

Холинацетилтрансфераза и её роль в регуляции обмена и секреции ацетилхолина

Захарова Е.И., Дудченко А.М.

ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

*Представлен обзор современных представлений о формах существования холинацетилтрансферазы (ХАТ) и факторах регуляции активности синаптической ХАТ в зависимости от ее локализации. Обосновывается, что компартиментализация фермента разграничивает вовлечение ХАТ в разные функционально-метаболические циклы. Продемонстрировано функциональное соответствие реакции синаптоплазматической и мембраносвязанной ХАТ при воздействиях *in vitro* и *in vivo*, а также разнообразие функционального ответа холинергических синапсов на воздействия *in vivo*.*

Ключевые слова: субфракции синаптоплазмы и синаптических мембран, водорастворимая и мембраносвязанная холинацетилтрансфераза, квантовая и неквантовая секреция ацетилхолина

Введение

ХАТ (ЕС 2.3.1.6) — ключевой фермент синтеза ацетилхолина, катализирующий синтез медиатора из холина и ацетилкоэнзима А. В нейронах основное место синтеза медиатора — в нервных окончаниях. ХАТ является биомаркером холинергических нейронов наравне с везикулярным транспортером ацетилхолина.

Холинергические системы мозга представляют неизменный интерес нейробиологов в связи с их важной ролью в когнитивных функциях, функциях внимания и моторики. Дисфункция и дегенерация холинергических проекционных нейронов из подкорковых ядер переднего мозга, иннервирующих неокортекс и гиппокамп, лежит в основе патогенеза таких заболеваний, как болезнь Альцгеймера и Деменция с тельцами Леви, а также нервно-психических заболеваний другой этиологии, течение которых часто осложняется нарушениями в когнитивной сфере, таких как шизофрения, болезнь Паркинсона, сосудистая деменция при хронической ишемии мозга [1, 22, 36, 43, 44, 56, 63, 66]. Низкая экспрессия ХАТ в холинергических нейронах моторных ядер спинного мозга является специфическим ранним признаком амиотрофического бокового склероза, множественные аномалии холинергической функции в моторных ядрах спинного мозга составляют этиологию врожденного миастенического синдрома, дисфункция холинергических интернейронов неостриатума несет частичную ответственность за непроизвольные движения при болезни Харрингтона [25, 44, 45].

В нервных окончаниях активность ХАТ тесно связана с медиаторной холинергической функцией [40]. Долгое время, на основании кинетических расчетов, ХАТ не относили к скорости-лимитирующим ферментам. По своим кинетическим характеристикам ХАТ не насыщается субстратами, холином и ацетилкоэнзимом А, в их физиологических концентрациях и поэтому считалось, что скорость синтеза зависела только от колебаний в уровне самих субстратов [61, 62]. Однако в последние десятилетия было выявлено множество других внутриклеточных факторов регуляции активности фермента, и эти данные свидетельствовали о важной регулирующей роли ХАТ в синтезе ацетилхолина [26, 27]. Предполагается, что причиной ряда заболеваний являются спонтанные точечные мута-

ции в молекуле ХАТ или ее регуляторных белков, приводящие к дизрегуляции фермента или изменению способности к коммуникации с регуляторными факторами [27, 45]. Эти факты побуждают к интенсивному исследованию нейрональных, генетических и постгеномных, регуляторных механизмов метаболизма и секреторной активности ацетилхолина.

ХАТ долго была общепризнана только как цитоплазматический, водорастворимый фермент, даже после того, как в 1967 г. была обнаружена на синаптических мембранах [33]. Позже было доказано существование ХАТ как интегрального структурного белка [23, 31, 46]. Многолетнее изучение *in vitro* свойств синаптической водорастворимой (с, синаптоплазматической) и мембраносвязанной (м) ХАТ в разных функционально-метаболических условиях показало, что связь между активностью ХАТ и холинергической секреторной функцией зависит от компартиментализации фермента. Исследования такого рода *in vivo* отсутствуют, однако в обзоре будут представлены наши данные о влиянии факторов внешней среды *in vivo* на активность синаптической с- и мХАТ. Эти данные, с одной стороны, позволяют предполагать идентичность функциональных свойств фермента при воздействиях *in vitro* и *in vivo*, а с другой стороны, расширяют представления о пластичности холинергических синапсов, не выявляемые *in vitro*.

Формы ХАТ

На сегодняшний день доказано, что в пресинапсах ХАТ существует в гидрофильном (сХАТ) и гидрофобном состоянии (стационарная мХАТ, интегральный белок). Доказано также, что сХАТ способна транслоцироваться из цитозоля на синаптические мембраны, обратимо переходя в гидрофобное состояние с образованием ионных связей (ионосвязанная мХАТ) [23, 25, 49]. Все это предполагало существование нескольких форм или изоформ фермента. На это также указывали различия между субфракциями синаптической ХАТ в оптимуме pH, субстратной специфичности, чувствительности к селективному ингибитору ХАТ 4-(1-нафтил)пиридину (NVP) и другим молекулярным характеристикам [12, 34, 58].

Исследования последних двух десятилетий свидетельствуют о существовании одного гена ХАТ, в котором закодированы несколько форм и изоформ фермента [36, 44]. Показана высокая гомологичность нуклеотидных последовательностей гена ХАТ из мозга мыши, крысы, свиньи и человека с межвидовыми различиями в его 5'-некодирующей области. Полиморфизм мРНК ХАТ является следствием альтернативного сплайсинга и различного использования по крайней мере пяти некодирующих экзонов в промоторном участке гена [42]. К настоящему времени изолированы пять типов мРНК ХАТ из мозга крысы (R1/2-, N1/2- и М-транскрипты) [39] и 6 типов — из мозга человека (R1/2-, N1/2-, S- и М-транскрипты) [36]. Все известные транскрипты генерируют ХАТ с молекулярной массой 69 кДа, которая является мажорной формой ХАТ в ЦНС. Человеческие М- и S-транскрипты индуцируют также две минорные формы ХАТ с массой 82 и 74 кДа [36, 40, 42, 44, 45]. ХАТ-69 и ХАТ-82 кДа подразделяются еще на ряд изоформ по различию в изоэлектрических точках [24]. В цитоплазме и на плазматических мембранах холинергических нейронов локализуется ХАТ-69 кДа [36, 42, 44]. В мозге человека ХАТ найдена также в ядре, первоначально избирательно ХАТ-82 кДа [24, 23, 26, 48], а позже, в определенных структурах ЦНС, и ХАТ-69 кДа [36]. Экспрессия ХАТ-74 кДа наблюдалась только в спинном мозге человека [22, 45]. У крысы в нервных узлах и в ЦНС на уровне продолговатого мозга найдена форма ХАТ с молекулярной массой около 50 кДа, названная периферической, для которой также был отслежен альтернативный сплайсинг мРНК [60]. Физиологический смысл такого количества изоформ ХАТ и механизмы, регулирующие их индукцию, пока не выяснены, равно как и соотношение изоформ ХАТ-69 кДа в субсинаптических компартментах. Предполагается, что изоформы ХАТ или их транскрипты могут варьировать по стабильности или эффективности трансляции или дифференцированно экспрессироваться в ответ на трофические или патологические факторы.

