствующие о существовании антирецепторов, и уже имеющиеся сведения об их биологической функции открывают новые перспективы для понимания взаимосвязей клетки (организма) с внешним миром в условиях нормы и патологии. Рассматривая проблему антиидиотипических антител, видный иммунолог Н. Ерне и его последователи сформулировали представление, согласно которому антиидиотипическое антитело определенной специфичности несет в своей структуре «внутренний образ» антигена. Однако до тех пор, пока за этим понятием стояли лишь иммунологические феномены (функция лишь одной системы организма — иммунной системы), речь практически шла о существовании у человека и высших животных «внутреннего образа» веществ, наделенных функцией антигенов. Антиген, как чужеродный, так и собственный для данного организма, как бы проникает в иммунную систему, которая имеет свою собственную «внутреннюю жизнь». С обнаружением антирецепторов (имитаторов лигандов), производимых клетками, которые не обладают свой-

ством синтезировать антитела, появляются основания для заключения: антирецепторы несут в своей структуре «внутренний образ» всех веществ, которые способен распознать организм данного генотипа. Сопоставляя при участии рецепторов и антирецепторов свой «внутренний мир» с реалиями внешнего окружения, и клетка, и целостный организм способны адекватно реагировать на изменение своего окружения.

Ранее в этой главе рассматривался вопрос о связи патологического процесса с накоплением в крови и других жидкостях организма изолированных внеклеточных частей рецепторов — *R*-белков. Их накопление при патологии несомненно обусловлено нарастанием скорости катаболического распада мембранных белков поврежденных клеток за счет высвобождающихся во внешнюю среду клеточных протенназ и активации циркулирующих протеолитических ферментов, например плазмина. С учетом уже приведенных данных модельных экспериментов закономерно заключить, что пул циркулирующих *R*-белков включает в себя изолированные внеклеточные участки как рецепторов, так и антирецепторов. Они образуют динамическую систему, состоящую из комплексов соответствующих по специфичности фрагментов рецепторов и антирецепторов, и тех же фрагментов в свободном состоянии.

Попав окружение здоровых клеток, фрагменты рецепторов и антирецепторов, появившиеся первоначально в очаге патологического процесса, способны оказать влияние на метаболизм неповрежденных клеток как в непосредственной близости от очага процесса, так и в других органах и тканях. При этом следует иметь в виду, что самые разнообразные клетки помимо характерных для их конкретной функции потребностей имеют также и сходные потребности в самых разнообразных метаболитах, индукторах и медиаторах обмена веществ. Поэтому в спектре специфичностей *R*-белков всегда присутствуют такие фрагменты рецепторов и антирецепторов, которые способны оказать негативное влияние на клетки любой органной локализации. Так, все без исключения клетки организма нуждаются в глюкозе, потребление которой через посредство своего рецептора обеспечивает инсулин (см. разд. 2.3). Если в окружении здоровых клеток возрастет содержание изолированных внеклеточных участков рецепторов инсулина, последние, перехватывая инсулин, лишают клетку возможности достаточно эффективно потреблять глюкозу. Последствием только этого события станут серьезные нарушения метаболизма самых разнообразных клеток, не находящихся непосредственно в очаге патологического процесса.

Предложенная нами *концепция генерализации патологического процесса* при участии циркулирующих фрагментов рецепторов и антирецепторов служит основанием для построения единого механизма нарушений биологического равновесия при патологии.

Заключение

Существование на поверхности клеток белков, способных избирательно связывать различные вещества из окружающей клетку среды, было предсказано еще в начале века Паулем Эрлихом. Это предположение легло в основу его известной теории боковых цепей — одной из первых теорий иммунитета, значительно опередившей свое время. Позднее неоднократно высказывались гипотезы о существовании на клетках разнообразных по специфичности рецепторов, однако понадобились многие годы, прежде чем существование рецепторов было экспериментально доказано и началось их детальное изучение.

