

РЕГУЛЯЦИЯ Ca^{2+} -АТФ-азы ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН

© 2003 г. Н. Б. ПЕСТОВ, Р. И. ДМИТРИЕВ,
М. И. ШАХПАРОНОВ

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шенякина и
Ю. А. Овчинникова РАН, Москва*

I. Введение. II. Структура РМСА. III. Общая функциональная характеристика РМСА. IV. Регуляция активности РМСА аутоингибиторными доменами: связывание кальмодулина и кислых фосфолипидов, ограниченный протеолиз и олигомеризация. V. Другие модуляторы активности РМСА и проблема поиска высокоспецифичного ингибитора. VI. Особенности регуляции различных изоформ РМСА. VII. Регуляция содержания РМСА в клетке и биомедицинские аспекты ее регуляции. VIII. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Многие процессы жизнедеятельности эукариотической клетки контролируются при помощи кальциевой сигнализации, основанной на низкой концентрации цитоплазматического Ca^{2+} в покоящейся клетке. В процессе выведения Ca^{2+} за пределы клетки важнейшую роль играет Ca^{2+} -АТФ-аза плазматических мембран (РМСА) – ионный насос, способный переносить Ca^{2+} против 10000-кратного градиента.

РМСА принадлежит к АТФ-азам Р-типа, называемым так из-за образования фосфорилированного интермедиата (ацилфосфата) во время рабочего цикла. Помимо РМСА, у животных известны еще два вида Ca^{2+} -АТФ-аз Р-типа: Ca^{2+} -АТФ-аза сарко-эндоплазматического ретикулума (SERCA) и Ca^{2+} -АТФ-аза секреторного пути (SPCA), которая помимо Ca^{2+} способна переносить также и Mn^{2+} . Выброс Ca^{2+}

Принятые сокращения: а.о. – аминокислотные остатки; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; МА – моноклональное антитело; NCX – $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменник ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger); PIP – фосфатидилинозит-4-фосфат; РМСА – Ca^{2+} -АТФ-аза плазматических мембран (plasma membrane Ca^{2+} -ATP-ase); SERCA – Ca^{2+} -АТФ-аза сарко-эндоплазматического ретикулума (sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATP-ase); SPCA – Ca^{2+} -АТФ-аза секреторного пути (secretory pathway Ca^{2+} -ATP-ase).

Адрес для корреспонденции: e-mail: korn@mail.ibch.ru

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 01-04-48458).

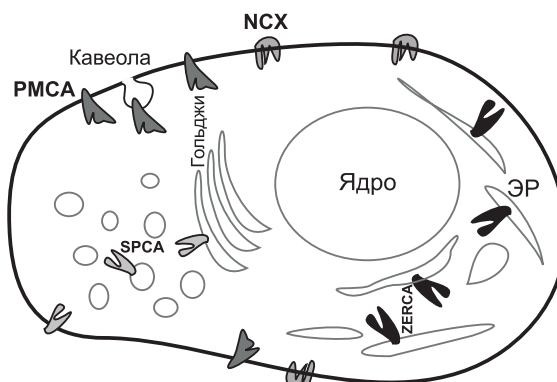


Рис. 1. Иллюстрация внутриклеточного расположения основных систем активного транспорта Ca^{2+} .

В эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) расположена SERCA. В плазматической мембране присутствуют PMCA и NCX. SPCA присутствует в комплексе Гольджи, секреторных пузырьках и плазматической мембране.

из клетки наряду с PMCA осуществляет $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник (NCX), а регулируемый вход Ca^{2+} опосредуется различными Ca^{2+} -каналами (рис. 1).

Регуляция систем активного транспорта Ca^{2+} весьма разнообразна. Следует отметить, что PMCA в этом отношении наиболее интересна, поскольку в ее структуре содержится два регуляторных, аутоингибиторных домена, отсутствующие у SERCA и SPCA. Количество генов и сплайс-вариантов PMCA также больше, чем у других Ca^{2+} -АТФ-аз. В силу такой сложности, а также и в силу меньшей доступности в высокоочищенном виде, PMCA изучена не так хорошо, как SERCA.