Роль сХАТ и мХАТ в регуляции синтеза и секреции ацетилхолина *in vitro*

Особенности фосфорилирования ХАТ

Вопрос компартиментализации изоформ ХАТ затрудняется также тем, что, как известно, геном не обеспечивает многообразие белковых форм, присутствующих в клетке. В связи с этим особую важность приобрели посттрансляционные белковые модификации. Одним из наиболее изученных путей посттрансляционного влияния на ферменты в ответ на изменения внутриклеточного состояния является фосфорилирование. Ковалентные модификации сериновых, треониновых и тирозиновых остатков в молекулах белков, в том числе это показано для ключевых ферментов синтеза медиаторов тирозингидроксидазы (синтез дофамина), триптофангидроксилазы (синтез серотонина), глутаматдекарбоксилазы (ГАД 65 и ГАД 67, синтез ГАМК), могут динамично менять их физико-химические свойства, регулировать функциональное состояние и взаимодействие с клеточными компонентами [27].

На сегодняшний день считается, что *in vivo* ХАТ существует в виде фосфопротеина. Блокаторы фосфотаз *in vitro* даже в экспериментально нефосфорилируемых условиях (в отсутствие АТФ в среде инкубации) несколько активи-

руют и с-, и мХАТ [55]. Эффекты фосфорилирования на с- и мХАТ различаются даже при неспецифической стимуляции фосфорилирования субстратами АТФ или фосфором. АТФ увеличивала заметно более выраженно специфическую активность мХАТ по сравнению с сХАТ [55]. В состоянии покоя в среде инкубации, обогащенной фосфором, фосфорилировалась с-, но не мХАТ [54]. В этих инкубационных условиях деполяризация вератридином не влияла ни на степень фосфорилирования, ни на активность сХАТ и параллельно активировала, но по-прежнему не фосфорилировала мХАТ. Удаление из среды инкубации ионов Ca^{2+} существенно подавляло фосфорилирование сХАТ и одновременно — специфическую активность м-, но не сХАТ.

ХАТ — субстрат для некоторых протеинкиназ. Аминокислотные последовательности молекулы фермента предполагают существование множества участков для фосфорилирования такими протеинкиназами, как протеинкиназа С (ПКС), альфа- Ca^{2+} /кальмодулин-зависимая киназа II (CaM2), казеинкиназа II (КК2), и некоторыми другими [27]. ХАТ-69 кДа фосфорилируют серин/треонин киназы КК2, ПКС и CaM2 [22–25]. Для ПКС и CaM2 выявлены экспериментально некоторые из позиций серин/треонин остатков, по которым эти протеинкиназы фосфорилируют фермент [22, 23, 25, 27]. Следует отметить, что ПКС и CaM2 являются важными регуляторами нейрональных функций.

В разных исследованиях ПКС активировала с- и мХАТ с переменной эффективностью [23, 24, 55]. Причина была, видимо, в том, что фосфорилирование ХАТ разными изоформами ПКС имеет свои закономерности [22, 23, 25, 27]. Оказалось, что фосфорилирование изоформами ПКС построено по иерархическому принципу. Фосфорилирование:

1) сер-476 не влияло на молекулярные свойства ХАТ, но открывало возможность для фосфорилирования остальных серинов;

2) сер-440 и/или сер-346/347 необходимо для поддержания каталитической активности ХАТ в базальных условиях и при стимулируемой активации фермента;

3) Сер-346/347 также модулировало уровень фосфорилирования ХАТ на других аминокислотных остатках, а сер-440 — инициировало транслокацию ХАТ к клеточным мембранам с образованием ионсвязанной мХАТ.

Кроме того, требовался различный уровень фосфорилирования на одних и тех же участках в базальных и стимулируемых условиях, *in vitro* и *in situ*.

CaM2 и ее ингибирование избирательно регулировали активность мХАТ, не влияя на активность сХАТ [55]. Эти данные косвенно подтвердили эксперименты на суммарной ХАТ (фактически сХАТ), в которой CaM2 фосфорилировала, но не активировала фермент [24]. Дальнейшие исследования показали, что CaM2 активировала суммарную ХАТ только в условиях совместного фосфорилирования фермента CaM2 по тре-456 и ПКС по сер-440 [22]. Предполагается, что ПКС в функции потенцирования эффекта CaM2 драматически вовлечена в патогенез болезни Альцгеймера в проекционных нейронах гиппокампа и неокортекса [22], а инактивация сер-440 — миастенического синдрома в моторных ядрах спинного мозга [49, 50].

Функциональные свойства синаптической сХАТ

При анализе функциональных свойств с- и мХАТ учитывалось, что в исследованиях Р.Т. Carroll, пионера этого направления [12, 58], ХАТ во фракции «NaP» представляла

собой изоформу/изоформы сХАТ [12, 33, 49, 53], а не ионосвязанную мХАТ, как считал автор в некоторых своих работах [59].

Исследования *in vitro* свидетельствуют, что сХАТ регулирует динамическое равновесие между синтезом и распадом ацетилхолина в состоянии покоя [12, 52, 53, 61, 62]. Активация сХАТ в нормальных физиологических условиях происходила при стимуляции медиаторной функции деполяризующими агентами K^+ и/или вератридином [15, 19, 55]. Другим регулятором уровня свободного ацетилхолина является цитозольная ацетилхолинэстераза (сАХЭ), фермент его распада. Предполагается тесное взаимодействие между сХАТ и сАХЭ [19]. В бескальциевой среде, блокирующей квантовый выброс ацетилхолина, активность сХАТ не менялась и избыток ацетилхолина утилизовывала сАХЭ [19, 20].