Интенсивное исследование рецепторного аппарата клетки в последние годы обязано во многом достижениям мембранологии и в первую очередь получению убедительных данных в пользу того, что путем простой диффузии невозможно проникновение в клетку из внешней среды как низкомолекулярных, так и высокомолекулярных веществ. Стало также очевидным, что мембрана — один из важнейших органов клетки, регулирующих метаболические процессы посредством встроенных в нее ферментов. Активность последних регулируется различными по своей природе внеклеточными индукторами и медиаторами при участии мембранных рецепторов для этих веществ.

Содержащиеся в этой книге материалы раскрывают с различных сторон проблему клеточных рецепторов, большие достижения этой области мембранологии. Однако значительное число проблем еще ждет своего решения. Помимо очевидной необходимости дальнейшего накопления сведений о строении рецепторных белков, их биосинтезе и регуляции этого процесса важная роль в будущих исследованиях будет отведена таким фундаментальным для биологии проблемам, как филогенез рецепторного аппарата клетки и механизмы управления с помощью рецепторов взаимоотношениями клетки со своим окружением. Подходы к исследованиям в этих направлениях и первые экспериментальные результаты рассматривались на страницах книги.

В свете приведенных данных можно уже сегодня с достаточным основанием говорить о едином эволюционном происхождении всей системы распознавания, которой располагают клетки

вне зависимости от своей органной локализации и функции. Сходство принципов структурной организации внеклеточных доменов рецепторов, равно как и сходство кодирующих эти участки генов, удалось установить путем сравнения различных по специфичности рецепторов с иммуноглобулинами (антителами). Эти результаты можно рассматривать как важное свидетельство в пользу того, что распознавание как чужеродных, так и собственных для данного организма веществ контролируется системами генов, происходящими из единой, филогенетически древней генетической системы. Последняя появилась к тому моменту, когда возникла бислойная мембрана клеток. В ходе эволюционного процесса произошло сцепление генов, кодирующих внеклеточные домены рецепторных белков, с разнообразными генами. Последние контролируют структуру внутриклеточных доменов рецепторов, придавая рецепторам своеобразие структуры и функциональных (эффektorных) свойств.

Распознающая функция клетки регулируется различными способами. Один из важнейших — изменение плотности рецепторов определенной специфичности на клеточной поверхности. Плотность рецепторов может варьировать как за счет регулируемого лигандом изменения скоростей биосинтеза и катаболического распада рецепторов, так и в результате «погружения» большей части рецепторов внутрь клетки при высокой концентрации лиганда во внешней среде.

Принципиально важным является иной способ управления распознаванием, который независим, в принципе, от лиганда и поэтому может быть отнесен к категории ауторегуляторных механизмов. Он реализуется благодаря продукции клетками мембранных белков со свойствами антирецептора, способного специфически связываться рецепторами и препятствовать реализации их функций как распознающих молекул. Первые сведения об антирецепторах, их роли в регуляции биосинтеза белка по типу «обратной связи» приведены в заключительных главах книги. Хотя в этой области исследования только начались, работа в указанном направлении представляется весьма перспективной для раскрытия механизмов гомеостатической регуляции биологических систем и разработки практических путей ее управления. Здесь следует ожидать значительных результатов прикладного характера, способных в еще большей степени повысить значимость проблематики, связанной с изучением клеточных рецепторов.