II. СТРУКТУРА PMCA

По всей вероятности, PMCA имеет только одну белковую субъединицу, поскольку в высокоочищенных препаратах PMCA при электрофоретическом анализе наблюдается только одна интенсивная полоса [162]. Считается, PMCA не имеет таких модификаций, как гликозилирование, однако это не было строго доказано. Напротив, тот факт, что очищенная PMCA сердца крысы ингибируется при обработке нейраминидазой может быть косвенным указанием на наличие гликозилирования [261].

Полипептидная цепь PMCA содержит около 1200 аминокислотных остатков (135–140 кДа). Клонирование кДНК PMCA млекопитающих, определение нуклеотидной и вывод соответствующей аминокислотной последовательности впервые осуществлены в 1988 году

[203, 233], причем сразу обнаружилось существование нескольких изоформ, количество которых позднее возросло до четырех [36, 41, 101, 124, 210].

С точки зрения гомологии первичной структуры, РМСА выделяется в отдельное семейство среди АТФ-аз Р-типа. Сходство первичных структур белков различных организмов, как правило, достаточно для отнесения к семейству РМСА. По-видимому РМСА присутствует во всех эукариотах. Среди различных АТФ-аз Р-типа РМСА наиболее гомологична SERCA и H^+ -АТФ-азе растений и, в меньшей степени, Na^+ , K^+ -АТФ-азе.

На основании анализа профилей гидрофобности была предложена схема укладки полипептидной цепи РМСА в мембране [42, 169], предполагающая наличие 10 трансмембранных столбов. Большая часть (80%) молекулы ориентирована в цитоплазму, и только короткие петли экспонированы наружу клетки. Благодаря этому РМСА имеет компактную мембранную, небольшую внеклеточную и большую, сильно вытянутую внутриклеточную части. Хотя и с очень низким разрешением, подобное изображение РМСА получено при помощи атомно-силовой микроскопии [122]. Определение трехмерной структуры РМСА с высоким разрешением пока сильно затрудняется из-за общих трудностей кристаллизации мембранных белков и низкой доступности больших количеств РМСА, хотя попытки кристаллизации РМСА уже предпринимались [173].

Трехмерная структура другой Ca^{2+} -АТФ-азы, SERCA скелетных мышц кролика, недавно установлена с высоким разрешением при помощи рентгеновской кристаллографии в двух конформациях [27, 228]. Гомология консервативных доменов Ca^{2+} -АТФ-аз достаточно высока, чтобы предполагать общее сходство структур РМСА и SERCA. Однако полная аналогия РМСА и SERCA вряд ли уместна из-за наличия у РМСА дополнительных участков (гораздо больший размер цитоплазматической петли между 2 и 3 трансмембранными участками и С-концевой домен, в которых находятся участки связывания кислых фосфолипидов и кальмодулина, соответственно). На рис. 2. представлена структура SERCA в комплексе с Ca^{2+} (1EUL, [228]) в которой указано приблизительное расположение «черных пятен» — аутоингибиторных доменов, присутствие которых является наиболее характерной отличительной чертой РМСА. Всего в структуре SERCA выделяется три больших цитоплазматических домена, два из которых образованы петлей между трансмембранными участками 4 и 5. В домене Р находится сайт фосфорилирования, в домене N — сайт связывания АТФ. Домен А образован N-концевым участком и петлей между трансмембранными участками 2 и 3.