Из экспериментов *in vitro* следует также, что в прямой зависимости от соотношения активности этих двух цитозольных ферментов находится не квантовая, Ca^{2+} -независимая «утечка» ацетилхолина и продуктов его распада, холина или ацетата [18, 19, 20]. В этих исследованиях в бескальциевой среде K^+ стимуляция вызывала выброс из цитозоля холина вследствие расщепления цитозольного ацетилхолина сАХЭ, а вератридиновая, наряду с холином, могла вызывать освобождение цитозольного ацетилхолина, хотя и менее выраженное. В условиях ингибирования м- и сАХЭ третичным блокатором параоксоном, проникающим через плазматические мембраны, выход холина в бескальциевой среде при вератридиновой стимуляции блокировался и его экстраклеточный уровень заметно истончался. Вместо этого наблюдался выход цитозольного ацетилхолина. На фоне торможения с- и мХАТ селективным ингибитором NVP вератридин в физиологической среде (в присутствии Ca^{2+}) избирательно активировал сХАТ и выход прямо из цитозоля вновь синтезированного ацетилхолина, минуя васкуляризацию. Аналогичный выход ацетилхолина наблюдался в тех же условиях в бескальциевой среде. Концентрация во внеклеточной среде холина или ацетилхолина таким неквантовым способом могла увеличиваться на 40–60%. Холин является естественным селективным агонистом альфа7-подтипа никотиновых холинорецепторов [10, 57]. Таким образом, «утечка» цитозольных холина и/или ацетилхолина, а также изменение их соотношения во внеклеточной среде могут иметь самостоятельное сигнальное значение в межклеточных взаимодействиях.

Функциональные свойства синаптической мХАТ

Функциональный смысл мХАТ долгое время был неясен [44, 51]. Выяснение этого вопроса затруднено отсутствием селективных ингибиторов для с- или мХАТ. Их разделение возможно только препаративными методами субсинаптического фракционирования в сочетании с методами разрушения фракций, содержащих синапсомы, подобными методами, используемым в наших исследованиях. На сегодняшний день доказаны существование мХАТ в виде интегрального белка (стационарная мХАТ) [12, 31], а также обратимая транслокация из цитозоля на синаптические мембраны с образованием ионосвязанной мХАТ [23, 59]. Вклад мХАТ в общую холинергическую активность невелик — по данным литературы, 4–15% [23, 34, 49, 52, 64], из-за чего долгое время предполагали, что связь ХАТ с нейрональными мембранами — артефакт, результат загрязнения остатками синаптоплазмы [33, 61, 64]. По нашим данным, величина мХАТ (стационарная +

ионосвязанная) варьирует в разных синаптических популяциях в пределах 3–21% [2, 4, 68].

In vitro мХАТ, подобно сХАТ, в физиологической среде активировалась в ответ на K^+ или вератридиновую стимуляцию [19, 15, 54, 55]. Накоплен убедительный материал, в том числе на синапсоммах мозга крысы, о непосредственном вовлечении мХАТ в механизмы квантовой секреции ацетилхолина. На это указывает целый ряд морфофункциональных характеристик фермента.

1. мХАТ локализуется на синаптических везикулах [16]. Ее активность, в отличие от сХАТ, зависит от сохранности специфических факторов переноса ацетилхолина в везикулы — везикулярного транспортера и протонного градиента, а также от активности $CaM2$ — основной киназы, ассоциированной с синаптическими везикулами [55]. Активация и торможение мХАТ полностью сопряжены с активацией или, соответственно, блокадой квантового выброса ацетилхолина [19].

2. Выявлен невезикулярный Ca^{2+} -зависимый путь квантовой секреции ацетилхолина [13, 28, 32], в том числе в мозге крысы [37]. Показано, что этот путь обеспечивает самую быструю передачу медиатора структурным белком [29], который назван авторами медиаторофором (mediatorophore) [68]. Медиаторофор функционально сцеплен с ХАТ [14]. Это позволяет предполагать в отношении мХАТ, локализованной на синаптических мембранах, тот же функциональный смысл, что и на везикулах — участие в квантовой секреции ацетилхолина. С предположением согласуется преимущественная чувствительность мХАТ к функциональному состоянию высокоафинного Na^+ -зависимого транспортера холина, который избирательно локализуется на нейрональных мембранах холинергических нейронов [49].

3. мХАТ избирательно чувствительна к балансу ионов — важных регуляторов квантового выброса медиатора и других трансмембранных функций. Контроль квантового выброса ацетилхолина осуществляется при теснейшем взаимодействии баланса ионов Ca^{2+} , H^+ (везикулярный Ca^{2+}/H^+ антипорт), Zn^{2+} и K^+ (K^+ -каналы) [11, 21, 28, 30, 41]. Активность мХАТ избирательно или преимущественно подавлялась в бескальциевой среде [15, 19, 54] и возрастала при высокой концентрации ионов Ca^{2+} и/или K^+ [15, 17–19, 54, 55], дозозависимо подавлялась по мере снижения внутриклеточной концентрации Cl^- [51, 53] и возрастала в условиях повышенной его концентрации и стимуляции хлорной проводимости [51]. Оба механизма квантовой секреции регулируются ионами Zn^{2+} . Высокие концентрации Zn^{2+} блокировали выброс ацетилхолина как из везикул, так и через медиаторофор [30, 47]. Сходным образом от ионов Zn^{2+} зависило направление транслокации ХАТ, так как Zn^{2+} блокировал «заякоривание» ХАТ на мембране [59]. Последний аргумент указывает на вероятность причастности к квантовому выбросу ацетилхолина не только стационарной, но и ионосвязанной мХАТ.

Таким образом, если каталитические свойства с- и мХАТ зависят от способа фосфорилирования и, возможно, от типа сплайсинга, то специфическая активность мХАТ, в отличие от сХАТ, зависит также от ионного окружения и других факторов квантовой секреции ацетилхолина. Очевидно, что компартиментализация фермента обеспечивает вовлечение с- и мХАТ в разные функционально-метаболические циклы, что может способствовать тонкой регуляции медиаторной функции ацетилхолина.

