

РЕГУЛЯЦИЯ БИОСИНТЕЗА ТЕТРАПИРРОЛОВ И ИЗОПРЕНОИДОВ ИНТЕГРАЛЬНЫМИ МЕМБРАННЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ СЕМЕЙСТВА МБР/TspO

© 2003 г.

А. А. ЕЛИСЕЕВ

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва

I. Введение. II. Химические свойства бензодиазепиновых рецепторов. III. Молекулярная структура МБР. IV. Биологические функции митохондриальных рецепторов. V. Бактериальные гомологи МБР. VI. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Бензодиазепины (БД) представляют собой обширный класс лекарственных препаратов, нашедших широкое применение при лечении бессонницы, в качестве седативных препаратов и антидепрессантов. В организме присутствуют два основных класса рецепторов, связывающих БД. Основная терапевтическая активность бензодиазепинов обусловлена их влиянием на центральную нервную систему (ЦНС). Бензодиазепины связываются с модуляторным сайтом ингибиторных рецепторов, сопряженных с хлоридными каналами и нейротрансмисмитером – GABA-рецептором [74]. Другой класс рецепторов – сайтов узнавания БД – часто называют участками связывания бензодиазепинов периферического типа, так как они первона-

Принятые сокращения: БД – бензодиазепины; РК11195 – представитель класса лигандов, структурно отличных от БД; (–)РК14067 и (+)РК14068 – стереоизомеры изохинолин-карбоксамидов; МБР – митохондриальный бензодиазепиновый рецептор; АНС – трансмембранный переносчик адениновых нуклеотидов; GABA – рецептор γ -аминомасляной кислоты; rk18 – изохинолин-карбоксамид-связывающий компонент митохондриального бензодиазепинового рецептора; Ro5-4864 – 4'-хлорпроизводное диазепема; TspO – бактериальный гомолог периферического бензодиазепинового рецептора (tryptophan-rich sensory protein); VDAS – трансмембранный переносчик анионов.

Адрес для корреспонденции: e-mail: AlexeiEliseev@aol.com

A. Yeliseev, Kosan Biosciences, Inc, 3832 Bay Center Place, Hayward, CA 94545, USA.

чально были обнаружены вне центральной нервной системы [15]. В более поздних исследованиях было установлено, что сайты периферического типа локализованы в основном во внешней мембране митохондрий, поэтому они и получили название митохондриальных бензодиазепиновых рецепторов (МБР) [3, 10, 11].

Обнаружение сайта узнавания БД за пределами центральной нервной системы явилось весьма неожиданным, так как ранее предполагалось, что их седативная активность должна быть исключительно связана с мозгом [56]. Обнаружение двух различных сайтов связывания бензодиазепинов позволило предположить, что механизмы активности этих рецепторов существенно различаются. Выяснение различий этих механизмов представляется весьма важным, так как в связи с высокими уровнями экспрессии МБР в некоторых органах человека высока вероятность побочных эффектов при терапевтическом применении БД. В 80–90 годы XX в. был достигнут существенный прогресс в выяснении механизма действия бензодиазепинов, связывающихся с центральным (GABA) рецептором, локализованным в клетках головного мозга. В то же время, развитие исследований в области БД рецепторов периферического типа шло значительно медленнее. Лишь в последние годы исследований в этой области был достигнут значительный прогресс благодаря применению современных генетических, молекулярно-биологических и биохимических методов.

Одним из наиболее значительных достижений последних лет в этой области явилось открытие гомологов этих белков при исследовании геномов ряда микроорганизмов (рис. 1), в том числе – в геномах нескольких протеобактерий [6, 23, 109]. Бактерии *Rhodobacter sphaeroides* и *Rhodobacter capsulatus*, относящиеся к α -3 подгруппе протеобактерий, считаются наиболее вероятными источниками эндосимбионтов, которые привели к возникновению митохондрий высших организмов. Обнаружение гомологов МБР в указанных бактериях ставит интересный вопрос о возможных функциях исследуемых белков, и позволяет предполагать существование эволюционной взаимосвязи между этими организмами [8]. В настоящем обзоре сделана попытка проследить ход исследований последних лет, которые несомненно внесли существенный вклад в выяснение функции и механизма биологической активности периферических БД рецепторов.

R. sph. 1	M N M D W A L F L T F L A A C G A P A T T G A L L K P D E - - W Y D N L N K P W W N P	41
R. caps. 1	M S L T L F A V Y F V A C A C A - - G A T G A I F S P G A - - W Y D S L K K P S W V P	39
Rat 1	M S Q S W V P A V G L T L V P S L G C F V R G E G L R W Y A S L Q K P S W H P	44
Human 1	M A P P W V P A M G F T L A P S L G C F V G S R R F V H G E G L R W Y A S L Q K P S W H P	44
Bovine 1	M A P P W V P A V G F T L L P S L G G F L G A Q Y T R G E G F R W Y A S K Q K P P W H P	44
Mouse 1	M P E S W V P A V G L T L V P S L G G E M G A Y F V R G E G L R W Y A S L Q K P S W H P	44
R. sph. 42	P R W V F - P L A W T S L Y F L M S L A A M R V A Q L E G S G Q A L A F - - Y A A	79
R. caps. 40	P N W L F - P V A W S T L Y I L M S I S A A R V S G L - A M E N E L A V L G L A F W A V	81
Rat 45	P R W T L A P - I W G T L Y S A M G Y G S Y I I W K E L G G F T E E A M V P L G L Y T G	87
Human 45	P H W V L G P - V W G T L Y S A M G Y G S Y L V W K E L G G F T E K A V V P L G L Y T G	87
Bovine 45	P R W I L A P - I W G T L Y S A M G Y G S Y M I W K E L G G F S K E A V V P L G L Y A G	87
Mouse 45	P R W T L A P - I W G T L Y S A M G Y G S Y I V W K E L G G F T E D A M V P L G L Y T G	87
R. sph. 80	O L A F N T L W T P V F F G M K R M A T A - L A V V M V M W L F V A A T M W A F F Q L D	122
R. caps. 82	O I A V N T L W T P I F F G L H R L A G G M L V L V L L - W L S V F A T C V L F W S V D	124
Rat 88	O L A L N W A W P P I F F G A - R Q M G W A L V D L M L V S G V A T A T T L A - W H R V	129
Human 88	O L A L N W A W P P I F F G A - R Q M G W A L V D L L L V S G A A A T T V A - W Y Q V	129
Bovine 88	O L A L N W A W P P L F F G T - R Q M G W A L V D L L L T G G M A A T A M A - W H Q V	120
Mouse 88	O L A L N W A W P P I F F G A - R Q M G W A L A D L L L L V S G V A T A T T L A - W H R Y	129
R. sph. 123	T W - A G V L F V P Y L I W A T A A T F L N F E A M R L N W N R P E A R A - -	158
R. caps. 123	- W L S G L M F V P Y V I W V T V A G A L N F S V W R L N P G E K P I T L	160
Rat 130	S P P A A R L L Y P Y L A W L A F A T M L N Y Y V W R D N S G R R G G S R L T E	169
Human 130	S P L A A R L L Y P Y L A W L A F A T T L N Y C V W R D N H G W H G G R R L P E	169
Bovine 130	S P P A A C L L Y P Y L A W L A F A G M L N Y R M W D D N Q V R R S G R R L S E	169
Mouse 130	S P P A A R L L Y P Y L A W L A F A T V L N Y V W R D N S G R R G G S R L P E	169

Рис. 1. Сравнение аминокислотных последовательностей бактериальных (TspO, CrtK) и митохондриальных бензолиазелиновых репетторов. R. sph. — *R. sphaeroides*; R. caps. — *R. capsulatus*; Rat — МБР крысы; Human — МБР человека; bovine — бычий МБР; mouse — МБР мыши. Подчеркнуты предполагаемые трансмембранные домены.

II. ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БЕНЗОДИАЗЕПИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Вскоре после обнаружения МБР в периферических тканях стало очевидно, что их специфичность существенно отличается от специфичности рецепторов центрального типа (ГАВА-рецепторов) [102]. В то время, как диазепам (валиум) связывался приблизительно одинаково с обоими классами рецепторов, другие бензодиазепины проявляли существенную селективность, преимущественно взаимодействуя с рецептором либо центрального, либо периферического типа, что позволило обнаружить значительные отличия в характеристиках связывания данных соединений. Например, 4'-хлорпроизводное диазепама (Ro5-4864) связывалось с высоким сродством с МБР крысы, и лишь с малым (микромольным) сродством, с ГАВА рецептором [86]. Обнаружение лигандов, селективно связывающихся с тем или иным классом рецепторных сайтов послужило важной предпосылкой, облегчившей более подробное изучение МБР.

Несколько лет спустя после обнаружения МБР, был открыт другой класс лигандов, структурно отличных от бензодиазепинов, которые селективно и с более высоким сродством связывались с МБР. К этому классу относятся несколько соединений, содержащих 2-фенил-изохинолиновую группировку с алкилированной амидной боковой цепочкой. Соединение РК11195, относящееся к этому классу, получило наибольшее распространение при исследовании митохондриальных рецепторов [60].

Связывание изохинолинкарбоксамидов и бензодиазепинов на МБР млекопитающих было подробно охарактеризовано в ряде работ [7, 10]. РК11195 полностью вытеснял Ro5-4864 из комплекса с рецептором [40].

В то время, как бензодиазепины и изохинолин карбоксамиды являются наиболее широко распространенными лигандами из обладающих сродством к МБР, известны и другие группы соединений, проявляющих высокое сродство к МБР. К этой группе относятся два стереоизомера хинолин-пропанамида, известные под названием (-)РК14067 и (+)РК14068. Соединение с (-) конфигурацией обладает сродством к МБР на два порядка более высоким, чем его энантиомер [29]. Такая стереоселективность позволяет использовать указанные соединения в тестах на присутствие МБР.

Другой группой соединений, родственных БД по фармакологическому спектру действия и сродству к рецептору, являются имидазопиридины. Несколько соединений этой группы связываются с ГАВА-рецептором с наномольным сродством. Имидазопиридин алпидем связывается с МБР с очень высоким (пикомольным)

сродством, тогда как константа диссоциации комплекса алпидема и GABA-рецептора, по крайней мере, на два порядка выше [58]. Связывание алпидема с МБР происходит с очень высоким сродством, характерным для препаратов МБР из многих тканей млекопитающих, включая ткани человека, крысы, коровы и мыши. В то же время, сродство бензодиазепинов к МБР значительно варьирует в зависимости от организма и ткани [84].

III. МОЛЕКУЛЯРНАЯ СТРУКТУРА МБР

В ранних исследованиях молекулярной структуры МБР широко использовали метод радиационной инактивации, с помощью которого было найдено, что молекулярный вес белка, связывающего РК11195, близок к 23 кДа [26]. Другой группой исследователей, изучавшей участок связывания Ro5-4864, молекулярный вес рецептора определен в районе 34 кДа [79].

В последующих работах использование химических зондов для ковалентного мечения МБР привело к более точной идентификации белков, образующих этот рецептор. Особенно эффективным оказался метод фотоаффинной пробы изохинолин-карбоксиамида РК14105 (рис. 2), флюоронитропроизводного РК11195 [27]. Надо отметить, что параметры связывания РК14105 и РК11195 (и, как позднее было установлено, сайты их связывания) были почти идентичны. После облучения ультрафиолетом РК14105 ковалентно связывался с белком весом около 18 кДа. Фото-мечение этого белка конкурентно ингибировалось другими лигандами, а степень ингибирования коррелировала с относительным сродством этих лигандов к МБР. В разных лабораториях этот белок получил различные названия, но в настоящее время наиболее распространенным и устоявшимся названием является rk18, что указывает на размер полипептида, ковалентно меченного с помощью РК14105.