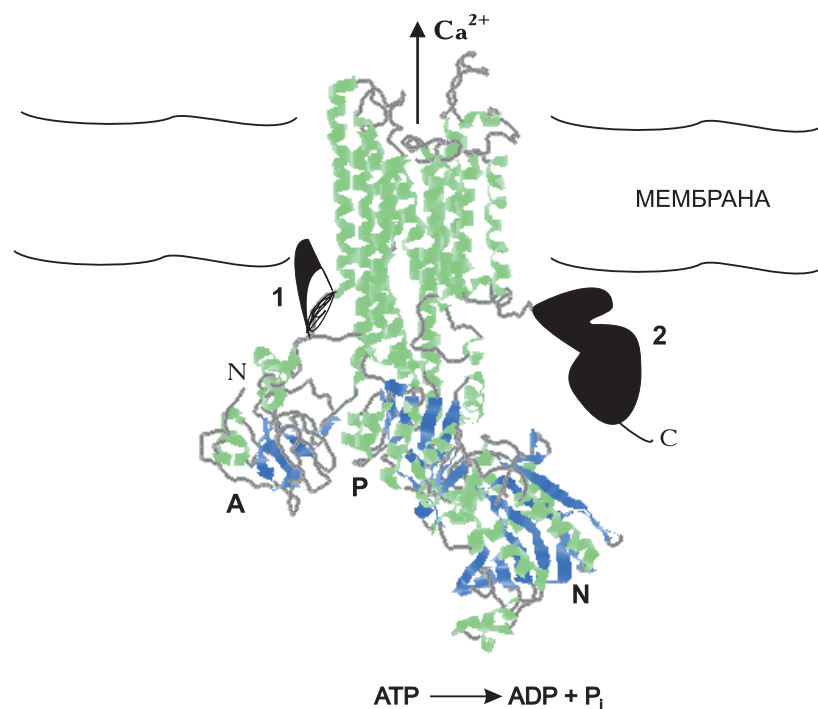


Рис. 2. Трехмерная структура Ca^{2+} -АТФ-аз Р-типа.

В структуре SERCA, установленной Тойошимой с соавт. [226, 227], схематически показано расположение дополнительных участков, присутствующих только в PMCA: аутоингибиторный домен 1 (связывающий кислые фосфолипиды) и аутоингибиторный домен 2 (связывающий кальмодулин). А, N, P – большие цитоплазматические домены.

Различие структур Ca^{2+} -связанной и свободной от Ca^{2+} SERCA [227] позволяет заключить, что в Ca^{2+} -АТФ-азах диссоциация Ca^{2+} ассоциирована с компактизацией цитоплазматической части фермента за счет взаимодействий А–N и А–P. При этом происходят также значительные перестройки внутри трансмембранного домена. Все это должно быть верно и для PMCA, но и в этом случае вряд ли стоит предполагать полное сходство SERCA и PMCA. Во-первых, стехиометрия транспорта Ca^{2+} различается (SERCA переносит два Ca^{2+} на один гидролизованный АТФ, а PMCA – только один), во-вторых, в PMCA отсутствует часть кислых остатков, связывающих Ca^{2+} внутри трансмембранного домена SERCA.

Нельзя исключить, что *in vivo* РМСА может содержать и небелковые компоненты. Здесь следует упомянуть об интересном открытии, пока неподтвержденном в работах других авторов – детекции в препаратах очищенной РМСА поли(3-гидроксibuтирата) и полифосфата [183]. Комплекс этих веществ присутствует в мембранах многих клеток, в частности, в бактериях они образуют потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы. В той же работе показано, что РМСА функционирует и как полифосфаткиназа. Однако в настоящее время еще совершенно не понятно, как такая активность может быть связана с АТФ-азной и Ca^{2+} -транспортирующей активностями РМСА. Если данное открытие не артефакт, то поли(3-гидроксibuтират) и полифосфат могут неизвестным пока способом регулировать активность РМСА.

III. ОБЩАЯ ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РМСА

Наиболее хорошо изучены свойства РМСА эритроцитов человека. Поскольку эти клетки практически лишены внутриклеточных компартментов, в них РМСА является единственной Ca^{2+} -зависимой АТФ-азой, что позволяет использовать для функциональных экспериментов грубые препараты мембран («тени» – лизированные эритроциты). Это также позволяет выделять активную РМСА высокой степени чистоты из солюбилизатов теней эритроцитов при помощи аффинной хроматографии на иммобилизованном кальмодулине [162].

Располагаясь в цитоплазматической мембране, РМСА связывает ионы Ca^{2+} и переносит их за пределы клетки, используя энергию АТФ. Общая схема рабочего цикла РМСА аналогична всем АТФ-азам Р-типа (рис. 3). Фермент активируется связыванием Ca^{2+} (K_d около $1 \cdot 10^{-7}$ [132]). В Ca^{2+} -связанной форме РМСА фосфорилируется Mg^{2+} -АТФ, причем этот процесс имеет две (быструю и медленную)

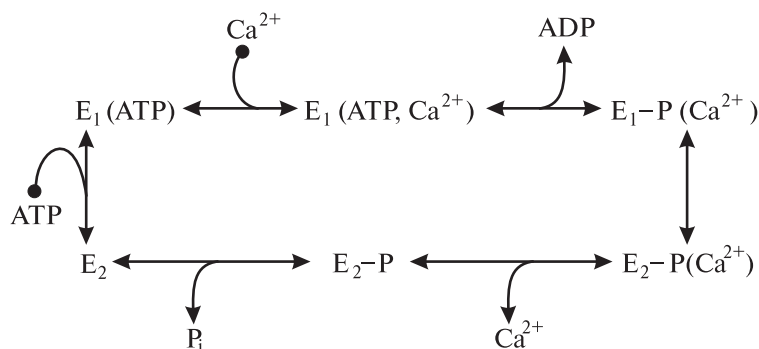


Рис. 3. Схема рабочего цикла РМСА.