Реакция ХАТ на воздействия *in vivo*

Методические подходы

В течение ряда лет мы изучали реакцию холинергических систем в нервных окончаниях неокортекса, гиппокампа и некоторых других структур мозга крысы на острые воздействия *in vivo*, ишемические (двухсторонняя окклюзия сонных артерий) или гипоксические разной тяжести (гипобарическая гипоксия с парциальным давлением O_2 и продолжительностью: 10%, 60 мин; 6,5% O_2 , 15 мин; 4,5% O_2 , 1–3 мин или 10–20 мин). Состояние холинергических систем оценивали по максимальной активности ХАТ и содержанию белка. Кроме того, в отдельных экспериментальных сериях меряли активность АХЭ или Na^+/K^+ -АТФазы. С активностью Na/K -АТФазы и содержанием белка, универсальными показателями синаптической функции, изменения в активности ХАТ коррелировали в тех случаях, если реакция холинергических синапсов доминировала среди других синаптических популяций в той же фракции синапсосом. Все исследования проводились на субфракциях синаптических мембран и синаптоплазмы, изолированных из фракций синапсосом соответствующих структур мозга. Все показатели рассчитывались на 1 г сырого веса ткани мозга. Сопоставление м- и с-показателей в субфракциях позволяло дифференцировать функциональные, морфо-структурные и количественные изменения в холинергическом синаптическом пуле. Результаты исследований обрабатывали статистически с помощью непараметрического точного метода Фишера, корреляционный анализ проводили по методу Пирсона. Методические процедуры подробно описаны [2, 68].

Во всех исследованиях наиболее реактивной была активность ХАТ, благодаря чему, как правило, и удавалось определять специфику реакции холинергических синапсов на воздействия.

Биохимические эквиваленты активации холинергической медиаторной функции

В острый период как ишемии, так и гипоксии разной тяжести (10%, 6,5%, 4,5% O_2) наблюдалась активация сХАТ (на 17–47%) (рис. 1, а) [3, 4, 67]. В острый период ишемии или/и в условиях критической гипоксической нагрузки наблюдалась активация мХАТ (на 16–25%) или сопряженная активация с- и мХАТ (соответственно на 21 и 17%) (рис. 1, б, в) [3, 4, 67]. При более выраженной активации ХАТ (на 65–70%) одновременно активировалась экстрацеллюлярная мАХЭ (доминирующая изоформа мАХЭ) и подтормаживалась сАХЭ (рис. 1, г, д) [67]. При активации сХАТ выявлялась также положительная корреляция с активацией Na^+/K^+ -АТФазы и отрицательная — со снижением содержания с-белков при одновременном увеличении содержания м-белков (рис. 1, е, ж) [3]. Все эти типы реакции расценивались как отражение активации холинергической функции, поскольку соответствовали характерной для синаптической активации направленности реакции ХАТ и других показателей.

Активация мХАТ, по сравнению с сХАТ, в равных экспериментальных условиях (3 часа ишемии) проявилась в группах крыс, исходно менее устойчивых к гипоксии [67], а в условиях гипоксии разной тяжести — только при максимальной, критической для крысы гипоксической нагрузке (4,5% O_2) [3] и не наблюдалась при умеренной и субкритической гипоксии (6,5 и 10% O_2) [3, 4]. Это, в со-

поставлении с результатами параллельного исследования ультраструктуры синапсов в неокортексе крыс (зависимость выраженности набухания синапсов и синаптических митохондрий от длительности критической гипоксии), привело нас к предположению, что активация мХАТ *in vivo* происходит в условиях нарушения баланса Ca^{2+} , в то время как активация сХАТ инициируется, по-видимому, естественным физиологическим путем, под воздействием нейрональных влияний [3].

Биохимические эквиваленты торможения холинергической медиаторной функции

Не менее активно при ишемических/гипоксических нагрузках проявлялись тормозные реакции ХАТ. Наблюдалось торможение сХАТ (на 17–37%), мХАТ (на 19–38%), или с- и мХАТ одновременно (соответственно на 10–53 и 35–40%), а также отрицательная корреляция между активностью сХАТ и содержанием с-белков или положительная корреляция между активностью мХАТ и содержанием м-белков (рис. 2, а–д) [3, 4, 67]. Снижение активности ХАТ оказалось единственной и выраженной реакцией на критическую гипоксическую нагрузку в мозге интактных крыс (не подвергавшихся предварительному тестированию на устойчивость к гипоксии). Реакция проявилась в шести из восьми исследованных фракций синапсосом (неопубликованные данные). В четырех из них была снижена активность сХАТ (на 28–42%, $p < 0,05–0,025$, $n = 4–5$). В двух остальных фракциях наблюдалось более глубокое падение активности сХАТ (на 56 и 59%, $p < 0,025$, $n = 4$) и одновременно — мХАТ (на 42 и 29%, $p < 0,025$, $n = 4$). В одной из этих фракций значения активности мХАТ положительно коррелировали с содер-

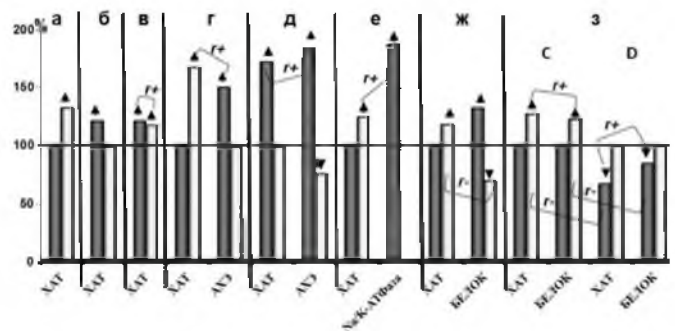


Рис. 1. Примеры активации и трансформации холинергических синапсов при ишемических/гипоксических воздействиях *in vivo*.

В каждой паре столбиков: левый (темный) — субфракция синаптических мембран, правый (светлый) — субфракция синаптоплазмы. Данные выражены в процентах по отношению к значениям в контрольных группах, принятым за 100%. ХАТ — холинацетилтрансфераза; АХЭ — ацетилхолинэстераза. Стрелки обозначены над показателями, определяющими характер функциональных изменений, а направление стрелок — направление изменений показателей; скобки соединяют сопряженные изменения показателей, $r+$ — положительная корреляция, $r-$ — отрицательная корреляция.