Рекомендуемая литература

- Кульберг А. Я.* Молекулярная иммунология. М., 1985.
- Кульберг А. Я.* Регуляция иммунного ответа. М., 1986.
- Кульберг А. Я., Ивановска Н. Д., Тарханова И. А.* Регуляция биосинтеза белка нелимфоидными клетками требует участия рецепторов, распознающих тот же белок через центр, сходный с активным центром антител//Докл. АН СССР. 1986. Т. 287. № 2. С. 486—489.
- Петров Р. В.* Иммунология. М., 1982.
- Северин Е. С., Кочеткова М. Н.* Роль фосфорилирования в регуляции клеточной активности. М., 1985.
- Чард Т.* Радиоиммунологические методы. М., 1983.
- Collins M. K. L., Owen M. J.* The T cell antigen receptor//Biochem. J. 1985. V. 230. P. 281—291.
- Czech M. P.* The nature and regulation of the insulin receptor: structure and function//Annual Rev. Physiol. 1985. V. 47. P. 357—381.
- Mostov K. E., Friedlander M., Blobel G.* The receptor for transepithelial transport of IgA and IgM contains multiple immunoglobulin-like domains//Nature. 1984. V. 308. P. 37—43.
- Sherman M. R., Stevens J.* Structure of mammalian steroid receptors: evolving concepts and methodological development//Annual Rev. Physiol. 1984. V. 46. P. 83—105.
- Waldmann T. A.* The structure, function, and expression of interleukin-2 receptors of normal and malignant lymphocytes//Sciences. 1986. V. 232. P. 727—731.
- Wileman T., Harding C., Stahl P.* Receptor-mediated endocytosis//Biochem J. 1985. V. 232. P. 1—14.

Предметный указатель

- Агглютинин из проростков пшеницы 10
Аденилатциклаза 33, 51, 72
Активный центр антитела, структура 17 *
Активные центры рецепторов 43
— — — иммунологические методы 46
— — — идентификация аминокислотных остатков 45
— — — локализация 44
— — — общий принцип структурной организации 46
— — — принципы исследования 44
Алпренолол 11
Анти- μ -антитела 72
Анти-антитела антиидиотипические 50, 51
— взаимодействие с рецепторами 51
Антиген 71
Антирецептор 79, 93
— носитель антиидиотипических структур 81
Антитела антивариотипические (anti-framework) 49, 51
— антиидиотипические 50, 51, 53
— гипервариабельные участки тяжелых и легких цепей 47
— естественные 85, 91
— моноклональные антирецепторные 10, 35
— несклные 18
— против антител к Clq 89 *
— — гормона роста 26
— — простых гаптенов 53
Белок N_s 33
Белки высокомолекулярные 35
— идентификация 38
— иммуноглобулинсвязывающие (IBF) 85
— эталонные 43, 57
R-Белки 52, 56 *, 58 *, 75, 83, 84, 91
Гаптены простые 53, 55 *
Гены вариабельные 52
— для тяжелых цепей, локализация в хромосоме 66
— иммуноглобулинов 65
— — вариабельные 65
— — константные 65
— — легких цепей 65
— — сегментов 67
— — тяжелых цепей 65
— интромирование 74
— константные 52
— рецепторов Т-лимфоцитов антигенсвязывающих 72, 73 *, 74
— — эпидермального гормона роста 74
Гистидин 45
Глюкоза, транспорт 40
Детерминанты вариотипические (framework) 49, 57
Домены внеклеточные, рецепторы 56
Down regulation 25
Единица транскрипции для тяжелых цепей иммуноглобулинов 67
Идиотип 50, 56
Имуноглобулин(ы) 43
— классы 66
— моноклональные 48
— (IgM) рецепторный 70
— — секретируемый 70
Ингибиторы протеиназ 8
Инсулин, влияние на транспортер глюкозы 40, 41 *, 42
Clq-Компонент комплемента, биосинтез 88

* Звездочкой отмечены страницы, на которых помещены рисунки или таблицы.