фазы [39]. Затем от фосфорилированного фермента отщепляется Ca^{2+} на другой стороне мембраны (что соответствует состоянию с низкой аффинностью к Ca^{2+} – K_d около $2 \cdot 10^{-3}$). Скорость-лимитирующей стадией реакционного цикла считается отщепление фосфата, т.е. гидролиз фосфофермента. Поскольку для процесса также необходимо присутствие магния [110], то РМСА ранее нередко называли $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТР-азой. Удельная АТР-азная активность очищенной РМСА – 3,8–6 мкмоль/мг·мин [162, 134].

РМСА способна гидролизовать ИТР, СТР, ГТР, УТР, но только гидролиз АТР может быть сопряжен с транспортом Ca^{2+} [78, 261].

Оптимальная концентрация Ca^{2+} для измерения АТР-азной активности РМСА *in vitro* – 10^{-4} М для препаратов мембран и 10^{-4} – 10^{-6} М для очищенной РМСА и комплекса кальмодулин–РМСА [134]. Результаты измерения кинетических констант у разных авторов несколько отличаются друг от друга. Получены $K_{m/\text{Ca}}$ – 14 мкМ (в присутствии кальмодулина – 0,9 мкМ) для очищенной РМСА эритроцитов человека [161]; $K_{m/\text{Ca}}$ – 20 мкМ (в присутствии кальмодулина – 0,3 мкМ) и $K_{m/\text{АТР}}$ – 30 мкМ для РМСА сарколеммы сердца собаки [50], но для сарколеммы сердца свиньи: $K_{m/\text{Ca}}$ – 0,88 мкМ и $K_{m/\text{АТР}}$ – 0,45 мМ [5], для миомерия $K_{m/\text{Ca}}$ 0,17 мкМ [2]. Таким образом, физиологические колебания внутриклеточного Ca^{2+} , транспортируемого субстрата, сильно изменяют скорость РМСА; фермент активируется при поступлении Ca^{2+} в цитоплазму. Напротив, концентрация внутриклеточного АТР достаточна для активности РМСА, близкой к максимальной, и истощение АТР в работающей живой клетке существенно не влияет на скорость РМСА [65].

При рассмотрении других реакций, катализируемых РМСА, прежде всего надо отметить способность фермента катализировать циклическую реакцию обмена фосфата, что характерно для всех АТР-аз Р-типа:



Для этой реакции требуется высокая концентрация Ca^{2+} , при 10 мМ Ca^{2+} скорости циклической и АТР-азной реакций равны [134]. Обнаружено, что в нативных пузырьках мембран почки Ca^{2+} -ионофор А23187 ингибирует циклическую реакцию, катализируемую РМСА [235]. Поэтому авторы предположили, что для реакции обмена фосфата необходима доступность Ca^{2+} с внеклеточной стороны фермента.

Как и другие АТР-азы Р-типа, РМСА в конформации E_2 обладает фосфатазной активностью (измеряемой по гидролизу *n*-нитрофенилфосфата) [91]. Эта активность стимулируется в 20 раз DMSO, в то время как Ca^{2+} может ее как ингибировать [91], так и активировать (в присутствии глицерина) [20].

PMCA, как и SERCA, способна катализировать и обратную реакцию – синтез АТФ как в присутствии, так и в отсутствие градиента Ca^{2+} [58, 84]. Фосфорилирования PMCA неорганическим фосфатом удается достичь при помощи инкубации в присутствии Mg^{2+} /EGTA/30% DMSO. DMSO совершенно необходим, по-видимому, для понижения активности воды в каталитическом центре фермента (для снижения скорости гидролиза ацилфосфата). После удаления DMSO и добавления Ca^{2+} фосфофермент способен фосфорилировать ADP.