а–ж — изменения в активности с- или/и мХАТ и других синаптических показателей (активности с- и мАХЭ, Na^+/K^+ -АТФазы, содержания с- и м-белков), иллюстрирующие активацию холинергической медиаторной функции.

з — активация популяции холинергических синапсов, претерпевших под влиянием умеренной гипоксии трансформацию в морфологический тип, устойчивый к гипоксии; в результате трансформации часть синапсов из тяжелой фракции синапсосом (D) перешла в легкую фракцию (C).

жанием м-белков ($r = +0,970$, $p < 0,05$, $n = 4$), а значения активности сХАТ отрицательно коррелировали с содержанием с-белков ($r = -1,000$, $p < 0,001$, $n = 4$). Реакции такого типа указывали на торможение холинергической функции в соответствии с характерной направленностью реакции ХАТ и других показателей.

Параллельные данные электронной микроскопии (существенное снижение количества синаптических пузырьков, плотно прикрепленных к субсинаптической сети) позволяют предполагать сопряженное падение активности с- и мХАТ как результат глубокого торможения синаптической функции, эквивалента известной из электрофизиологии «депрессии нейронов» — пониженной возбудимости вследствие истощения запасов медиатора и/или его метаболитов [3]. Избирательное торможение мХАТ, как и ее активация, вероятнее всего является следствием нарушения ионного баланса. На основании данных литературы и доминирования гипоксического фактора в наших экспериментах мы полагаем, что падение активности мХАТ в первую очередь связано с накоплением в клетке ионов H^+ [5]. Однако если тяжелая гипоксия вероятнее всего провоцирует ацидоз [3], то в условиях умеренной гипоксии (гипоксическое прекондиционирование) предполагается первичная реакция на гипоксию — увеличение ионов H^+ в концентрациях, подпороговых для инициации клеточного ацидоза, но при которых может нарушаться функция Ca^{++}/H^+ антипорта [4].

Наконец, при ишемическом воздействии был отлежен еще один путь торможения холинергической функции — активация сАХЭ на фоне увеличения содержания с-белков (рис. 2, е) [67]. По-видимому, торможение холинергической функции через механизм активации сАХЭ мы получили в наших более ранних экспериментах [9]. В гипоталамусе наблюдалась выраженная активация АХЭ в условиях активации дофаминергической системы (субхроническое системное введение L-ДОФА), которая обычно оказывает тормозное влияние на холинергическую функцию. Это, а также то, что АХЭ активировалась в отсутствие активации ХАТ, фермента со значительно меньшей эффективностью, не позволили нам сделать заключение об активации холинергической функции.

Биохимические эквиваленты редукции количества холинергических синапсов

Реакция ХАТ и других синаптических показателей может отражать не только функциональные, но также количественные или морфоструктурные преобразования синапсов. Собственно, сами по себе сопряженные активация или торможение с- и мХАТ, если не сопровождаются противоположно направленными изменениями в содержании с-белков, могут отражать изменения в количестве холинергических синапсов — соответственно, синаптогенез (новообразование синапсов) или их элиминацию (ретракцию, редукцию). Острые гипоксические воздействия разной тяжести активно провоцировали редукцию количества синапсов [3, 4]. Показано разными методами, включая неинвазивные с использованием видеотехнологий, что редукция количества синапсов может происходить за время, измеряемое минутами или десятками минут [6, 7, 35, 38, 65]. Мы делали заключение о редукции количества синапсов, когда выявляли однонаправленное сопряженное снижение активности ХАТ и содержания с-белков или с- и м-белков, сопряженных между собой

(рис. 2, ж, з). Учитывая выявленную нами связь между редукцией количества синапсов и фазностью в развитии функциональной реакции синапсов по мере нарастания тяжести гипоксии, мы высказали предположение, что редукция количества синапсов является одним из ранних механизмов переключения нейронов на уровни взаимодействия, адекватные гипоксическому воздействию [3].

Биохимические эквиваленты трансформации холинергических синапсов

Мы наблюдали также увеличение активности сХАТ под действием умеренной гипоксии на мозг интактных крыс, которая сопровождалась возникновением положительной корреляции между значениями сХАТ и с-белков, отсутствующей в группе контрольных животных [4]. Поскольку синаптогенез на столь короткий срок невозможен, то объяснили это как результат трансформации синапсов из одного морфологического типа в другой. Феномен трансформации синапсов был обнаружен на модели аноксии в электронномикроскопических исследованиях в первые минуты воздействия и на всем протяжении 90-минутных экспериментов [6, 7]. В наших опытах наиболее убедительные данные в пользу трансформации были получены в нижних стволовых структурах. Из двух исследованных фракций в «тяжелой» по плотности синапсомом фракции наблюдалось достоверное снижение активности мХАТ и содержания м-белков, а в другой, «легкой» — активация сХАТ и увеличение содержания с-белков (рис. 1, з). При этом снижение м-показателей в «тяжелой» фракции сопровождалось инверсией и установлением отрицательной корреляции с соответствующими с-показателями в «легкой» фракции. Было показано, что смена морфологического типа происходила за счет изменения площади, плотности и конфигурации элементов субсинаптической сети, а также формы синаптической бляшки [8]. Почти все эти параметры могут влиять на плотность синапсов. Все это позволило обосновать, что наименее плотная популяция холинергических синапсов из «тяжелой» фракции трансформировалась в еще менее плотную, в результате чего оказалась в «легкой» фракции синапсомом. Логично было предположить, что трансформация сформировала морфологический тип, более устойчивый к гипоксии.

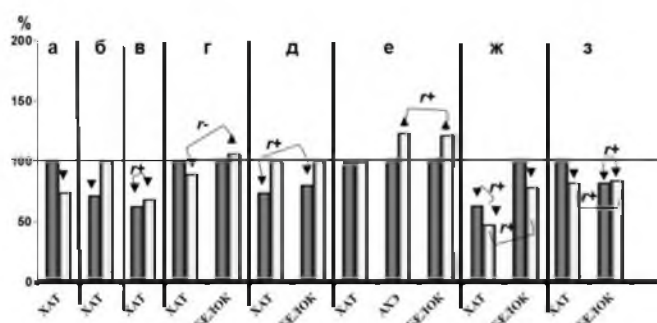


Рис. 2. Примеры торможения и редукции количества холинергических синапсов при ишемических/гипоксических воздействиях *in vivo*. а–е — изменения в активности с- или/и мХАТ и других синаптических показателей (активности с- и мАХЭ, содержания с- и м-белков), иллюстрирующие торможение холинергической медиаторной функции. ж, з — снижение активности с- и мХАТ и содержания с- и м-белков, сопряженных с сХАТ и между собой, иллюстрирующие редукцию количества холинергических синапсов. Остальные обозначения как на рис. 1.