Консервативные участки легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов 48 *, 49 *

Кэп 25, 79

Лектины 10

Лиганд фотоактивный 12

Лигандсвязывающие участки, первичная структура 57

Лиганды, активация рецепторов 32

— для антител и клеточных рецепторов 46

Лимфобласты 87

Лимфоциты (Т и В), функциональная кооперация 7

Макрофаги, гаптенсвязывающие рецепторы 55 *

Матричные РНК иммуноглобулинов 68

Метионин 45

Метод аффинной хроматографии 8

— метки по сродству 12, 15, 16, 45

Методы иммунохимического анализа 21

Онкобелки 31

Празозин 12

Полирибосомы для тяжелых цепей иммуноглобулинов 71

Прорецептор 75

Протенинкиназа С 32

Процессинг пре-мРНК для иммуноглобулинов 68 *

Рецептор(ы) 6

Fc-Рецепторы 33

Рецептор Clq 19

— — экстракция макрофагами 88

— агрегация 25, 26, 78

— α_1 -адренергический 16

— β_2 -адренергический 33

— — очистка 11

— активация 35

— — лигандом 32

— активность протеинкиназная 30

— — тирозинкиназная 28, 29

— — ферментативная 28

— — эндонуклеазная 31

— активные центры 43—46

— андрогенов 34, 35

— афферентная функция 28

— биосинтез 65

— регуляция 87

— взаимодействие с ДНК 36

— — — ядерными белками 34

— внеклеточные участки, влияние на биосинтез Clq 91 *, 93

— — — размер 58 *

— внутриклеточный участок 6

— время полураспада 78

— выделение и очистка 8

— — на иммобилизованных лектинах 10

— глюкоагона 14 *

— глюкокортикоидный 36

— и антирецептор, взаимодействие 81

— избирательный эндоцитоз под влиянием лигандов 37

— иммуноглобулиновые, биосинтез 70

— инсулина 14 *, 15—17, 18 *, 22, 24, 58 *

— — активный центр 44

— — очистка 10

— — субъединицы 18 *, 21, 63

— — тирозинкиназная активность 28

— интернализация 22, 23 *, 25

— интерферона, очистка 11

— Т-киллеров антигенсвязывающие 20 *

— к простым гаптенам 79

— лигандзависимая активация 37

Рецептор — лиганд комплекс 12, 24, 25

Рецептор(ы), лигандсвязывающие центры 30

— В-лимфоцитов антигенсвязывающие 14 *, 15, 19, 20, 25, 65, 68, 69 *, 70

— — — агрегация 25

— Т-лимфоцитов антигенсвязывающие 19, 20, 58, 59 *, 60 *

— — — степень гомологии вариабельных районов 59, 60 *

Fc γ -Рецепторы лимфоцитов и макрофагов 21

Рецептор(ы) липопротенна низкой плотности 58 *

— макрофагов мыши, связывающий гомологичный IgG 33

— маркирование меченым лигандом 11

— молекулярные характеристики 13, 14 *

— обмен 77

— образование макроэргических соединений 38

— организация активного центра 15, 16

— прогестерона 13, 45

— рециклирование 23 *, 24

— рециркуляция 25, 41

— сбрасывание 79, 81, 85

— соматостатина 14 *

— «сшивание» 78

— тиротропина 9, 14 *, 18

— трансферина 8, 9 *, 14 *, 16

— трипсиновые фрагменты 80

— трансэпителиального транспорта IgA и IgM (поли-IgR), первичная структура 58 *, 62, 63 *

- углеводный компонент 14
- Т-хелперов 58
- фибробластов гаптенсвязывающие 54 *
- функциональная роль полипептидных цепей 15
- функциональные свойства 22
- холецистокинина 14 *, 16
- хорион-гонадотропина 14 *
- энкефалина 14 *, 16
- эпидермального фактора роста (гормона роста) 10, 14 *, 20 *, 21, 58 *
- — — первичная структура 59, 61 *
- — — тирозинкиназная активность 28, 29, 30 *
- эстрогенов 35
- эффекторные функции 28
- — — закономерности реализации 37
- Рецепторные белки, аллостерическая активация 30
- — катаболизм 77, 82
- — — промежуточные продукты 82, 85
- — — пути 82
- — — конформационная лабильность 11, 19, 22
- — — перестройка 43
- Рецептосома 22, 23 *