Фосфат в концентрации 10 мМ активировал АТФ-азную активность PMCA в 2,5 раза [242], таким образом, эффективность транспорта Ca^{2+} PMCA зависит также от анионного состава среды. Но здесь необходимо отметить, что в живой клетке доступны самые различные анионы, поэтому вряд ли такая зависимость имеет физиологическое значение.

Реконструированная в липосомах PMCA способна транспортировать 31 нмоль Ca^{2+} /мг·мин [50]. Интересно оценить способность PMCA транспортировать Ca^{2+} в живой клетке. При экспериментах на модельном объекте, закрытых теньях эритроцитов, PMCA активируется при повышении «внутриклеточного» Ca^{2+} в диапазоне 1–10 мкМ и максимальная скорость работы PMCA достигает 1,3 мкМ Ca^{2+} /мин [254]. При экспериментах с такими же тенями, но при помощи более тонких методов (микрофотолиз временно заблокированного фоточувствительного АТФ в тени единственного эритроцита) получены следующие значения: V_{max} 1 мкМ/мин и $K_{m,Ca}$ 4 мМ [138]. Поскольку объем тени составляет около 65 фл, то содержащаяся в одном эритроците PMCA способна эвакуировать 39000 ионов Ca^{2+} в сек [138]. Содержание PMCA в общем белке мембран эритроцитов – примерно 0,1% [127], т.е. каждый эритроцит имеет около 400–7200 молекул PMCA [127]. Таким образом, согласно микроизмерениям способность молекулы PMCA в нативной мембране эритроцита транспортировать Ca^{2+} находится в пределах от 5 до 100 ионов в секунду [138], а согласно макроскопическим экспериментам – около 50 [94, 109].

Существует также гипотеза о возможном функционировании PMCA как Ca^{2+} канала, допускающего утечку Ca^{2+} , а именно канала типа В [22]. В самом деле, в очищенной и реконструированной в липосомах PMCA присутствуют Ca^{2+} - и Ba^{2+} -каналы, активируемые хлорпромазином в присутствии кальмодулина или ванадата [175], т.е. весьма сходные с наблюдаемыми свойствами каналов типа В сарколеммы сердца.

По всей видимости, PMCA транспортирует не только Ca^{2+} , но, в противоположном направлении, и протон, т.е. PMCA является Ca^{2+}/H^{+} -АТФ-азой. Например, возможно прямо детектировать закис-

ление среды вокруг РМСА-содержащих липосом [163]. Также, небольшое закисление среды (до pH 6,0) активирует выброс Ca^{2+} из интактных эритроцитов [252]. Защелачивание, напротив, оказывает на РМСА весьма сложное действие, — может наблюдаться как увеличение, так и уменьшение выброса Ca^{2+} [125, 253].

Какова стехиометрия транспорта? Давно выдвинуто предположение, что РМСА переносит Ca^{2+} электрогенно [98, 242]. Однако в липосомах с работающей РМСА не накапливается проницаемый анион тетрафенилборат, а начальная скорость РМСА не стимулируется валиномицином (что должно бы происходить, если бы РМСА транспортировала Ca^{2+} электрогенно) [163]. В стационарном же состоянии транспорт Ca^{2+} активируется и валиномицином, и протоном СССР в 1,5 раза. Был сделан вывод, что транспорт РМСА в липосомах имеет стехиометрию $2\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{ATP}$ [163]. Однако, в экспериментах с закрывшимися теньями [95, 204]) стехиометрия транспорта $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ была оценена как 1:1. Позднее использование липосом, приготовленных несколько иным методом, чем в [44], показало (с использованием потенциалчувствительного индикатора), что РМСА действительно работает электрогенно, генерируя потенциал, по разным оценкам, до 26–57 мВ [107, 198]. В то же время не было понятно, почему коллапс трансмембранного потенциала (при добавлении валиномицина) не влияет на активность РМСА. В недавней работе по исследованию влияния pH, внеклеточного Ca^{2+} и потенциала на транспорт Ca^{2+} в интактных эритроцитах выдвинуто предположение, что только скорость-лимитирующий шаг рабочего цикла не зависит от потенциала [253]. С другой стороны, от потенциала может зависеть перенос второго иона, протона ($K_{m,\text{H}} \approx 2 \text{ нМ}$, т.е. pH 9,0) [253].