Заключение

Данные *in vitro* о множестве геномных и протеомных факторов, влияющих на каталитические свойства фермента и тесной функциональной связи между ферментом и секрецией медиатора, свидетельствуют не только о ключевой роли ХАТ в синтезе ацетилхолина, но и позволяют предполагать изменения в каталитической активности с- и мХАТ как эквивалент соответствующих изменений секреторной функции. Наши данные демонстрируют высокую реактивность как сХАТ, так и мХАТ в ответ на воздействия *in vivo*. Это, а также особенности проявления ферментной активности в зависимости от компартиментализации фермента, свидетельствует в пользу физиологичности функциональных свойств с- и мХАТ, выявленных *in vitro*. Кроме того, исследования ХАТ на субсинаптическом уровне позволяют использовать ее как биомаркер и при сопоставлении с другими синаптическими показателями, в первую очередь с содержанием с-белков, дифференцировать функциональные, количественные и морфо-структурные изменения в холинергическом синаптическом пуле.

Список литературы

1. Захаров В.В., Хатиашвили И.Т., Яхно Н.Н. Деменция с телами Леви // Неврологический журнал. — 1998. — №6. — С. 7—11.
2. Захарова Е.И., Дудченко А.М., Свинов М.М. и др. Сравнительная характеристика холинергических систем мозга крыс с низкой и высокой устойчивостью к кислородной недостаточности // Нейрохимия. — 2001. — Т. 18, №2. — С. 119—131.
3. Захарова Е.И., Дудченко А.М., Свинов М.М. и др. Холинергические системы мозга крыс и нейрональная реорганизация в условиях острой гипоксии // Нейрохимия. — 2010. — Т. 27, №4. — С. 322—336.
4. Захарова Е.И., Германова Э.Л., Копаладзе Р.А., Дудченко А.М. Центральные холинергические системы в механизмах гипоксического прекодиционирования: многообразие путей синаптической реорганизации *in vivo* // Нейрохимия. — 2013. — Т. 30, №1. — С. 52—63.
5. Самойлов М.О. Реакции нейронов мозга на гипоксию. — Л.: Наука, 1985. — 190 с.
6. Семченко В.В., Степанов С.С. Эффект гипоксии на структуру пресинаптической сети межнейронных контактов в неокортексе крыс // Цитология. — 1985. — Т. 27, №11. — С. 1235—1239.
7. Семченко В.В., Степанов С.С. Электронномикроскопическое, цитохимическое и морфометрическое исследование синапсов коры головного мозга в постморальном аутолизе // Бюл. экпер. биол. — 1986. — Т. 102, №7. — С. 100—102.
8. Семченко В.В., Степанов С.С. Система субсинаптических единиц как универсальной системойобразующий и регуляторный фактор синапсов головного мозга // Бюл. экпер. биол. — 1997. — Т. 124, №7. — С. 4—12.
9. Цайнер Б., Орлова Е.И., Беличенко П.В. К биохимическим аспектам патогенеза вегетативных и эмоциональных нарушений при дисфункции дофаминовой системы // Ж. невропатол. и психиатр. — 1991. — Т. 91, №12. — С. 39—43.
10. Alkondon M., Pereira E.F., Cortes W.S. et al. Choline is a selective agonist of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in the rat brain neurons // Eur. J. Neurosci. — 1997. — Vol. 9. — P. 2734—2742.
11. Bancila V., Nikonenko I., Dunant Y. et al. Zinc inhibits glutamate release via activation of pre-synaptic K channels and reduces ischaemic damage in rat hippocampus // J. Neurochem. — 2004. — Vol. 90, №5. — P. 1243—1250.
12. Benishin C.G., Carroll P.T. Multiple forms of choline-O-acetyltransferase in mouse and rat brain: solubilization and characterization // J. Neurochem. — 1983. — Vol. 41, №4. — P. 1030—1039.
13. Birman S., Israel M., Lesbats B. et al. Solubilization and partial purification of a presynaptic membrane protein ensuring calcium-dependent acetylcholine release from proteoliposomes // J. Neurochem. — 1986. — Vol. 47, №2. — P. 433—444.
14. Bloc A., Bugnard E., Dunant Y. et al. Acetylcholine synthesis and quantal release reconstituted by transfection of mediator and choline acetyltransferase cDNAs // Eur. J. Neurosci. — 1999. — Vol. 11, №5. — P. 1523—1534.
15. Carroll P.T. Veratridine-induced activation of choline-O-acetyltransferase activity in rat hippocampal tissue: relationship to the veratridine-induced release of acetylcholine // Brain Res. — 1987. — Vol. 414, №2. — P. 401—404.