Идентификация rk18 послужила исходным пунктом для дальнейшего изучения молекулярных характеристик этого рецептора. rk18 был выделен в виде ковалентного комплекса с меченым тритием РК14105 [5, 70, 82]. Секвенирование очищенного полипептида rk18 привело к идентификации его частичной аминокислотной последовательности. Впоследствии были клонированы κДНК, кодирующие rk18, рецептор крысы [92], человека [21, 83], коровы [77] и мыши [38, 95]. Гомологи rk18 из этих видов характеризовались высокой степенью сродства (приблизительно 80% идентичных или консервативных аминокислотных замен). Уровни мРНК, определенные с помощью блот-анализа различных тканей, коррелировали с плот-

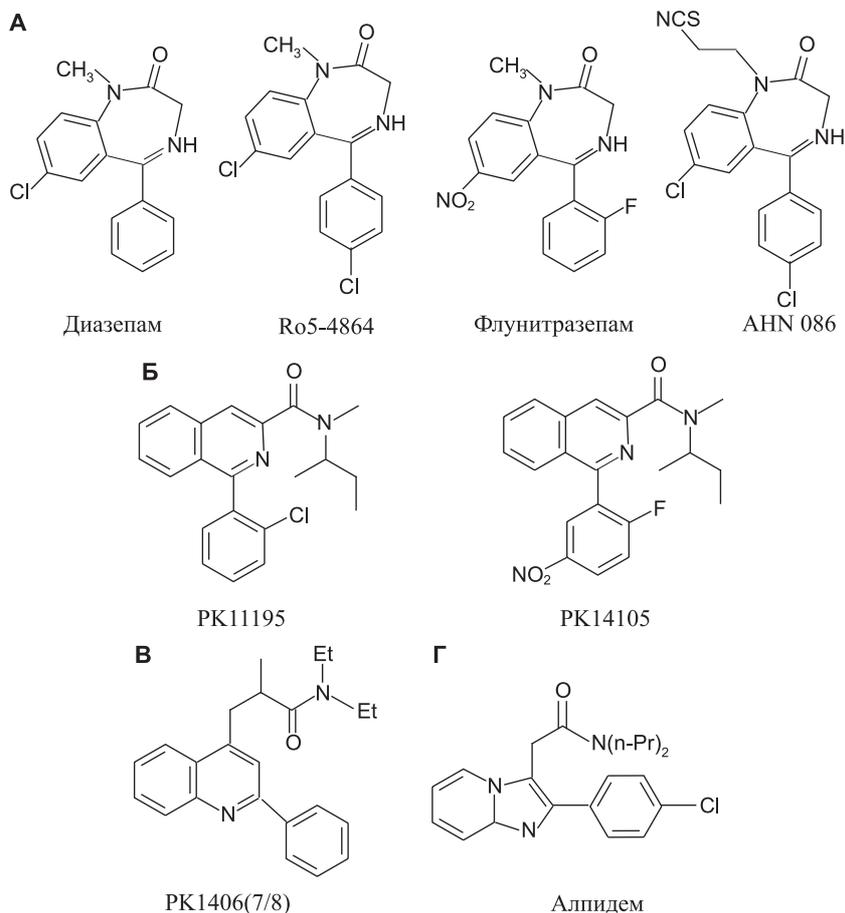


Рис. 2. Структуры некоторых лигандов МБР (пояснения в тексте).

А) Бензодиазепины, Б) Isoхинолин карбоксамиды, В) Хиноолин пропанамиды, Г) Имидазопиридин.

ностью рецептора в этих тканях, определенной с помощью радиоавтографии [77].

Молекулярные характеристики этого рецептора изучали, экспрессируя клонированную кДНК в клеточных линиях млекопитающих, а также в клетках дрожжей. Так, было установлено, что клеточные линии коровы, крысы или мыши, трансфецированные кДНК, кодирующей рк18, экспрессировали участки связывания, обладавшие таким же сродством к бензодиазепиновым лигандам и изохи-

нолин-карбоксамидам, что и рецепторы дикого типа, выделенные из этих тканей. Так, например, было установлено, что экспрессия κДНК крысы и мыши приводит к появлению сайтов связывания с высоким сродством к РК11195 и Ro5-4864 [92, 95, 96], тогда как экспрессия κДНК коровы приводила к появлению сайтов высокого сродства к РК11195, но не Ro5-4864 [78]. Экспрессия κДНК, кодирующей рк18 человека в дрожжах *S. cerevisiae* приводила к появлению центров связывания изохинолин-карбоксамидов, характеризующихся такими же параметрами связывания бензодиазепиновых лигандов, что и рецепторы, выделенные из клеточных линий человека [83]. Надо отметить, что клетки дрожжей не экспрессируют сайты связывания лигандов МБР. Поэтому результаты этой работы дают основание заключить, что экспрессия рк18 является необходимым и достаточным условием для образования сайтов связывания изохинолинкарбоксамидов.

Хотя из описанных выше наблюдений нельзя было установить точную локализацию участков связывания РК11195 и Ro-4864 на рк18, представляется очевидным, что рк18 играет определяющую роль в связывании лигандов с МБР. Один из возможных альтернативных механизмов активности рк18 может заключаться в индукции конформационных изменений в другом белковом компоненте рецепторного комплекса, которые могли бы приводить к образованию нового (или модификации существующего) участка связывания [56]. В то же время, результаты фотоаффинного мечения РК14105 указывают на локализацию участков связывания изохинолин-карбоксамидов непосредственно на рк18.

В работе [33] экспрессировали гибридную κДНК (гибрид рк18 человека и быка) в клетках дрожжей *S. cerevisiae*. Было установлено, что участок связывания бензодиазепинов, характеризующийся низким сродством, локализован в последовательности, образованной 25 С-концевыми аминокислотными остатками бензодиазепинового рецептора из клеток быка. Это подтверждает вывод о том, что рк18 представляет собой БД-связывающий рецептор. В другом исследовании было показано, что экспрессированный в *E. coli* рк18 мыши способен связывать РК11195 с высоким сродством [39].

Исследования аминокислотной последовательности рк18 показали, что он является чрезвычайно гидрофобным белком, содержащим повышенное количество остатков триптофана, и имеющим катионный характер (изоэлектрическая точка около 9,6). Компьютерный анализ предсказывает наличие пяти гидрофобных доменов в составе рк18, которые потенциально способны пронизывать липидный бислой мембраны. Участок, подверженный ковалентной модификации под

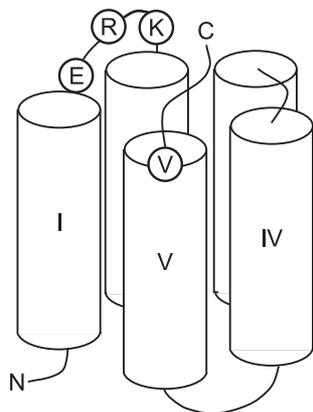


Рис. 3. Модель структурной организации митохондриального бензодиазепинового рецептора.

действием РК14105, по-видимому находится в N-концевой части белка [82].

С целью идентификации специфических аминокислотных остатков, ответственных за вид-специфическое взаимодействие этого рецептора с бензодиазепиновыми лигандами, было проведено детальное исследование с использованием метода сайт-специфического мутагенеза [33]. Были синтезированы мутантные формы МБР человека, содержащие делеции в С- и N-концевых участках, а также с несколькими точечными мутациями, сосредоточенными, по-видимому, в цитоплазматической области этого рецептора. Полученные мутантные белки экспрессировали в клетках дрожжей *S. cerevisiae*, и изучали

их связывание с бензодиазепиновыми лигандами РК11195 и Ro5-4864. Делеция тринадцати С-концевых аминокислот из последовательности рк18 не оказывала влияния на параметры связывания обоих лигандов, тогда как удаление двадцати N-концевых аминокислотных остатков приводило к возрастанию кажущейся константы диссоциации комплекса с БД в 5–10 раз. Были выявлены четыре аминокислотных остатка, принимающих, вероятно, участие в связывании бензодиазепина Ro5-4864, а именно, Glu-29, Arg-32, Lys-39 и Val-154. Три из них очевидно локализованы в регионе, расположенном между первым и вторым трансмембранными доменами, в составе первой цитоплазматической петли (рис. 3). Эти остатки присутствуют в последовательностях рецептора человека, крысы, коровы и мыши. Остаток Val-154, локализованный в пятом трансмембранном домене, на границе липидного бислоя и цитоплазмы в рецепторах человека, мыши и крысы, замещен в последовательности рк18 коровы на остаток метионина. Замена Met-154 на Val-154, произведенная с помощью сайт-специфического мутагенеза в рк18 коровы, привела к появлению в этом мутантном белке сайта связывания Ro5-4864, который отсутствует в белке дикого типа. В то же время, было показано, что аминокислотные остатки Glu-29, Arg-32, Lys-39 и Val-154 не участвовали в связывании изохинолинкарбоксиамида.

Детальное исследование топологии МБР, экспрессированного в клетках дрожжей, было проведено в работе [48]. Компьютерный анализ последовательности рк18 предсказывал наличие 5 трансмембран-

ных доменов в этом гидрофобном белке, с N-концевой петлей, находящейся в межмембранном пространстве митохондрии, и C-концевой частью – в цитоплазме. Предсказанные структурные характеристики были экспериментально исследованы несколькими методами. А). С помощью PCR-мутагенеза последовательность аминокислот, составляющих с-Мус-эпитоп, была встроена в участки рк18, предположительно находящимися либо в цитоплазме, либо в межмембранном пространстве митохондрии. Полученный гибридный белок был экспрессирован в клетках *S. cerevisiae*, и локализация с-Мус эпитопа определена с помощью иммунодетекции моноклональными анти-с-Мус антителами; Б). Остатки цистеина были введены в последовательность белка методом сайт-специфического мутагенеза, с последующей детекцией с помощью флуоресцентных зондов, специфически реагирующих с SH-группами. Использование двух видов флуоресцентных зондов (гидрофильных и липофильных) позволило идентифицировать остатки цистеина, расположенные как в гидрофильных участках белка, так и погруженных в липидный бислой. Полученные результаты в целом подтвердили описанную выше компьютерную модель, с некоторыми существенными модификациями. В отличие от компьютерной модели, предсказавшей относительно короткие α -спиральные участки, пронизывающие фосфолипидный монослой, результаты [48] позволяют сделать вывод о наличии более длинных α -спиральных участков, пронизывающих весь мембранный бислой, с соответственно более короткими гидрофильными цитоплазматическими и периплазматическими участками.

Гены, кодирующие рк18, были клонированы и охарактеризованы из тканей крысы [17] и человека [63]. В обоих организмах этот ген содержит четыре экзона, и расположение всех трех интронов идентично. Характерной особенностью этого гена является то, что первый интрон, который прерывает 5'-нетранслируемую последовательность, имеет протяженность 8 тыс. п.н. в хромосоме крысы, и 6 тыс. п.н. – у человека, что составляет более 60% протяженности первичного транскрипта. Предполагается, что этот интрон содержит элементы, вовлеченные в транскрипционную регуляцию этого гена.

Анализ мРНК в тканях крысы, человека и быка указывает на то, что только один вид мРНК гибридизуется с пробой – кДНК рк18. Впоследствии появилось сообщение о существовании другого транскрипта, значительно более короткого, и более распространенного, чем нормальный транскрипт [63]. Секвенирование этой вновь открытой мРНК установило, что она является продуктом альтернативного сплайсинга и делетирования экзона № 2 из последовательности мРНК. Эксперименты по трансфекции клеточных линий этой

укороченной версией кДНК не привели к появлению БД-связывающей активности. В связи с этим вопрос о биологической функции этого альтернативного сплайсинга остается открытым.

ДРУГИЕ БЕЛКИ, СВЯЗАННЫЕ С МБР

Помимо РК14105, ряд других алкилирующих проб использовался для изучения возможности ковалентного и специфического мечения белков, ассоциированных с МБР. Флунитразепам представляет собой фотоаффинный бензодиазепиновый лиганд, успешно применяемый при идентификации белков, входящих в состав ГАВА-рецепторов [97]. Сродство флунитразепама к МБР было почти на два порядка выше, чем к ГАВА рецепторам. Сообщалось об идентификации белка порядка 32–34 кДа в митохондриальных фракциях, обработанных флунитразепамом [67, 91]. Интересно отметить, что изохинолин карбоксамид РК14105 также ковалентно связывался с белком 30 кДа, что позволяет предполагать существование тесной ассоциации этого белка с участком связывания изохинолин карбоксамидов.

С целью идентификации белков, ассоциированных с МБР, использовалось также производное Ro5-4864, АНН-086 (рис. 2). Установлено, что АНН-086 в наномолярных концентрациях конкурентно ингибировал связывание РК11195 и Ro5-4864. В концентрациях 1 мкМ АНН-086 необратимо блокировал связывание обоих лигандов. Аналогичные результаты были получены для необратимого ингибирования связывания РК11195 и Ro5-4864 изотиоцианатным производным РК11195 [71].