По всей видимости, можно заключить, что РМСА работает электрогенно, транспортируя 1 Ca^{2+} /1 H^+ /1 АТФ.

Маловероятно, что транспорт протона РМСА важен для физиологии клетки, так как количество РМСА сравнительно невелико, а системы контроля pH в клетке весьма многочисленны. Однако существуют гипотезы о том, что вызываемое РМСА закисление цитоплазмы может быть физиологически важным в сократимых клетках — понижение pH активирует SERCA, что, в свою очередь, приводит к увеличению транспорта кальция в ретикулум и расслаблению мышцы [66, 158].

С точки зрения физиологии клетки выведение Ca^{2+} из клетки осуществляется РМСА и $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменником (NCX). Последний берет на себя основную нагрузку в сердечной мышце [106], тогда как например, в ацинарных клетках поджелудочной железы [260] и синапсах фоторецепторных клеток [137, 157] выведение Ca^{2+} производится преимущественно РМСА. В эритроцитах вклад РМСА и NCX может

быть соотнесен как 70% и 30% [19], а в эндотелии аорты — 50% и 50% [246].

Рассматривая вопрос о роли РМСА в клеточном гомеостазе, необходимо иметь в виду, что современные представления о локализации АТФ-азы могут оказаться несколько упрощенными. Дело в том, что, по крайней мере, в скелетных и сердечной мышцах РМСА локализована преимущественно в кавеолах [91, 92, 106] — небольших впячиваниях плазматической мембраны. Предполагается, что кавеолы могут открываться и закрываться [21, 186, 205]. РМСА в закрытых кавеолах не может выбрасывать кальций из клетки, т.е. в таком состоянии РМСА должна работать как SERCA. Известно также, что во многих клетках скорость обновления самой плазматической мембраны очень велика за счет пиноцитоза и обмена пузырьков. В настоящее время остается неясным, каким образом работает РМСА во время обмена мембран, как работает новосинтезированный фермент в мембранах ретикулума и имеет ли это физиологическое значение. Очевидно лишь, что классический взгляд на РМСА как на «рабочую лошадку», которая сама по себе не выполняет регуляторных функций, не совсем корректен.

Наличие РМСА в кавеолах несомненно свидетельствует о ее роли в трансдукции сигнала. Трансгенные крысы с повышенным уровнем РМСА в желудочках сердца не отличаются от контрольных животных при гемодинамических измерениях сердечной функции, а изолированные кардиомиоциты не отличаются друг от друга по параметрам осцилляций Ca^{2+} [106]. В то же время клетки трансгенных животных значительно чувствительнее к стимуляции роста α - и β -адренергетиками. Из этих данных следует, что РМСА играет незначительную (по сравнению с NCX) роль в регуляции внутриклеточного Ca^{2+} кардиомиоцитов (соответственно, и в сокращениях сердечной мышцы), но крайне важна для регуляции роста миокарда, модулируя передачу сигнала в кавеолах.

РМСА играет роль в регуляции не только внутриклеточного, но и внеклеточного Ca^{2+} . Об этом говорит ее различная субклеточная локализация в поляризованных Ca^{2+} -транспортирующих эпителиях. Например, в эпителии почки РМСА специфична для базолатеральных мембран, а вот в передней дольке простаты крысы — для апикальных мембран [177]. Любопытно, что значительное количество РМСА секретируется в молоко из отщеплений апикальной мембраны клеток молочной железы, оставаясь в мембранах молочной жировой глобулы [180].

IV. РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ РМСА АУТОИНГИБИТОРНЫМИ ДОМЕНАМИ: СВЯЗЫВАНИЕ КАЛЬМОДУЛИНА И КИСЛЫХ ФОСФОЛИПИДОВ, ОГРАНИЧЕННЫЙ ПРОТЕОЛИЗ И ОЛИГОМЕРИЗАЦИЯ

КАЛЬМОДУЛИН

Среди различных механизмов регуляции активности РМСА наиболее хорошо изученным является активирование РМСА кальмодулином. Исследованию этого феномена посвящено много работ, которые привели к созданию концепции С-концевого аутоингибиторного домена.