- Синдром тестикулярной феминизации 34
- Синтез С1q макрофагами индуцибельный 89
- Сплайсинг пре-мРНК 67
- альтернативный 69, 70
- Тиротропин 9
- Трансглутаминаза 37
- Транспортер глюкозы 39, 40
- — транслокация под влиянием инсулина и его рецептора 40, 41 *, 42
- нуклеозидов 39
- Транспортные белки для аминокислот 39
- — принципы структурной организации 39
- — (транспортеры) 6, 38, 40
- Трансферин 8

- Фагоцитоз 55
- Фактор *H* 85
- Фосфатидилинозит 32
- Фосфатидилинозиткиназа 31
- Фосфолипаза А, связь с цитоплазматическим рецептором 33

Хроматин 35

Циклический АМФ 36

Шарнирные участки 20, 60, 61 *, 62 *

Ядерный матрикс 34

Оглавление

Предисловие	5
Введение	6
Глава 1. Структурная организация и основные функции клеточных рецепторов	8
1.1. Выделение и очистка рецепторов	8
1.2. Маркирование рецепторов мечеными лигандами	11
1.3. Молекулярная масса и пространственная структура рецепторов	13
1.4. Функциональные свойства клеточных рецепторов	22
Глава 2. Эффекторные функции клеточных рецепторов	28
2.1. Клеточные рецепторы как ферменты	28
2.2. Взаимодействие рецепторов с белками клеточного ядра и ДНК	34
2.3. Транспортные белки и клеточные рецепторы	38
Глава 3. Активные центры клеточных рецепторов	43
3.1. Принципы исследования активных центров рецепторов	44
3.2. Существование общего принципа структурной организации активных центров рецепторов	46
3.3. R-белки	52
3.4. Первичная структура лигандсвязывающих участков	57
Глава 4. Молекулярно-генетические основы биосинтеза рецепторов	65
4.1. Гены полипептидных цепей иммуноглобулинов и их экспрессия	65
4.2. Биосинтез иммуноглобулиновых рецепторов и его регуляция	70
4.3. Структурные гены антигенсвязывающих рецепторов Т-лимфоцитов	72
4.4. Гены рецепторов, экспрессируемых нелимфоидными клетками	74
Глава 5. Катаболизм рецепторных белков	77
5.1. Обмен клеточных рецепторов	77
5.2. Антирецептор	79
5.3. Промежуточные продукты катаболизма рецепторных белков	82
Глава 6. Клеточные рецепторы и регуляция биосинтеза белка	87
Заключение	97
Рекомендуемая литература	99
Предметный указатель	100

Учебное издание

Александр Яковлевич Кульберг

Рецепторы клеточных мембран

Зав. редакцией А. Г. Гаврилов. Редактор А. С. Орлова. Мл. редактор И. М. Павлова. Художественный редактор Т. А. Коленкова. Художник В. Н. Хомяков. Технический редактор Т. Н. Полунина. Корректор С. К. Завьялова

ИБ № 6663

Изд. № Е—542. Сдано в набор 16.01.87. Подп. в печать 09.06.87. Т-15602. Формат 60×90^{1/16}. Бум. тип. № 1. Гарнитура литературная. Печать высокая. Объем 6,5 усл. печ. л. 6,75 усл. кр.-отт. 6,38 уч.-изд. л. Тираж 7000 экз. Зак. № 1054. Цена 20 коп.

Издательство «Высшая школа», 101430, Москва, ГСП-4, Неглинная ул., д. 29/14.

Московская типография № 8 Союзполиграфпрома при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли, 101898, Москва, Центр, Хохловский пер., 7.

20 коп.

БИОХИМИЯ МЕМБРАН

Книга продолжает
серию учебных пособий
по современным проблемам
биохимии мембран
и дает основные
представления о строении
мембранных рецепторов
и их функциях.