В работе [66] изучали химическое взаимодействие алкилирующего агента – меченного АНН 086 с митохондриальными мембранами. Изохинолиновые лиганды РК11195 и Ro5-4864 не препятствовали включению меченого изотиоцианата в митохондриальные мембраны крысы. Разделение мембранных белков с помощью электрофореза привело к идентификации белка с молекулярной массой 30 кДа, ковалентно меченного изотиоцианатом. В то же время, включения радиоактивности в мембранные белки из митохондрии быка не было обнаружено, что подтверждает низкое сродство бычьего МБР к бензодиазепинам.

Попытки выделить МБР в виде нативного комплекса привели к очистке комплекса трех белков из митохондрий почек крысы, причем связывание РК11195 и Ro5-4864 этим комплексом не нарушалось [67]. Было также установлено, что одним из компонентов этого комплекса является рк18, а два других белка (размером 30–32 кДа) представляли собой митохондриальный транспортный белок, участвующий в транспорте анионов (VDAC) и транспорте адениновых

нуклеотидов (ANC). Дальнейшие попытки субфракционирования этого комплекса приводили к потере изохинолин-связывающей активности. Исследования стехиометрии комплекса этих трех белков в очищенной изохинолин-карбоксамид-связывающей фракции показали, что VDAC и переносчик АТФ/АДФ присутствовали в значительном молярном избытке по отношению к рк18. Полученные результаты указывали, что большая часть молекул VDAC не может находиться в физическом контакте с рк18 в этом комплексе [68]. В самом деле, уровни рк18, определенные на основании связывания с радиоактивным РК11195, значительно варьируют в зависимости от типа ткани или клеточной линии, в то время как VDAC и ANC присутствуют в значительном избытке в митохондриальных препаратах из всех исследованных тканей. В связи с этим выдвигалось предположение, что рк18 ассоциирован с этими белками в качестве аксессуарного компонента [105]. Не следует пренебрегать также возможностью того, что в связи с высокими содержанием белков VDAC и ANC в митохондриальных мембранах возможно их неспецифическое кофракционирование в ходе очистки их комплекса с рк18.

Гипотеза о возможной ассоциации рк18 с VDAC инициировала серию исследований с применением методов молекулярной биологии. кДНК рк18 мыши была субклонирована в экспрессионный вектор с образованием фьюжна с белком, связывающим мальтозу. Очищенный гибридный белок проявлял РК11195-, но не Ro5-4864-связывающую активность. Очищенный препарат VDAC в комбинации с гибридным белком рк18 и белком связывания мальтозы были встроены в состав липосомы, причем полученный комплекс проявлял Ro5-4864-связывающую активность [39]. Эти наблюдения позволяют предположить, что ассоциация рк18 с VDAC является необходимой для проявления БД-связывающей активности. В то же время, следует принять во внимание несколько важных соображений относительно надежности описанных выше результатов. Для связывания Ro5-4864 значение V_{max} было приблизительно в 100 раз ниже, чем для РК11195. Ro5-4864 полностью вытеснял РК11195 из комплекса с рк18-VDAC, но показатель IC_{50} не превышал 1 мкМ (в отличие от наномолярных величин сродства этого БД к рк18, определенному с помощью Скэтчард-анализа). Кроме того, присутствие белка, связывающего мальтозу, присоединенного к N-концевой части рк18, может приводить к необычным конформационным изменениям в рк18, влияние которых на связывание бензодиазепинов и изохинолин-карбоксамида может различаться. Ранее было убедительно показано, что связывание БД чрезвычайно чувствительно к химическим и физическим изменениям рецептора, поэтому отсутствие активности

в отношении Ro5-4864 в рекомбинантном белке может свидетельствовать о такой избирательности связывания. В то же время, добавление VDAC к комплексу может приводить к стабилизации БД-связывающей конформации рекомбинантного белка.

В более поздних исследованиях было установлено, что помимо VDAC, другой белок, с молекулярной массой около 10 кДа, обозначенный rk10, может находиться в тесной ассоциации с МБР [14]. Он специфически связывал фотоаффинную метку – РК14105, проявляя характеристики в отношении этого лиганда, аналогичные фотомечению rk18. Очистка рецепторного комплекса в неденатурирующих условиях, а также иммуноаффинная преципитация свидетельствуют о тесной ассоциации rk18 и rk10. Частичная аминокислотная последовательность rk10 указывает на отсутствие гомологии с известными белками, а роль, выполняемая им в мембранном комплексе с МБР, в настоящее время неизвестна.

Другим предполагаемым партнером МБР является недавно открытый МБР-ассоциированный белок (PRAХ-1), существование которого было выявлено методом двухгибридного скрининга в дрожжах [37]. PRAХ-1 представляет собой цитоплазматический белок 240 кДа, несколько доменов которого, как предполагается, могут быть вовлечены в белок-белковые взаимодействия. PRAХ-1 взаимодействует с МБР в стехиометрии 1:2. Физиологическая роль PRAХ-1 в настоящее время неизвестна, хотя выдвигалось предположение, что он участвует в доставке лигандов или партнеров МБР к сайту локализации МБР во внешней мембране митохондрий.

Результаты исследований последних лет указывают, что МБР является важным компонентом так называемых митохондриальных пор (МРТР), расположенных на сайте контакта между внутренней и внешней мембранами митохондрии, в критической точке метаболической координации между цитозолем, межмембранным пространством митохондрии и матриксом [18] (рис. 4). МРТР участвует в регуляции концентрации ионов кальция, рН, межмембранного потенциала и объема митохондрии, выполняя функцию переносчика ионов Са, а также трансмембранного рН и редокс-канала с низкой ионной селективностью. Открытый канал диаметром около 2,0–2,6 нм обеспечивает транспорт соединений с молекулярной массой до 1,5 кДа.

Хотя состав комплекса МРТР точно еще не установлен, но предполагается [18], что он включает шесть компонентов, которые либо участвуют в образовании поры, либо – в регуляции ее активности: 1) гексокиназа, локализованная в цитозоле; 2) VDAC (митохондриальный порин) во внешней мембране; 3) креатинкиназа в межмем-

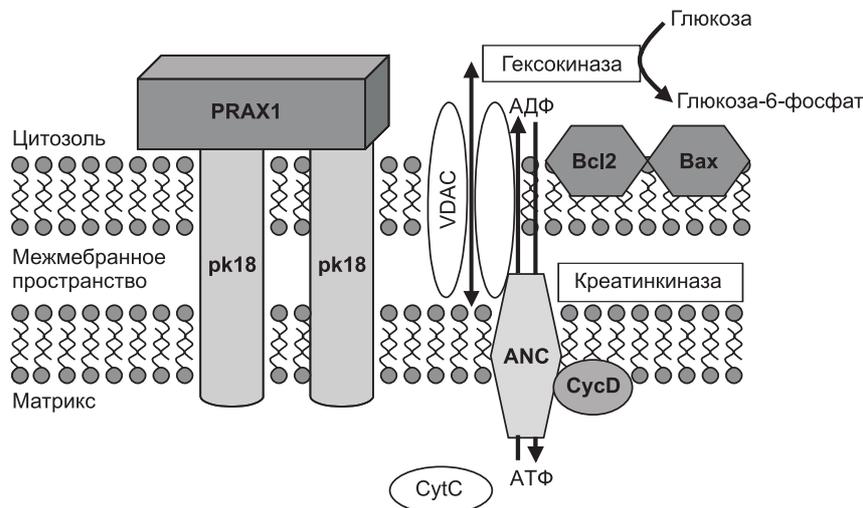


Рис. 4. Модель структурной организации митохондриальной поры. Белки Bcl-2 и Вах, являющиеся, соответственно, компонентами внешней мембраны и цитозоля, ассоциированы с МБР и принимают участие в апоптозе, контролируя высвобождение цитохрома С.

бранном пространстве; 4) переносчик адениновых нуклеотидов во внутренней мембране; 5) циклофилин Д в матриксе; 6) pk18 (рис. 4). Содержание VDAC в митохондрии очень высоко (до 20% от общего количества белков внешней мембраны). В нормальном состоянии канал, образуемый этим белком, открыт для диффузии метаболитов с молекулярной массой < 1 кДа через внешнюю мембрану митохондрии. Переносчик адениновых нуклеотидов является специфическим антипортером, участвующим в обмене АТФ и АДФ, он служит одним из элементов при окислительном фосфорилировании. Гексокиназа катализирует превращение глюкозы в глюкозо-6-фосфат, первоначальный фосфорилированный интермедиат гликолитического пути и важный биосинтетический предшественник многих клеточных структур. Креатинкиназа участвует в синтезе и экспорте в цитозоль фосфокреатина, который затем включается в цикл креатин-фосфокреатин, который участвует в сопряжении энергосоздающих (митохондрия, гликолиз) и энерго-потребляющих процессов (АТФазы).

IV. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ МБР

За время, прошедшее с открытия МБР, несколько исследовательских групп предпринимало попытки выяснить биологическую роль этого рецептора. Хотя до сих пор нет четкого ответа на вопрос о функции этого рецептора в клетках, накопленные данные позволяют с большей или меньшей степенью вероятности утверждать, что МБР принимает участие в ряде важных процессов млекопитающих.

МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ФИЗИОЛОГИЯ И МБР

Основной функцией митохондрии является обеспечение клетки энергией. Несколько лабораторий пытались определить, насколько лиганды МБР влияют на окислительное фосфорилирование. Было показано, что РК11195 и Ro5-4864 в наномолярных концентрациях обладали сходным ингибирующим действием на дыхание митохондрий [44, 59]. Одна из этих групп установила, что активность соединений, воздействующих на митохондриальное дыхание, коррелировала с их сродством к МБР. В частности, было установлено, что этот эффект проявляется в основном в результате снижения скорости потребления кислорода в фазе III и возрастании скорости потребления кислорода в фазе IV. Величина этого эффекта в митохондриях, выделенных из различных тканей, варьировала в зависимости от уровней МБР, характерных для той или иной ткани. Эти результаты указывают на то, что биологический эффект МБР может проявляться на стадии образования АТФ в митохондрии.

Одним из наиболее вероятных механизмов воздействия МБР на митохондриальное дыхание является его влияние на транспорт метаболитов в матрикс митохондрии. Вероятная ассоциация МБР с VDAC указывает на возможный механизм этого эффекта. В одной из работ указывалось, что РК11195 и Ro5-4864 в наномолярных концентрациях ингибировали функцию по крайней мере двух транспортных каналов в препаратах митопластов сердца [51]. В то же время, значительно более высокие концентрации клоназепама, флумазенила и бензодиазепинов с низким сродством к МБР, требовались для ингибирования функции этих каналов. Эти результаты могут служить подтверждением сделанного ранее вывода о тесной ассоциации МБР с VDAC.

Несомненный интерес представляет сообщение о том, что наномолярные концентрации РК11195 и Ro5-4864 индуцировали значительные морфологические изменения в митохондриях клеток глиомы [88]. Также отмечалось, что деление митохондрий и γ -ДНК-полимеразная активность, специфическая для репликации митохондриальной ДНК, стимулировались этими лигандами [13].

Возможная ассоциация МБР и переносчика адениновых нуклеотидов изучалась с использованием различных субстратов и ингибиторов этого транспортного белка. В работе [31] указывалось, что связывание Ro5-4864 с митохондриальной фракцией из тканей крысы ингибировалось α , β -метилен-АТФ и карбоксиатрактилозидом, двумя ингибиторами переносчика адениновых нуклеотидов, причем максимальное ингибирование составляло около 60%. В последующих исследованиях, проведенных на митохондриях из тканей человека, ингибирующего действия на функции переносчика адениновых нуклеотидов под действием этих лигандов не было обнаружено [32].

МБР И БИОСИНТЕЗ ГЕМА

В ранних исследованиях по идентификации возможных эндогенных лигандов МБР, в очищенной активной бензодиазепин-связывающей фракции были выявлены соединения порфириновой природы [98]. Причем протопорфирин IX оказался наиболее активным в качестве конкурентного ингибитора связывания лигандов МБР (константа ингибирования около 7–10 нМ). Было также установлено, что другие ди-карбоксильные порфирины, в том числе мезопорфирин IX и дейтеропорфирин IX, а также гем значительно ингибировали связывание РК11195, в то время как продукты катаболизма гема – линейные тетрапирролы – проявляли активность в значительно более высоких, микромолярных концентрациях [99]. Метаболические предшественники порфиринов также не проявляли активности в качестве лиганда МБР, не вытесняя РК11195 из комплекса с МБР [73]. В связи с тем, что поздние стадии биосинтеза гема осуществляются в митохондриях, было выдвинуто предположение, что МБР может участвовать в транспорте интермедиатов биосинтеза гема и порфиринов. Возможно, что этот транспорт осуществляется с участием VDAS.