16. Carroll P.T. Membrane-bound choline-O-acetyltransferase in rat hippocampal tissue is associated with synaptic vesicles // Brain Res. — 1994. — Vol. 633, №1—2. — P. 112—118.
17. Carroll P.T. Evidence to suggest that cytosolic acetylcholine in rat hippocampal nerve terminals is not directly transferred into synaptic vesicles for release // Brain Res. — 1996. — Vol. 725, №1. — P. 3—10.
18. Carroll P.T. Evidence to suggest that extracellular acetate is accumulated by rat hippocampal cholinergic nerve terminals for acetylcholine formation and release // Brain Res. — 1997. — Vol. 753, №1. — P. 47—55.
19. Carroll P.T., Badamchian M., Craig P., Lyness W.H. Veratridine-induced breakdown of cytosolic acetylcholine in rat hippocampal minces: an intraterminal form of acetylcholinesterase or choline O-acetyltransferase? // Brain Res. — 1986. — Vol. 383, №1—2. — P. 83—99.
20. Carroll P.T., Benishin C.G. Depolarization of mouse forebrain minces with veratridine and high K⁺: failure to stimulate the Ca²⁺ independent, spontaneous release of acetylcholine from the cytoplasm due to hydrolysis of the acetylcholine stored there // Brain Res. — 1984. — Vol. 291, №2. — P. 261—272.
21. Cordeiro J.M., Goncalves P.P., Dunant Y. Synaptic vesicles control the time course of neurotransmitter secretion via a Ca²⁺/H⁺ antiport // J. Physiol. — 2011. — Vol. 589. — Pt. 1. — P. 149—167.
22. Dobransky T., Brewer D., Lajoie G. et al. Phosphorylation of 69-kD choline acetyltransferase at threonine-456 in response to short-term exposure to amyloid- β peptide 1-42 // J. Biol. Chem. — 2003. — Vol. 278, №8. — P. 5883—5893.
23. Dobransky T., Davis W.L., Rylett R.J. Functional Characterization of Phosphorylation of 69-kDa Human Choline Acetyltransferase at Serine 440 by Protein Kinase C // J. Biol. Chem. — 2001. — Vol. 276. — Issue 25. — P. 22244—22250.
24. Dobransky T., Davis W.L., Xiao G.H. et al. Expression, purification and characterization of recombinant human choline acetyltransferase: phosphorylation of the enzyme regulates catalytic activity // Biochem. J. — 2000. — Vol. 349. — Pt. 1. — P. 141—145.
25. Dobransky T., Doherty-Kirby A., Kim A.R. et al. Protein kinase-C isoforms differentially phosphorylate human choline acetyltransferase regulating its catalytic activity // J. Biol. Chem. — 2004. — Vol. 279, №50. — P. 52059—52068.
26. Dobransky T., Rylett R.J. Functional regulation of choline acetyltransferase by phosphorylation // Neurochem Res. — 2003. — Vol. 28, №3—4. — P. 537—542.
27. Dobransky T., Rylett R.J. Protein kinase C isoforms differentially phosphorylate human choline acetyltransferase regulating its catalytic activity // J. Neurochem. — 2005. — Vol. 95, №2. — P. 305—313.
28. Dunant Y., Cordeiro J.M., Goncalves P.P. Exocytosis, mediator, and vesicular Ca²⁺/H⁺ antiport in rapid neurotransmission // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 2009. — Vol. 1152. — P. 100—112.
29. Dunant Y., Israel M. Neurotransmitter release at rapid synapses // Biochimie. — 2000. — Vol. 82, №4. — P. 289—302.
30. Dunant Y., Loctin F., Vallee J.P. et al. Activation and desensitization of acetylcholine release by zinc at Torpedo nerve terminals // Pflugers Arch. — 1996. — Vol. 432, №5. — P. 853—858.
31. Eder-Colli L., Briand P.A., Dunant Y. Membrane-bound choline acetyltransferase of the torpedo has characteristics of an integral membrane protein and can be solubilized by proteolysis // Brain Res. — 1992. — Vol. 573, №2. — P. 284—292.
32. Falk-Vairant J., Correges P., Eder-Colli L. et al. Quantal acetylcholine release induced by mediator transfection // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1996. — Vol. 93, №11. — P. 5203—5207.
33. Fonnum F. The 'compartmentation' of choline acetyltransferase within the synaptosome // Biochem. J. — 1967. — Vol. 103, №1. — P. 262—270.
34. Fonnum F., Malthe-Sorensen D. Membrane affinities and subcellular distribution of the different molecular forms of choline acetyltransferase from rat // J. Neurochem. — 1973. — Vol. 20, №5. — P. 1351—1359.