Если МБР играет центральную роль в биосинтезе гема, можно ожидать, что уровни этого рецептора будут относительно высокими в дифференцирующих ретикулоцитах. Это предположение проверялось на примере эритролейкемических клеток мыши MEL, синтез гема в которых был индуцирован. В ходе индукции уровень МБР возрос лишь незначительно (1,8 раза) по сравнению с ферментами синтеза порфиринов [95]. В то же время, нельзя не отметить, что в других типах клеток, не участвующих, в отличие от ретикулоцитов, в образовании гема, уровень МБР может быть значительно выше. Исходя из этого можно предположить, что лишь незначительные количества МБР требуются для выполнения его функции в регуляции биосинтеза гема.

В ряде работ, посвященных биосинтезу гема и его предшественников в клетках животных указывалось на возможность участия митохондриальных рецепторов в этих процессах [81, 95; 96]. Биосинтез гема в животных клетках происходит, как установлено в настоящее время, следующим образом (рис. 5). Общий предшественник тетрапиррольных пигментов, 5-аминолевулиновая кислота (5-АЛК) образуется в митохондриях в результате конденсации глицина и сукцинил-коэнзима А, катализируемой АЛК-синтазой. 5-АЛК затем экспортируется в цитоплазму, где 2 молекулы 5-АЛК конденсируются с образованием порфобилиногена. Последовательная конденсация четырех молекул порфобилиногена, и последующие структурные перестройки образованного тетрапиррола приводят к синтезу уропорфириногена III, содержащего 8 карбоксильных групп, расположенных на периферии макроцикла. Декарбоксилирование уропорфириногена III под действием уропорфириноген III-декарбоксилазы приводит к образованию копропорфириногена III, который затем транспортируется обратно в митохондрию, где он претерпевает окислительное декарбоксилирование под действием копропорфириногенаоксидазы, с образованием протопорфириногена. Дальнейшее окисление протопорфириногена под действием протопорфириногенаоксидазы приводит к образованию протопорфирина IX. Fe-хелатаза катализирует встраивание атома железа в молекулу протопорфирина, и образование гема [1, 35, 43, 90].

Рибайц и коллеги [81] установили, что одной из лимитирующих скорость энергозависимых стадий биосинтеза порфиринов как в нормальных, так и лейкоэмических Т-клетках является транспорт копропорфириногена в митохондрию. Этот вывод был сделан на основании того, что образование протопорфириногена из копропорфириногена стимулировалось при добавлении экзогенной АЛК. В то же время, детальные исследования механизма активности копропорфириногенаоксидазы не указывали на то, что этот процесс носил энергозависимый характер [90]. Отсюда было сделано предположение, что стимуляция конверсии копропорфириногена в протопорфириноген под действие экзогенной АТФ может быть связана с увеличением транспорта копропорфириногена в митохондрию. При этом также предполагалось (однако без экспериментальных доказательств), что митохондриальный бензодиазепиновый рецептор может участвовать в регуляции этого транспорта. Рибайц и коллеги даже предположили, что МБР сам может образовывать поры во внешней мембране митохондрий.

РОЛЬ МБР В БИОСИНТЕЗЕ СТЕРОИДОВ

Одной из наиболее подробно охарактеризованных функций МБР является его роль в биосинтезе стероидов [18, 55, 76]. В ряде исследований было установлено, что клетки, принимающие участие в стероидогенезе, характеризовались наиболее высокими плотностями сайтов связывания МБР лигандов, причем относительное сродство ряда бензодиазепиновых лигандов к МБР коррелировали с их потентностью в стимуляции стероидного биосинтеза [4, 25].

Механизм стимуляции стероидогенеза под действием лигандов МБР представляет собой значительный интерес. Одна из начальных стадий биосинтеза стероидов – превращение холестерина в прегненолон. Эта реакция происходит на внутренней митохондриальной мембране, и катализируется цитохромом P-450_{sec}. Адренородоксин и адренородоксинредуктаза являются частью электрон-транспортной цепи, позволяющей цитохрому P-450_{sec} осуществлять окислительное расщепление боковой цепи холестерина. Детальные исследования установили, что реакция, катализируемая P-450_{sec} не является скоростью-лимитирующей в биосинтезе стероидов. С другой стороны, скорость транспорта холестерина на внутреннюю мембрану митохондрии по-видимому, определяет скорость синтеза этих соединений [89]. Было установлено, что транслокация холестерина между внешней и внутренней митохондриальными мембранами представляет собой один из наиболее критических этапов, регулирующих биосинтез стероидов. Гормоны гипофиза, адренкортикотропин и гонадотроин, воздействуют на клеточные механизмы, облегчающие эту транслокацию [93].

Анализ процесса конверсии холестерина в прегненолон с использованием бензодиазепиновых и изохинолин-карбоксамидных соединений показал, что лиганды МБР ускоряли внутримитохондриальную транслокацию холестерина с внешней на внутреннюю мембрану [54]. Эти результаты позволили предположить, что МБР участвует в транспорте холестерина внутри митохондрии, и что этот транспорт, вероятно, происходит в месте соприкосновения двух мембран (как и в случае многих других митохондриальных транспортных процессов). Стимуляция стероидогенных клеток гормонами гипофиза снижала относительную величину эффекта лигандов МБР на стероидный биосинтез [57], очевидно, гормонами активировался тот же самый процесс, в регуляции которого участвует МБР. Было показано, что бензодиазепин флуразепам ингибировал гормональную стимуляцию стероидогенеза на 50-60% в результате связывания с МБР [75]. Эти результаты указывают на сопряжение МБР с физиологическими механизмами, вовлеченными в регуляцию образования стероидов.

Молекулярные механизмы, лежащие в основе интрамитохондриального транспорта холестерина под действием МБР, являются предметом интенсивных исследований. Была предложена теоретическая модель участия рк18 в транслокации холестерина через митохондриальные мембраны [12], которая позднее подтвердилась после идентификации аминокислотной последовательности в рк18, участвующей в связывании холестерина [61]. Было показано, что пептид, содержащий сайт узнавания холестерина в последовательности рк18, ингибировал синтез стероидов в ответ на стимуляцию под действием цикло-АМФ в трансдуцированных клетках Лейдига МА-10 [62]. Далее, было установлено, что регуляторный белок, необходимый для транслокации холестерина с внешней на внутреннюю митохондриальную мембрану, ассоциирован с МБР [103, 104].

РОСТ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКА КЛЕТОК

Большинство ранних работ по исследованию возможных клеточных функций МБР было проведено в исследовательском центре Roche, в распоряжении которого имелся большой набор производных бензодиазепинов. Исследовались эффекты БД на целый ряд клеточных процессов, включая подавление дифференцировки эритролейкемических клеток Фрейнда, индукцию орнитиндекарбоксилазы, ингибирование роста нейрита в клетках РС12 и возрастание экспрессии протоонкогена *c-fos* при воздействии на клетки РС12 фактора роста нейронов [20, 69, 101]. Было показано, что наномолярные концентрации РК11195 и Ro5-4864 приводили к ускорению клеточного роста или синтеза ДНК в клетках Лейдига, С6 глиомы и 3Т3 [39, 47]. Ускорение синтеза ДНК может быть, по крайней мере, частично отнесено за счет стимуляции митохондриального γ -комплекса ДНК-полимеразы [80]. В то же время, микромолярные концентрации бензодиазепиновых лигандов ингибировали включение тимидина в ДНК, что, вероятно, свидетельствует о снижении специфичности стимуляции синтеза ДНК более высокими концентрациями бензодиазепинов.

УЧАСТИЕ МБР В ИММУННОМ ОТВЕТЕ

По сообщениям нескольких лабораторий бензодиазепиновые лиганды оказывают действие на различные активности иммунной системы. В одной из ранних работ было показано, что суб-наномолярные концентрации Ro5-4864 индуцировали хемотаксис моноцитов человека [85]. Более поздние исследования *in vivo* продемонстрировали, что РК11195 и Ro5-4864 увеличивали гуморальный иммунный ответ, в то время как БД, специфичные для GABA рецептора, не оказывали подобного эффекта. Стимуляция иммунного ответа обус-

ловлена, по-видимому, нарушением функции МБР в макрофагах. Последующие работы *in vivo* подтвердили, что секреция макрофагами интерлейкинов 1 и 6, и фактора некроза опухолей были значительно снижены в результате воздействия лигандов МБР [113, 114].

Генерация супероксид-радикалов фагоцитами подвержена воздействию низких концентраций бензодиазепиновых лигандов [114]. Результаты другого исследования также указывают на значительное снижение уровней МБР в нейтрофилах больных хронической грануломой, наследственным заболеванием, связанным с недостатком цитохрома b_{558} , необходимого для генерации супероксид-радикалов в фагоцитах [115].

РОЛЬ МБР В АПОПТОЗЕ

Помимо функции поддержания жизнедеятельности клетки, МБР также непосредственно участвует в процессах деградации и гибели клетки, и, по-видимому, является одним из важных участников апоптоза. Было показано [45], что РК11195 повышает чувствительность клеток к стимулам, индуцирующим клеточную гибель (апоптоз), включая нарушения структуры ДНК, сопряжение глюкокортикоидного рецептора и церамида, а также может препятствовать супрессии апоптоза под действием белка Bcl-2 (белки, относящиеся к семейству Bcl-2 ингибируют выход цитохрома *c* из митохондрии). Отмечено также, что РК11195 индуцировал коллапс трансмембранного потенциала и деградацию митохондрий в лейкемических клетках HL60, а HR11195 индуцировал синтез перекиси водорода, который не ингибировался ни трансфекцией Bcl-2, ни снижением уровня митохондриальной ДНК [34].

Эти и другие исследования указывают, что лиганды МБР регулируют активность мембранного комплекса МРТР (в состав которого входит МБР) в процессе апоптоза [19]. Более того, они дают основания считать, что Ro5-4864 и РК11195, которые являются, соответственно, агонистом и антагонистом МБР, выполняют, соответственно, те же функции в регуляции МРТР. Приведенные в работе [19] результаты также указывают, что МБР участвует в регуляции активности МРТР в ответ на сигналы, индуцирующие апоптоз. Этот вывод был подтвержден в недавно опубликованном исследовании, выполненном на клетках карциномы [94]. Специфические лиганды МБР, FGIN-I-27 и РК11195 последовательно снижали мембранный потенциал митохондрии, активировали каспазу-3, и наконец, индуцировали фрагментацию ДНК. Помимо этого, МБР-специфические лиганды индуцировали остановку клеточного цикла в фазе G1/G0.

ЛОКАЛИЗАЦИЯ И КЛЕТОЧНЫЕ УРОВНИ МБР

Уровень МБР можно достаточно легко измерить с помощью связывания радиоактивно-меченных лигандов, специфичных к этому рецептору. Это обстоятельство было использовано в большинстве работ по изучению корреляции уровней МБР и его клеточных активностей. Секреторные железы (надпочечники, гонады, эпителий и т.д.) характеризуются высокими уровнями МБР (Вmax 8–20 пмоль/мг белка), в то время как в тканях миокарда и почек уровни этого рецептора в 3–4 раза ниже. Уровни МБР в тканях печени и мозга еще ниже. МБР экспрессируется во всех подтипах лейкоцитов крови, но, главным образом, в моноцитах и полиморфоядерных клетках [16].

Помимо основной локализации рецептора на внешней мембране митохондрий, присутствие низких уровней МБР обнаружено и в других клеточных органеллах. Так, МБР найден в клеточной мембране некоторых клеток (например, эритроцитов), не имеющих митохондрий. Сообщается о локализации МБР в ядрах, выделенных из клеток опухоли молочной железы и нескольких клеточных линий [46]. Функции этого вне-митохондриального рецептора в настоящее время не известны.

Уровень МБР модулируется в зависимости от физиологических или патологических условий. Плотность рецептора в эндокринных железах регулируется в ответ на гормональные флуктуации. Так, например, экспрессия МБР флуктуирует в зависимости от менструального цикла, достигая максимума в период овуляции [4]. Концентрация МБР в тканях почек может увеличиваться в результате воздействия фуросемида. Другими модуляторами экспрессии МБР являются интерлейкин-1, допамин, серотонин и норэпинефрин [11].

V. БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ГОМОЛОГИ МБР

Секвенирование кластера генов, участвующих в биосинтезе компонентов фотосинтетического аппарата у протеобактерии *Rhodobacter capsulatus* привело к идентификации ORF160, предположительно кодирующего полипептид из 160 аминокислотных остатков [6]. Сравнение его последовательности с базами данных GeneBank и Swissprot выявило высокую степень гомологии этого гипотетического белка с митохондриальными БД рецепторами [8]. Ген, кодирующий этот полипептид, получил название *criK*, в связи с его локализацией в кластере генов биосинтеза каротиноидов у этой бактерии. Хотя функция этого белка не была установлена, предполагалось, что он принимает участие в биосинтезе каротиноидов, либо как биосинтетический

фермент, либо как аксессуарный белок, связывающий комплекс биосинтетических ферментов с внутренней мембраной этой бактерии.

Это неожиданное открытие инициировало проведение цикла работ по изучению гомолога МБР у родственной пурпурной фотосинтетической бактерии, *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 [2, 49, 109–112, 116, 117]. Секвенирование кластера генов биосинтеза каротиноидов привело к обнаружению гомолога *rk18*, кодирующего гидрофобный полипептид с массой 17 кДа и с необычайно высоким содержанием остатков ароматических аминокислот. В связи с высоким содержанием остатков триптофана (8% от общего количества аминокислот) и, как будет показано далее, его участием в регуляции клеточных процессов в зависимости от факторов внешней среды, этот белок получил название TspO (от англ. tryptophan-rich sensory protein). Сравнение аминокислотных последовательностей TspO и *rk18* млекопитающих выявило необычайно высокую степень гомологии (30–35% идентичных аминокислот и 30–32% консервативных замен) между белками этих организмов. Столь высокая степень гомологии позволила предположить наличие эволюционного и функционального родства между TspO *R. sphaeroides* и *rk18* млекопитающих.

TspO *R. SPHAEROIDES*

Функцию TspO у *R. sphaeroides* изучали с использованием мутантного штамма бактерий *R. sphaeroides* 2.4.1 с инактивированным геном *tspO* (TSPO1), а также штамма, сверх-экспрессирующего TspO с плазмиды [109]. Несмотря на то, что *tspO* расположен в кластере генов биосинтеза каротиноидов, инактивация этого гена не приводила к нарушению синтеза каротиноидных пигментов. Напротив, при определенных условиях синтез каротиноидов, а также бактериохлорофиллов (другой важной группы пигментов, образуемых этой бактерией) возрастал в мутантных клетках по сравнению с клетками дикого типа. В дальнейшем было показано, что TspO является негативным регулятором транскрипции нескольких генов, участвующих в образовании компонентов фотосинтетического аппарата у *R. sphaeroides* (в том числе, генов биосинтеза каротиноидов *crtA* и *crtI*, гена биосинтеза бактериохлорофилла *bchE*, а также *puc*-оперона, кодирующего полипептиды фотосинтетического антенного комплекса LH2). Эффект TspO на экспрессию этих генов был наиболее значительным на стадии перехода бактерий от аэробного роста к анаэробному (фотосинтетическому), что позволяло предположить, что TspO участвует либо в детекции существенного для клеточного метаболизма сигнала (концентрации кислорода или редокс-потенциала) или в передаче этого сигнала на регуляторные транскрипционные факторы.

Экспрессия и локализация TspO

Поликлональные антитела к TspO специфически узнавали этот белок во фракции внешних мембран *R. sphaeroides* [109], аналогично клеточной локализации периферического БД – рецептора во внешней мембране митохондрий. Уровни TspO в клетках варьируют в зависимости от условий роста бактерий: низкие в ходе аэробного роста, возрастают при снижении концентрации кислорода в среде, и достигают максимальных значений в ходе фотосинтетического (анаэробного) роста. Было показано, что экспрессия *tspO* может происходить с участием двух промоторов [2]. Один из промоторов, специфичный для *tspO* и обеспечивающий образование малого транскрипта, расположен в 3'-концевой части гена *crtB*, непосредственно перед участком связывания рибосом. Регуляторные факторы, контролирующие экспрессию с этого промотора, в настоящее время не установлены, однако, показано, что экспрессия с него усиливается в ходе фотосинтетического роста. Другой промотор, контролирующий экспрессию трех генов, *crtI*, *crtB* и *tspO*, ответственный за образование большого транскрипта, контролируется регуляторным фактором PpsR, и активируется в результате снижения концентрации кислорода в среде.

Исследования структуры и механизма активности TspO

Компьютерный анализ аминокислотной последовательности TspO предсказывает наличие пяти трансмембранных доменов, аналогично расположению трансмембранных доменов у рк18. Как и в случае рк18, не удалось выявить ярко-выраженную сигнальную последовательность, ответственную за встраивание этого белка во внешнюю мембрану [109].

Локализация TspO во внешней мембране *R. sphaeroides* и его участие в регуляции экспрессии фотосинтетических генов поставили вопрос о механизме передачи сигнала от TspO на цитоплазматические транскрипционные факторы. С целью идентификации компонентов этого сигнального пути исследовалось участие TspO в регуляции метаболизма тетрапирролов у *R. sphaeroides*. Анализ тетрапиррольных пигментов, аккумулируемых суспензиями покоящихся клеток этих бактерий, показал, что TspO участвует в ингибировании активности копропорфириноген III-оксидазы, ключевого фермента биосинтеза тетрапирролов (рис. 6) [1, 111]. Экспрессия *in trans* гена *hemN*, кодирующего один из изоферментов копропорфириноген III-оксидазы, в клетках дикогаута мутанта TSP01, а именно, снижению транскрипции

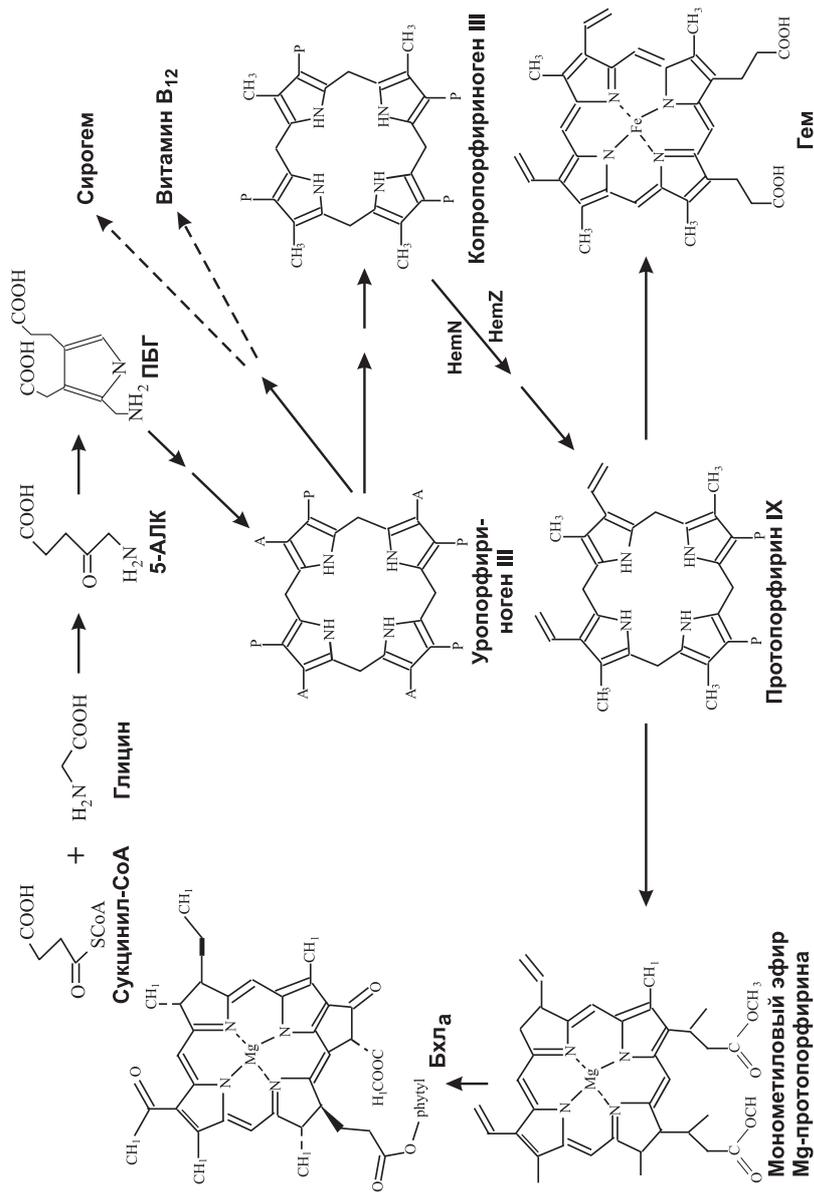


Рис. 6. Биосинтез тетрапиррольных соединений у *Rhodospirillum rubrum*.

фотосинтетических генов *crtI* и *puc*. Была предложена модель, согласно которой TspO, локализованный во внешней мембране, контролирует секрецию интермедиатов биосинтеза гема и бактериохлорофилла, в зависимости от концентрации кислорода в среде, и, тем самым, клеточные уровни низкомолекулярного метаболита (предположительно молекулы тетрапиррольной структуры), который участвует в регуляции транскрипции фотосинтетических генов (рис. 7) [49, 111].

В более поздней работе [118] с использованием двойного регуляторного мутанта AppA/PpsR (репрессор-антирепрессор экспрессии фотосинтетических генов) было показано, что TspO контролирует экспрессию тех же генов, что и AppA/PpsR. Предполагалось, что активность TspO в регуляции секреции тетрапирролов приводит к накоплению ко-активатора AppA, который, в свою очередь, участвует в дерепрессии генов, входящих в состав регулона PpsR.

Исследования структурных особенностей TspO и функциональной роли специфических аминокислотных остатков проводилось в работе [112]. С помощью сайт-специфического мутагенеза было установлено, что некоторые остатки триптофана (идентичные в молекуле TspO и его митохондриальных гомологов) чрезвычайно важны для осуществления сигнальной функции TspO. Замена остатков триптофана в положении 39, 44, 50 на остатки фенилаланина

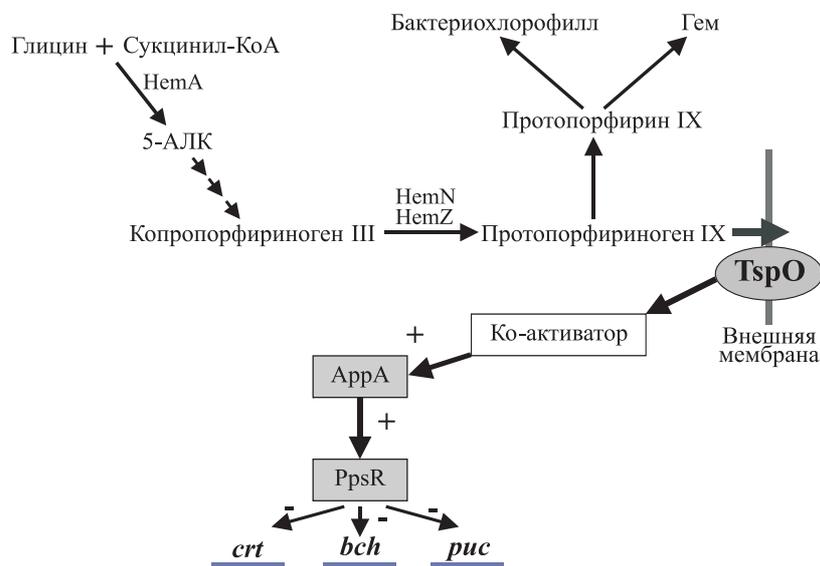


Рис. 7. Участие TspO в модуляции транскрипции фотосинтетических генов.