35. Gallo G. RhoA-kinase coordinates F-actin organization and myosin II activity during semaphorin-3A-induced axon retraction // *J. Cell Sci.* — 2006. — Vol. 119. — Pt. 16. — P. 3413–3423.
36. Gill S.K., Ishak M., Dobransky T. et al. 82-kDa choline acetyltransferase is in nuclei of cholinergic neurons in human CNS and altered in aging and Alzheimer disease // *Neurobiol. Aging.* — 2007. — Vol. 28, №7. — P. 1028–1040.
37. Israel M., Lesbats B., Morel N. et al. Is the acetylcholine releasing protein mediato-phore present in rat brain? // *FEBS Lett.* — 1988. — Vol. 233, №2. — P. 421–426.
38. Keck T., Scheuss V., Jacobsen R.I. et al. Loss of sensory input causes rapid structural changes of inhibitory neurons in adult mouse visual cortex // *Neuron.* — 2011. — Vol. 71, №5. — P. 869–882.
39. Kengaku M., Misawa H., Deguchi T. Multiple mRNA species of choline acetyltransferase from rat spinal cord // *Brain Res. Mol. Brain Res.* — 1993. — Vol. 18, №1–2. — P. 71–76.
40. Matsuo A., Bellier J.P., Nishimura M. et al. Nuclear choline acetyltransferase activates transcription of a high-affinity choline transporter // *J. Biol. Chem.* — 2011. — Vol. 286, №7. — P. 5836–5845.
41. Medvedeva Y.V., Lin B., Shuttleworth C.W. et al. Intracellular Zn²⁺ accumulation contributes to synaptic failure, mitochondrial depolarization, and cell death in an acute slice oxygen-glucose deprivation model of ischemia // *J. Neurosci.* — 2009. — Vol. 29, №4. — P. 1105–1114.
42. Misawa H., Matsuura J., Oda Y. et al. Human choline acetyltransferase mRNAs with different 5'-region produce a 69-kDa major translation product // *Mol. Brain Res.* — 1997. — Vol. 44. — P. 323–433.
43. Nardone R., De Blasi P., Seidl M. et al. Cognitive function and cholinergic transmission in patients with subcortical vascular dementia and microbleeds: a TMS study // *J. Neural Transm.* — 2011. — Vol. 118, №9. — P. 1349–1358.
44. Oda Y. Choline acetyltransferase: the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system // *Pathol. Int.* — 1999. — Vol. 49, №11. — P. 921–937.
45. Ohno K., Tsujino A., Brengman J.M. et al. Choline acetyltransferase mutations cause myasthenic syndrome associated with episodic apnea in humans // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2001. — Vol. 98. — P. 2017–2022.
46. Pahud G., Salem N., van de Goor J. et al. Study of subcellular localization of membrane-bound choline acetyltransferase in *Drosophila* central nervous system and its association with membranes // *Eur. J. Neurosci.* — 1998. — Vol. 10, №5. — P. 1644–1653.
47. Parducz A., Correges P., Sors P. et al. Zinc blocks acetylcholine release but not vesicle fusion at the Torpedo nerve-electroplate junction // *Eur. J. Neurosci.* — 1997. — Vol. 9, №4. — P. 732–738.
48. Resende M.C., Dobransk T., Ferguson S.S.G. et al. Nuclear localization of the 82-kDa form of human choline acetyltransferase // *J. Biol. Chem.* — 1999. — Vol. 274. — P. 19417–19421.
49. Rylett R.J. Synaptosomal «membrane-bound» choline acetyltransferase is most sensitive to inhibition by choline mustard // *J. Neurochem.* — 1989. — Vol. 52, №3. — P. 869–875.
50. Rylett R.J., Goddard S., Lambro A. Regulation of expression of cholinergic neuronal phenotypic markers in neuroblastoma LA-N-2 // *J. Neurochem.* — 1993. — Vol. 61. — P. 1388–1397.
51. Rylett R.J., Schmidt B.M. Regulation of the synthesis of acetylcholine // *Prog. Brain Res.* — 1993. — Vol. 98. — P. 161–166.
52. Salem N., Medilanski J., Pellegrinelli N. et al. Hydrophilic and amphiphilic forms of *Drosophila* choline acetyltransferase are encoded by a single mRNA // *Eur. J. Neurosci.* — 1994. — Vol. 6, №5. — P. 737–745.
53. Schmidt B.M., Rylett R.J. Basal synthesis of acetylcholine in hippocampal synaptosomes is not dependent upon membrane-bound choline acetyltransferase activity // *Neuroscience.* — 1993a. — Vol. 54, №3. — P. 649–656.
54. Schmidt B.M., Rylett R.J. Phosphorylation of rat brain choline acetyltransferase and its relationship to enzyme activity // *J. Neurochem.* — 1993b. — Vol. 61, №5. — P. 1774–1781.
55. Sha D., Jin H., Kopke R.D. et al. Choline acetyltransferase: regulation and coupling with protein kinase and vesicular acetylcholine transporter on synaptic vesicles // *Neurochem. Res.* — 2004. — Vol. 29, №1. — P. 199–207.
56. Shin J., Choi S., Lee J.E. et al. Subcortical white matter hyperintensities within the cholinergic pathways of Parkinson's disease patients according to cognitive status // *J. Neurol. Neurosurg Psychiatry.* — 2012. — Vol. 83, №3. — P. 315–321.
57. Si M.L., Lee T.J. Alpha7-nicotinic acetylcholine receptors on cerebral perivascular sympathetic nerves mediate choline-induced nitroergic vasodilation // *Circ. Res.* — 2002. — Vol. 91, №1. — P. 62–69.
58. Smith C.P., Carroll P.T. A comparison of solubilized and membrane bound forms of choline-O-acetyltransferase (EC 2.3.1.6) in mouse brain nerve endings // *Brain Res.* — 1980. — Vol. 185, №2. — P. 363–371.
59. Smith L.K., Carroll P.T. Membrane-bound choline-O-acetyltransferase in rat hippocampal tissue is anchored by glycosyl-phosphatidylinositol // *Brain Res.* — 1993. — Vol. 605, №1. — P. 155–163.
60. Tooyama I., Kimura H. A protein encoded by an alternative splice variant of choline acetyltransferase mRNA is localized preferentially in peripheral nerve cells and fibers // *J. Chem. Neuroanat.* — 2000. — Vol. 17, №4. — P. 217–226.
61. Tucek S. Regulation of Acetylcholine Synthesis in the Brain // *J. Neurochem.* — 1985. — Vol. 44, №1. — P. 11–24.
62. Tucek S. The synthesis of acetylcholine: Twenty years of progress // *Prog. Brain Res.* — 1990. — Vol. 84. — P. 467–477.
63. Wang J., Zhang H.Y., Tang X.C. Cholinergic deficiency involved in vascular dementia: possible mechanism and strategy of treatment // *Acta Pharmacol. Sin.* — 2009. — Vol. 30, №7. — P. 879–888.
64. Whittaker V.P., Michaelson I.A., Kirkland A. The separation of synaptic vesicles from nerve-ending particles ('synaptosomes') // *Biochem. J.* — 1964. — Vol. 90. — P. 293–303.
65. Woods G.F., Oh W.C., Boudewyn L.C. et al. Loss of PSD-95 enrichment is not a prerequisite for spine retraction // *J. Neurosci.* — 2011. — Vol. 31, №34. — P. 12129–12138.
66. Yarnall A., Rochester L., Burn D.J. The interplay of cholinergic function, attention, and falls in Parkinson's disease // *Mov. Disord.* — 2011. — Vol. 26, №14. — P. 2496–2503.
67. Zakharova E.I., Storozheva Z.I., Germanova E.L. et al. Characteristics of cholinergic and cognitive functions in rats with individual resistance to the cerebral ischemia // «Adaptation Biol. Med. (Vol. 5: Health Potentials)». — New Delhi, India: Narosa Publishing House Pvt. Ltd., 2008. — P. 122–141.
68. Zakharova E.I., Storozheva Z.I., Dudchenko A.M. et al. Chronic cerebral ischemia forms new mechanisms of learning and memory // *Int. J. Alzheimers Dis.* — 2010. — P. 954589.

Choline acetyltransferase and its role in regulation of an exchange and secretion of acetylcholine

Zakharova E.I., Dudchenko A.M.

Institute of General Pathology and Pathophysiology, 8, Baltiyskaya str., 125315, Moscow, Russia

The review of modern concepts concerning forms of choline acetyltransferase (ChAT) and localization dependent factors of regulation of activity synaptic ChAT is presented. It is supported that the compartmentalization of enzyme delimits involvement of ChAT in different functional and metabolic cycles. Correlation of reaction at in vitro and in vivo experiments of soluble and membrane-bound ChAT is shown, and also a variety of the functional effects on cholinergic synapses in vivo.

Key words: *synaptoplasm and synaptic membranes, soluble and membrane-bound choline acetyltransferase, quantized and unquantized secretion of acetylcholine*