приводила к полному или частичному нарушению функции этого рецептора, выраженному в повышенной экспрессии нескольких фотосинтетических генов и изменению спектра тетрапиррольных пигментов, аккумулируемых в клетке. С использованием бифункциональных агентов, реагирующих с первичными аминогруппами, было установлено, что TspO образует димер во внешней бактериальной мембране. Димерная форма этого белка была стабилизирована в точечном мутанте, в котором остаток триптофана в позиции 38 был замещен на цистеин. Исследования точечных мутантов TspO, а также более ранняя работа с использованием трансляционных фьюжнов N-концевой последовательности TspO и щелочной фосфатазы [109] дали основания для топологической модели этого рецептора [112]. Предполагается, что белок содержит 5 гидрофобных доменов, пронизывающих внешнюю мембрану, при этом N-концевая часть TspO находится на внешней поверхности мембраны, а петля, соединяющая 1-й и 2-й трансмембранные спиральные домены, находится в периплазме. В этой части полипептидной цепи локализовано несколько аминокислотных остатков (в том числе, Trp-39 и Trp-44), определяющих функциональную активность TspO. Предполагается, что (в составе димера TspO) эти остатки участвуют в узнавании и связывании тетрапиррольных молекул (рис. 8). Роль остатков триптофана в молекуле TspO в связывании дикарбоксильных порфиринов, по-видимому, аналогична предложенной недавно модели для трансмембранного транспорта гема, согласно которой структурный мотив WWD гем-транспортного белка участвует в узнавании и связывании тетрапиррола [41].

TspO *R. sphaeroides* не связывал специфические MBR лиганды PK11195 и PK14105. В то же время, фракция внешних мембран бактерии *R. sphaeroides* специфически связывала бензодиазепин флуниразепам. С помощью радиоавтографии было установлено, что белком, связывающим БД, является порин, основной белок внешней мембраны этой бактерии. Меченый белок был частично очищен и идентифицирован путем секвенирования N-концевых аминокислот и иммуноблоттинга [109]. В связи с этим, возникло предположение, что TspO образует комплекс с порином во внешней мембране *R. sphaeroides*, аналогично тому, как pk18 образует комплекс с VDAC во внешней мембране митохондрий [28, 109].

*Экспрессия и функция митохондриального рецептора
в клетках R. sphaeroides*

Высокая степень гомологии между TspO *R. sphaeroides* и митохондриальным бензодиазепиновым рецептором позволяет предпо-

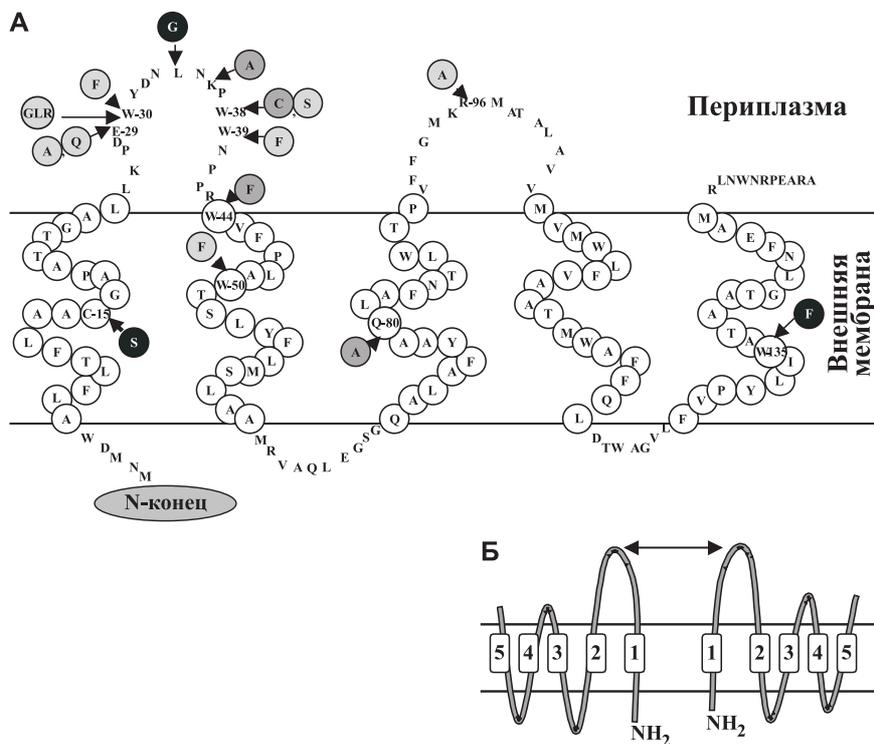


Рис. 8. Модель структурной организации TspO *Rhodobacter sphaeroides* [112].
 А) Точечные мутации, приводящие к модификации функции и уровней TspO.
 Б) Димерная форма TspO.
 Стрелка указывает сайт предполагаемого взаимодействия субъединиц рецептора.

лагать сходство их структуры и механизмов активности [110]. кДНК рк18 крысы была экспрессирована в клетках (дикого типа и TSP01) *R. sphaeroides*. Иммунодетекция с использованием моноклональных антител к рк18 подтвердила локализацию этого белка во внешней мембране *R. sphaeroides*. Для сравнения напомним, что экспрессия рк18 в клетках *E. coli* приводила к локализации этого белка в цитоплазматической мембране этой бактерии [56]. Интересно, что геном *E. coli* не кодирует полипептиды, гомологичные рк18/TspO. Эти результаты позволяют предположить наличие у *R. sphaeroides* активной системы, обеспечивающей узнавание и встраивание как TspO, так и его митохондриального гомолога во внешнюю мембрану этой бактерии.

Экспрессированный в клетках *R. sphaeroides* митохондриальный рецептор функционально замещал TspO, репрессируя экспрессию нескольких фотосинтетических генов как в аэробных, так и в анаэробных условиях роста. Негативный эффект rk18 на транскрипцию фотосинтетических генов снижался, либо полностью устранялся в присутствии наномолярных концентраций специфичного лиганда РК11195.

Структура rk18, экспрессированного в бактериальной клетке, исследовалась с применением ряда бензодиазепиновых и изохинолин-карбоксамидных лигандов. Этот белок специфично метился фотоаффинным производным изохинолин-карбоксамида, РК14105. Алпидем и (–) РК14067 конкурентно ингибировали связывание [3-Н]РК11195. (+)РК14068 связывался с рецептором на порядок слабее, чем его стереоизомер (–)РК14067. В соответствии со специфичностью нативного митохондриального рецептора, связывание имидазопиридина золпидема и бензодиазепина флумазенила (рис. 2) характеризовалось значительно более высокими константами диссоциации. Приведенные результаты позволили предположить наличие тесной структурной и функциональной связи между бактериальным TspO и его ортологом – митохондриальным бензодиазепиновым рецептором. Предполагается, что бактерии, принадлежащие к α -3 подгруппе протеобактерий явились эволюционными предшественниками митохондрий высших организмов [107] Изложенные выше результаты, несомненно, вносят вклад в поддержку этой гипотезы [28].

TspO из Sinorhizobium meliloti

Недавно было показано, что гомолог TspO в симбиотической бактерии *S. meliloti* регулировал экспрессию генов локуса *ndi* в ответ на стрессовые условия (недостаток питательных веществ) [23]. Гомолог TspO в этом организме характеризовался высоким содержанием идентичных с TspO из *R. sphaeroides* аминокислотных остатков (42% идентичных и 25% консервативных замен), а также гомологией с МБР (45% идентичных и 20% консервативных замен). В этой же работе были представлены доказательства, что TspO воздействует на экспрессию этих генов, ингибируя активность кислород-сенсорной регуляторной системы FixL. Ген *tspO* из *R. sphaeroides*, экспрессированный в *S. meliloti in trans*, функционально замещал гомолог этого мембранного рецептора, и приводил к значительному возрастанию экспрессии генов *ndi* как в условиях аэрации, так и при недостатке кислорода. Исследований структуры и внутриклеточной локализации TspO у *S. meliloti* не проводилось.

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Интенсивное развитие технологии секвенирования и анализа ДНК в последние годы привело к значительному расширению базы данных генов за счет все возрастающего количества частично- и полностью секвенированных геномов организмов, относящихся к эубактериям, архебактериям и эукариотам. Сравнительный анализ последовательностей TspO/pk18 с базой данных GeneBank привел к идентификации около 40 белков (или ORF), имеющих значительную степень гомологии с этими рецепторами (таблица). Интересно, что последовательности подавляющего большинства этих потенциальных гомологов содержат повышенное (по сравнению с большинством других интегральных мембранных белков) количество остатков триптофана, что также является характерной отличительной чертой как митохондриальных рецепторов, так и TspO фотосинтетических пурпурных бактерий. Следует отметить, что остатки триптофана в большинстве этих гомологичных последовательностей являются консервативными (например, Trp-30, 44, 50, 135), что, по-видимому, можно рассматривать как свидетельство их функционального и структурного значения. Несмотря на то, что большую часть гомологов TspO/pk18 составляют гипотетические белки, экспрессия и свойства которых пока еще не подтверждены экспериментально, можно предполагать, что класс белков, объединяющий бензодиазепиновые рецепторы млекопитающих и TspO/CrtK фотосинтетических бактерий, не ограничен лишь этой относительно немногочисленной группой, а является на самом деле значительно более широким. Дальнейшие исследования, несомненно пополнят список многообразных биологических функций, выполняемых этими белками. Одной из основных, как нам представляется, является их участие в регуляции транспорта низкомолекулярных клеточных метаболитов через внешнюю (бактерии) или митохондриальную (бензодиазепиновые рецепторы) мембрану.

Имеющиеся в нашем распоряжении данные свидетельствуют о том, что гомологи TspO/pk18 присутствуют не во всех живых организмах. Так, например, представители некоторых подгрупп бактерий и архебактерий, по-видимому, не содержат этих рецепторов. Гомолог TspO, найденный в почвенной бактерии *S. meliloti*, характеризуется примерно одинаковой степенью структурного сродства как с митохондриальными бензодиазепиновыми рецепторами млекопитающих, так и с рецепторам *R.sphaeroides*. В связи с тем, что *S. meliloti* является эндосимбиотическим организмом, это сродство представляется чрезвычайно интересным, так как оно может явиться дальнейшим подтверждением вероятной эволюционной взаимосвязи представителей α -подгруппы пурпурных бактерий и митохондрий высших организмов.

Таблица.
Гомологи митохондриальных бензодиазепиновых рецепторов

Организм/таксон	Номер последовательности в GeneBank	Идентичные остатки*	Консервативные остатки**	Ссылка
1	2	3	4	5
Эубактерии				
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	AF195122.1/gi22956740	—	—	[109]
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	X52291/gi45996	67/152 (44%)	92/152 (60%)	[6]
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pflu-136	NZ_AABA01000136/gi23060855	63/143 (44%)	86/143 (60%)	—
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Syringae</i> B728a	NZ_AABH01000013/gi23472623	9/143 (41%)	84/143 (58%)	—
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	AE007248/gi6010626	52/147 (35%)	71/147 (48%)	[9]
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58	151155176	51/146 (34%)	75/146 (51%)	[106]
<i>Rhodospirillum rubrum</i> Rrubr_9	NZ_AAAG01000009/22968080	49/144 (34%)	68/144 (47%)	—
<i>Chlorobium tepidum</i> TLS	AE012921/gi21647659	48/133 (36%)	70/133 (52%)	[30]
<i>Clostridium perfringens</i> str. 13	AP003192/gi18146740	49/149 (32%)	73/149 (48%)	[87]
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	AB062279/gi14209492	46/145 (31%)	72/145 (49%)	[108]
<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> Magn_461	NZ_AAAP010000595/gi23004753	45/143 (31%)	65/143 (45%)	—
<i>Heliobacillus mobilis</i>	AF080002/3820536			[100]
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>Citri</i> , str. 306	AE011815/gi2110807	49/151 (32%)	72/151 (47%)	[22]
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Campestris</i> str. 33	AE012282.1/gi21112893	44/149 (29%)	67/149 (44%)	[22]
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> Rpa_1	NZ_AAAP01000001/gi22960729	45/133 (33%)	67/133 (50%)	—
<i>Novosphingobium aromaticivorans</i> Saro_103	NZ_AAAV01000103/gi23107669	48/151 (31%)	74/151 (49%)	—

см. окончание табл.

окончание табл.

1	2	3	4	5
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC824	AE007539/gi15023094	45/152 (29%)	74/152 (48%)	[72]
<i>Acidiphilum rubrum</i>	AB017350/gi458696	46/149 (30%)	69/149 (46%)	[64]
<i>Brevibacterium linens</i>	AF139916/gi7648563	47/156 (30%)	69/156 (44%)	[53]
<i>Eubacterium</i> sp. VPI 12708	M34658/gi148521	48/155 (30%)	73/155 (47%)	[42]
<i>Trichodesmium erythraeum</i> ISM101	NZ_AAAU01000029/gi23041841	34/128 (26%)	57/128 (44%)	—
<i>Fremyella diplosiphon</i>	X04592/gi19576436	33/128 (25%)	56/128 (43%)	[65]
Археобактерии				
<i>Methanosarcina mazei</i> strain Goe1	AE013323/gi20905383	44/127 (34%)	67/127 (52%)	[24]
<i>Methanosarcina acetivorans</i> str. C2A	AE011133/gi19918319	42/150 (28%)	69/150 (46%)	[36]
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	AE001001/gi2689324	38/124 (30%)	60/124 (48%)	[52]
<i>Sulfolobus tokodaii</i>	AP0009891/gi15623240	23/117 (19%)	47/117 (40%)	[50]
Эукариоты				
<i>Homo sapiens</i>	AF075590/gi21536444	42.126 (33%)	57.126 (45%)	[83]
<i>Mus musculus</i>	NM_009775/gi484053	42/129 (32%)	59/129 (45%)	[95]
<i>Drosophila melanogaster</i>	AY058269/gi16182453	42.134 (31%)	62.134 (46%)	—
<i>Bos taurus</i>	M64520/gi163488	41/133 (30%)	58/133 (43%)	[77]
<i>Rattus norvegicus</i>	NM_012515/gi6978574	41/129 (31%)	57/129 (44%)	[92]
<i>Ovis aries</i>	9AF290203/gi937483	40/133 (30%)	57/133 (42%)	—
<i>Aspergillus parasiticus</i> clone ap0	AC005991/gi3900825	45/126 (35%)	59/126 (46%)	—
<i>Botrytis cinerea</i> strain T4	AL110763/gi5825050	39/134 (29%)	56/134 (41%)	—
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	AL034352/gi3925750	32/120 (26%)	50/120 (41%)	—

* Количество идентичных остатков/общее количество сравниваемых аминокислотных остатков (% идентичных остатков) по отношению к последовательности TspO *R. sphaeroides*.

** Количество консервативных замен/общее количество сравниваемых аминокислотных остатков (% консервативных остатков) по отношению к последовательности TspO *R. sphaeroides*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Быховский В.Я., Зайцева Н.И. (1989) Итоги науки и техники. Сер. Биологическая химия, т. **32**, 176 стр.
2. Елусеев А.А., Каплан С. (1999) Прикл. биохим. и микробиол., **35**, 319–325.
3. Anholt, R. R. H., DeSouza, E. B., Oster-Granite, M. L., Snyder, S. H. (1985) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **233**, 517–526.
4. Anholt, R. R. H., Pedersen, P. L., DeSouza, E. B., Snyder, S. H. (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 576–583.
5. Antkiewicz-Michaluk, L., Mukhin, A. G., Guidotti, A., Krueger, K. E. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 17317–17321.
6. Armstrong, G. A., Alberti, M., Leach, F., Hearst, J. E. (1989) *Mol. Gen. Genet.*, **216**, 254–268.
7. Awad, M., Gavish, M. (1987) *J. Neurochem.*, **49**, 1407–1414.
8. Baker, M. E., Fanestil, D. D. (1991) *Cell*, **65**, 721–722.
9. Barnett, M.J., Fisher, R.F., Jones, T., Komp, C., Abola, A.P., Barloy-Hubler, F., Bowser, L., Capela, D., Galibert, F., Gouzy, J., Gurjal, M., Hong, A., Huizar, L., Hyman, R.W., Kahn, D., Kahn, M.L., Kalman, S., Keating, D.H., Palm, C., Peck, M.C., Surzycki, R., Wells, D.H., Yeh, K.-C., Davis, R.W., Federspiel, N.A., Long, S.R. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 9883–9888.
10. Basile, A. S., Skolnick, P. (1986) *J. Neurochem.*, **46**, 305–308.
11. Basile, A. S., Klein, D. C., Skolnick, P. (1986) *Mol. Brain. Res.*, **1**, 127–135.
12. Bernassau, J. M., Reversat, J. L., Ferrara, P., Caput, D., Le Fur, G. (1993) *J. Mol. Graphics*, **11**, 236–244.
13. Black, K. L., Shiraishi, T., Ikezaki, K., Tabuchi, K., Becker, D. P. (1994) *Neurol. Res.*, **16**, 74–84.
14. Blahos, J., Whalin, M., Krueger, K. E. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 20285–20291.
15. Braestrup, C., Squires, R. F. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 3805–3809.
16. Carayon, P., Dussossoy, D. Bord, A., Petitpretre, Canat, X.G, Le Fur, G. Casellas, P. (1996) *Blood*, **87**, 3170–3178.
17. Casalotti, S.O., Pelaia, G., Yakovlev, A.G., Csikos, T., Grayson, D.R., Krueger, K.E. (1992) *Gene*, **121**, 377–382.
18. Casellas, P., Galiegue, S., Basile, A. S. (2002) *Neurochem. Int.*, **40**, 475–486.
19. Castedo, M., Perfettini, J.-L., Kroemer, G. (2002) *J. Exp. Med.*, **196**, 1121–1125.
20. Curran, T., Morgan, J.I. (1985) *Science*, **229**, 1265–1268.
21. Chang, Y.J., McCabe, R.T., Rennert, H., Budarf, M.L., Sayegh, R., Emanuel, B.S., Skolnick, P., Strauss III, J.F. (1992) *DNA Cell Biol.*, **11**, 471–480.
22. Da Silva, A.C.R., Ferro, J.A., Reinach, F.C., Farah, C.S., Furlan, L.R., Quaggio, R.B., Monteiro-Vitorello, C.B., Van Sluys, M.A., Almeida, Jr., N.F., Alves, L.M.C., do Amaral, A.M., Bertolini, M.C. Camargo, L.E.A., Camarotte, G., Cannavan, F., Cardozo, J., Chambergo, F., Ciapina, L.P., Cicarelli, R.M.B., Coutinho, L.L., Cursino-Santos, J.R., El-Dorry, H., Faria, J.B., Ferreira, A.J.S. (2002) *Nature*, **417**, 459–463.
23. Davey, M.E., and De Bruijn, F.J. (2000) *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 5353–5359.
24. Deppenmeier, U., Johann, A., Hartsch, T., Merkl, R., Schmitz, R.A., Martinez-Arias, R., Henne, A., Wiezer, A., Baeumer, S., Jacobi, C., Brueggemann, H., Lienard, T., Christmann, A., Boemecke, M., Steckel, S., Bhattacharyya, A., Lykidis, A., Overbeek, R., Klenk, H.-P., Gunsalus, R.P., Fritz, H.-J. and Gottschalk, G.J. (2002) *Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **4**, 453–461.
25. DeSouza, E.B., Anholt, R.R.H., Murhy, K.M.M., Snyder, S. H., Kuhar, M.S. (1985) *Endocrinology*, **116**, 567–573.

26. Doble, A.J., Benavides, J. (1985) *Eur. J. Pharmacol.*, **119**, 153–167.
27. Doble, A., Ferris, O., Burgevin, M.C., Menager, J., Uzan, A., Dubroeuq, M.C., Renault, C., Gueremy, C., and Le Fur, G. (1987) *Mol. Pharmacol.*, **31**, 42–49.
28. Donahue, T.J. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 4821–4822.
29. Dubroeuq, M.C., Benavides, J., Doble, A., Guilloux, A., Allam, D., Vaucher, N., Bertrand, P., Gueremy, C., Renault, C., Uzan, A., Le Fur, G. (1986) *Eur. J. Pharmacol.*, **128**, 269–272.
30. Eisen, J.A., Nelson, K.E., Paulsen, I.T., Heidelberg, J.F., Wu, M., Dodson, R.J., Deboy, R., Gwinn, M.L., Nelson, W.C., Haft, D.H., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Durkin, A.S., Kolonay, J.L., Yang, F., Holt, I., Umayam, L.A., Mason, T., Brenner, M., Shea, T.P., Parksey, D., Nierman, W.C., Feldblyum, T.V., Hansen, C.L., Craven, M.B., Radune, D., Vamathevan, J., Khouri, H., White, O., Gruber, T.M., Ketchum, K.A., Venter, J.C., Tettelin, H., Bryant, D.A., Fraser, C.M. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 9509–9514.
31. Escubedo, E., Camins, A., Talaveron, C., and Camarasa, J. (1992) *J. Neurochem.*, **58**, 39–45.
32. Escubedo, E., Camins, A., Tresserra, F., Adzet, T., Camarasa, J. (1994) *Life Sci.*, **54**, 759–767.
33. Farges, R., Joseph-Liauzun, E., Shire, D., Caput, D., Le Fur, G., Loison, G., Ferrara, P. (1993) *FEBS Letters*, **335**, 305–308.
34. Fennel, D.A., Corbo, M., Pallaska, A., Cotter, F. E. (2001) *British J. Cancer.*, **84**, 1397–1404.
35. Frydman, R.B., Levy, E.S., Varasinas, A., Frydman, B. (1978) *Biochemistry*, **17**, 110–120.
36. Galagan, J.E., Nusbaum, C., Roy, A., Endrizzi, M.G., Macdonald, P., Fitz Hugh, W., Calvo, S., Engels, R., Smirnov, S., Atnoor, D., Brown, A., Allen, N., Naylor, J., Stange-Thomann, N., DeArellano, K., Johnson, R., Linton, L., McEwan, P., McKernan, K., Talamas, J., Tirrell, A., Ye, W., Zimmer, A., Barber, R.D., Cann, I., Graham, D.E., Grahame, D.A., Guss, A., Hedderich, R., Ingram-Smith, C., Kuettner, C.H., Krzycki, J.A., Leigh, J.A., Li, W., Liu, J., Mukhopadhyay, B., Reeve, J.N., Smith, K., Springer, T.A., Umayam, L.A., White, O., White, R.H., de Macario, E.C., Ferry, J.G., Jarrell, K.F., Jing, H., Macario, A.J.L., Paulsen, I., Pritchett, M., Sowers, K.R., Swanson, R.V., Zinder, S.H., Lander, E., Metcalf, W.W. and Birren, B. (2002) *Genome Res.*, **12**, 532–542.
37. Galiegue, S., Jbilo, O., Combes, T., Bribes, E., Carayon, P., Le Fur, G., and Casellas, P. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 2938–2952.
38. Garnier, M., Dimchev, A., Boujrad, N., Price, M. J., Musto, N. A., Papadopoulos, V. (1994) *Mol. Pharmacol.*, **45**, 201–211.
39. Garnier, M., Boujrad, N., Oke, B.O., Brown, A.S., Riond, J., Ferrara, P., Shoyab, M., Suarez-Quian, C.A., and Papadopoulos, V. (1993) *Endocrinol.*, **132**, 444–458.
40. Gavish, M., Katz, Y., Bar-Ami, S., Weizman, R. (1992) *J. Neurochem.*, **58**, 1589–1601.
41. Goldman, B.S., Beck, D.L., Monika, E.M., Kranz, R. G. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 5003–5008.
42. Gopal-Srivastava, R., Mallonee, D.H., White, W.B., Hylemon, P.B. (1990) *J. Bacteriol.*, **172**, 4420–4426.
43. Granick, S. (1967) *Biochemistry of Chloroplasts* (Goodwin, T. W., ed), 373–410, Academic Press, New York.
44. Hirsch, J.D., Beyer, C.F., Malkowitz, L., Beer, B., Blume, A.J. (1989) *Mol. Pharmacol.*, **35**, 157–163.
45. Hirsch, T., Decaudin, D., Susin, S.A., Marchetti, P., Larochette, N., Resche-Rigon, M., Kroemer, G. (1998) *Exp. Cell. Res.*, **241**, 426–434.
46. Hradwick, M., Fertikh, D., Culty, M., Li, H., Vidic, B., Papadopoulos, V. (1999) *Cancer Res.*, **59**, 831–842.

47. Ikezaki, K., Black, K.L. (1990) *Cancer Lett.*, **49**, 115–120.
48. Joseph-Liauzun, E., Delmas, P., Shire, D., Ferrara, P. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 2146–2152.
49. Kaplan, S. (2002) *Photosynth. Res.*, **73**, 95–108.
50. Kawarabayasi, Y., Hino, Y., Horikawa, H., Jin-no, K., Takahashi, M., Sekine, M., Baba, S., Ankai, A., Kosugi, H., Hosoyama, A., Fukui, S., Nagai, Y., Nishijima, K., Otsuka, R., Nakazawa, H., Takamiya, M., Kato, Y., Yoshizawa, T., Tanaka, T., Kudoh, Y., Yamazaki, J., Kushida, N., Oguchi, A., Aoki, K., Masuda, S., Yanagii, M., Nishimura, M., Yamagishi, A., Oshima, T., Kikuchi, H. (2001) *DNA Res.*, **8**, 123–140.
51. Kinnali, K.W., Antoneko, Y.N., Snyder, S.H., McEnery, M.W., Tedeschi, H. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 1374–1378.
52. Klenk, H.P., Clayton, R.A., Tomb, J., White, O., Nelson, K.E., Ketchum, K.A., Dodson, R.J., Gwinn, M., Hickkey, E.K., Peterson, J.D., Richardson, D.L., Kerlavage, A.R., Graham, D.E., Kyrpides, N.C., Fleischmann, R.D., Quackenbush, J., Lee, N.H., Sutton, G.G., Gill, S., Kirkness, E.F., Dougherty, B.A., McKenney, K., Adams, M.D., Loftus, B., Peterson, S., Reich, C.I., McNeil, L.K., Badger, J.H., Glodek, A., Zhou, L., Overbeek, R., Gocayne, J.D., Weidman, J.F., McDonald, L., Uitterback, T., Cotton, M.D., Spriggs, T., Artiach, P., Kaine, B.P., Sykes, S.M., Sadow, P.W., D'Andrea, K.P., Bowman, C., Fujii, C., Garland, S.A., Mason, T.M., Olsen, G.J., Fraser, C.M., Smith, H.O., Woese, C.R., Venter, J.C. (1997) *Nature*, **390**, 364–370.
53. Krubasik, P., Sandmann, G. (2000) *Mol. Gen. Genet.*, **263**, 423–432.
54. Krueger, K.E., Papadopoulos, V. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 15015–15022.
55. Krueger, K.E., Papadopoulos, V. (1992) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **32**, 211–237.
56. Krueger, K.E. (1995) *Biochim. Biophys. Acta*, **1241**, 453–470.
57. Lacapere, J.J., Delavoie, F., Li, H., Peranzi, G., Maccario, J., Papadopoulos, V., Vidic, B. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **284**, 536–541.
58. Langer, S.Z., Arbilla, S. (1988) *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **29**, 763–766.
59. Larcher, J.-P., Vayssiere, J.-L., Le Marquer, F. J., Cordeau, L. R., Keane, P. E., Bachy, A., Gros, F., Croizat, B. P. (1989) *Eur. J. Pharmacol.*, **161**, 197–202.
60. Le Fur, G., Perrier, M.L., Vaucher, N., Imbault, F., Flamier, A., Uzan, A., Renault, C., Dubroeuq, M.C., Gueremy, C. (1983) *Life Sci.*, **32**, 1839–1847.
61. Li, H., Papadopolous, V. (1998) *Endocrinology*, **139**, 4991–4997.
62. Li, H., Yao, Z., Degenhardt, B., Teper, G., Papadopoulos, V. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 1267–1272.
63. Lin, D., Chang, Y. J., Strauss III, J. F., Miller, W. L. (1993) *Genomics*, **1**, 643–650.
64. Masuda, T., Inoue, K., Masuda, M., Nagayama, M., Tamaki, A., Ohta, H., Shimada, H., Takamiya, K. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 33594–33600.
65. Mazel, D., Guglielmi, G., Houmard, J., Sidler, W., Bryant, D.A., Tandeau de Marsac, N. (1986) *Nucleic Acids Res.*, **14**, 8279–8290.
66. McCabe, R.T., Schoenheimer, J.A., Skolnick, P., Hauck-Newman, A., Rice, K., Reig, J.-A., Klein, D.C. (1989) *FEBS Lett.*, **244**, 263–267.
67. McEnery, M.W., Snowman, A.M., Trifiletti, R.R., Snyder, S.H. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 3170–3174.
68. McEnery, M.W. (1992) *J. Bioenerg. Biomem.*, **24**, 63–69.
69. Morgan, J.I., Johnson, M.D., Wang, J.K.T., Sonnenfeld, K.H., Spector, S. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 5223–5226.
70. Moynagh, P.N., Bailey, C.J., Boyce, S.J., Williams, D.C. (1991) *Biochem. J.*, **275**, 419–425.
71. Newman, A.H., Luiddens, H.W., Skolnick, P., Rice, K.C. (1987) *J. Med. Chem.*, **30**, 1901–1905.

72. Nolling, J., Breton, G., Omelchenko, M.V., Markarova, K.S., Zeng, Q., Gibson, R., Lee, H.M., Dubois, J., Qiu, D., Hitti, J., Wolf, Y.I., Tatusov, R.L., Sabathe, F., Doucette-Stamm, L., Soucaille, P., Daly, M.J., Bennett, G.N., Koonin, E.V., Smith, D.R. (2001) *J. Bacteriol.*, **183**, 4823–4838.
73. Odber, J., Cutler, M., Dover, S., Moore, M.R. (1994) *Neuroreport*, **5**, 1093–1096.
74. Olsen, R.W., Tobin, A.J. (1990) *FASEB J.*, **14**, 1469–1481.
75. Papadopoulos, V., Nowzari, F.B., Krueger, K.E. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 3682–3687.
76. Papadopoulos, V., Amri, H., Boujrad, N., Cascio, C., Culty, M., Garnier, M., Hardwick, M., Li, H., Vidic, B., Brown, A.S., Reversa, J.L., Bernassau, J.M., Drieu, K. (1997) *Steroids*, **62**, 21–28.
77. Parola, A.L., Stump, D.G., Pepperl, D.J., Krueger, K.E., Regan, J.W., Laird II, H. E. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 14082–14087.
78. Parola, A.L., Yamamura, H.I. (1993) *Peripheral Benzodiazepine receptors*. Giesen-Crouse, E., Ed. London, San Diego, New York, Sydney, Tokyo, Toronto, 115 p.
79. Paul, S.M., Kempner, E.S., Skolnick, P. (1981) *Eur. J. Pharmacol.*, **76**, 465–466.
80. Ratcliffe, S.L., Matthews, E.K. (1995) *Brit. J. of Cancer*, **71**, 300–305.
81. Rebeiz, N., Arkins, S., Kelley, K.W., Rebeiz, C.A. (1996) *Arch. Biochem. Biophys.*, **333**, 475–481.
82. Riond, J., Vita, N., Le Fur, G., Ferrara, P. (1989) *FEBS Lett.*, **245**, 238–244.
83. Riond, J., Mattei, M. G., Kaghad, M., Dumont, X., Guillemot, J.C., Le Fur, G., Caput, D., Ferrara, P. (1991) *Eur. J. Biochem.*, **195**, 305–311.
84. Romeo, E., Auta, J., Kozikowski, A.P., Papadopoulos, V., Puia, G., Costa, E., Guidotti, A. (1992) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **262**, 971–978.
85. Ruff, M.R., Pert, C.B., Weber, R.J., Wahl, L.M., Paul, S.M. (1985) *Science*, **229**, 1281–1283.
86. Schoemaker, H., Boles, R.G., Horst, W.D., and Yamamura, H.I. (1983) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **225**, 61–69.
87. Shimizu, T., Ohtani, K., Hirakawa, H., Ohshima, K., Yamashita, A., Shiba, T., Ogasawara, N., Hattori, M., Kuahara, S., Hayashi, H. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 996–1001.
88. Shiraishi, T., Black, K.L., Ikezaki, K., Becker, D.P. (1991) *J. Neurosci. Res.*, **30**, 463–474.
89. Simpson, E.R., Waterman, M.R. (1988) *Annu. Rev. Physiol.*, **50**, 427–440.
90. Smith, A. (1989) *Biosynthesis of heme and chlorophylls*, pp. 435–490, McGraw-Hills Publishing Company, New York.
91. Snyder, S.H., Verma, A. (1987) *FASEB J.*, **1**, 282–288.
92. Sprengel, R., Werner, P., Seeburg, P.H., Mukhin, A.G., Santi, M.R., Grayson, D.R., Guidotti, A., Krueger, K.E. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 20415–20421.
93. Stevens, V.L., Tribble, D.L., Lambeth, J.D. (1985) *Arch. Biochem. Biophys.*, **242**, 324–327.
94. Sutter, A.P., Maaser, K., Hopfner, M., Barthel, B., Grabowski, P., Faiss, S., Carayon, P., Zeitz, M., Scherubl, H. (2002) *Int. J. Cancer.*, **102**, 318–327.
95. Taketani, S., Kohno, H., Okuda, M., Furukawa, T., Tokunaga, R. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 7527–7531.
96. Taketani, S., Kohno, H., Furukawa, T., Tokunaga, R. (1995) *J. Biochem.*, **117**, 875–880.
97. Thomas, J. W., Tallman, J. F. (1981) *J. Biol. Chem.*, **256**, 9838–9842.
98. Verma, A., Nye, J. S., Snyder, S. H. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 2256–2260.
99. Verma, A., Snyder, S. H. (1988) *Mol. Pharmacol.*, **34**, 800–805.

100. Xiong, J., Inoue, K., Bauer, C.E. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **95**, 14851–14856.
101. Wang, J.K.T., Taniguchi, T., Spector, S. (1984) Mol. Pharmacol., **25**, 349–351.
102. Wang, J. K. T., Morgan, J. I., Spector, S. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci., USA **81**, 3770–3772.
103. Wang, X., Liu, Z., Eimerl, S., Timberg, R., Weiss, R., Orly, J., and Stocco, D. (1998) Endocrinology, **139**, 3903–3912.
104. West, L.A., Horvat, R.D., Roess, D.A., Barisas, B. G., Juengel, J. L., Niswebder, G. D. (2001) Endocrinology, **142**, 502–505.
105. Whalin, M., Boujard, N. (1994) J. Receptor Research, **14**, 217–228.
106. Wood, D.W., Setubal, J.C., Kaul, R., Monks, D., Chen, L., Wood, G.E., Chen, Y., Woo, L., Kitajima, J.P., Okura, V.K., Almeida Jr., N.F., Zhou, Y., Bovee S.D., Chapman, P., Clendenning, J., Deatherage, G., Gillet, W., Grant, C., Guenther, D., Kutayavin, T., Levy, R., Li, M., McClelland, E., Palmieri, A., Raymond, C., Rouse, G., Saenphimmachak, C., Wu, Z., Gordon, D., Eisen, J.A., Paulsen, I., Karp, P., Romero, P., Zhang, S., Yoo, H., Tao, Y., Biddle, P., Jung, M., Krespan, W., Perry, M., Gordon-Kamm, B., Liao, L., Kim, S., Hendrick, C., Zhao, Z., Dolan, M., Tingey, S.V., Tomb, J., Gordon, M.P., Olson, M.V., Nester, E.W. (2001) Science, **294**, 2317–2323.
107. Woese, C.R. (1987) Microbiol. Rev., **51**, 221–271.
108. Yasuta, T., Okazaki, S., Mitsui, H., Yuhashi, K., Ezura, H., Minamisawa, K. (2001) Appl. Environ. Microbiol., **67**, 4999–5009.
109. Yeliseev, A.A., Kaplan, S. (1995) J. Biol. Chem., **270**, 21167–21175.
110. Yeliseev, A.A., Krueger, K.E., Kaplan, S. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **94**, 5101–5106.
111. Yeliseev, A.A., Kaplan, S. (1999) J. Biol. Chem., **274**, 21234–21243.
112. Yeliseev, A.A., Kaplan, S. (2000) J. Biol. Chem., **275**, 5657–5667.
113. Zavala, F., Haumont, J., Lenfant, M. (1985) Eur. J. Pharmacol., **106**, 561–566.
114. Zavala, F., Lenfant, M. (1987) Ann. NY Acad. Sci., **496**, 240–249.
115. Zavala, F., Veber, F., Descamps-Latscha, B. (1990) Blood, **76**, 184–188.
116. Zeilstra-Ryalls, J.H., Gomelsky, M., Yeliseev, A.A., Eraso, J.M., and Kaplan, S. (1998) in Methods Enzymol. Vol. **297**, pp. 151–166.
117. Zeilstra-Ryalls, J., Gomelsky, M., Eraso, J.M., Yeliseev, A.A., O'Gara, J., Kaplan, S. (1998) J. Bacteriol., **180**, 2801–2809.
118. Zeng, X., Kaplan, S. (2001) J. Bacteriol., **183**, 6355–6364.