Кальмодулин — кислый низкомолекулярный, модулируемый ионами кальция, белок. Достаточно хорошо охарактеризованы его аминокислотная последовательность, пространственная структура и биохимические свойства. Белок высококонсервативен как по структуре, так и по выполняемым функциям [27]. Белков-мишеней у кальмодулина очень много, но в мембране эритроцитов РМСА — единственный белок, взаимодействующий с высокой аффинностью [255].

Активированный связыванием Ca^{2+} кальмодулин связывается с РМСА, увеличивая и V_{\max} , и аффинность к Ca^{2+} [161]. Транспорт Ca^{2+} , осуществляемый РМСА в инвертированных пузырьках эритроцитов, стимулируется кальмодулином в 3,1 раза [243].

Локализация кальмодулин-связывающего домена в С-концевой области РМСА эритроцитов человека и определение его первичной структуры были осуществлены в 1988 году [118] при помощи протеолитического расщепления РМСА, ВЭЖХ, блоттинга и N-концевого секвенирования белков, реагирующих с меченым кальмодулином. Оказалось, что кальмодулин-связывающий участок имеет длину 33 а.о.:

ELRRGQILWFRGLNRIQTQIKVVNAFSSSLHEF

Изучение взаимодействия кальмодулина с синтетическими пептидами, соответствующими кальмодулин-связывающему участку РМСА, позволило углубить понимание механизма взаимодействия РМСА с кальмодулином. В экспериментах по фотоаффинному мечению установлено, что N-концевая и средняя части кальмодулин-связывающего участка РМСА взаимодействуют с С-концевой половиной кальмодулина [241, 256], тогда как остаток фенилаланина в положении 25 связан с N-концевым доменом кальмодулина [256].

Кальмодулин взаимодействует с РМСА по одному сайту, и этот участок в значительной степени независим от остальной молекулы [255]. Предполагается, что при связывании кальмодулина домен претерпевает переход от дезориентированной в α -спиральную конформацию, разрывая взаимодействие с остальной молекулой.

Кальмодулин-связывающий домен взаимодействует с активным участком фермента, ингибируя его. После удаления домена от активного сайта посредством взаимодействия с кальмодулином РМСА становится полностью активной. При помощи фотоаффинного мечення, протеолиза, ВЭЖХ и секвенирования меченых фрагментов найдено, что аутоингибиторный домен РМСА взаимодействует с остатками 537–544 [81, 82]. Другой участок взаимодействия расположен между трансмембранными сегментами 2 и 3, включая в себя аминокислотные остатки 206–271 [83]. Таким образом, существуют два сайта связывания С-концевого домена РМСА с остальной частью молекулы — 206–271 и 537–544. Механизм аутоингибиторного действия заключается, вероятнее всего, в закрытии доступа субстрата (АТФ) к каталитическому центру фермента.

Интересно, что присоединение кальмодулин-связывающего домена РМСА к С-концу $\alpha 1$ субъединицы Na^+, K^+ -АТФазы [117] придает последней свойства РМСА. При добавлении Ca^{2+} и кальмодулина АТФ-азная активность химеры увеличивается в 1,5 раза. Этот результат подразумевает прямое взаимодействие между кальмодулин-связывающим доменом РМСА и некоторыми участками Na^+, K^+ -АТФазы, которые структурно гомологичны соответствующим участкам РМСА [262].

При изучении структурно-функциональных соответствий АТФ-аз Р-типа показано также, что синтетический пептид С28W, представляющий собой кальмодулин-связывающий участок РМСА, ингибирует SERCA, взаимодействуя с сайтом связывания фосфоламбана. Следовательно, фосфоламбан-связывающий участок SERCA и кальмодулин-связывающий участок РМСА функционально аналогичны, а возможно и гомологичны (последовательности С28W и гидрофильная часть фосфоламбана идентичны на 50%) [57, 239].

Несмотря на тщательное изучение механизма активации РМСА кальмодулином и многочисленные физиологические исследования, до сих пор не совсем понятно, насколько эта активация важна для регуляции внутриклеточного Ca^{2+} . Существует гипотеза, что в действительности кальмодулин связывает большинство молекул РМСА, являясь как бы ее субъединицей [165, 236]. В самом деле, в клетке кальмодулина гораздо больше, чем РМСА, например, в эритроцитах концентрация кальмодулина около 5 мкМ, т.е. на два порядка больше РМСА. Поскольку K_d кальмодулина около 60 нМ [89], а другие кальмодулин-связывающие белки (киназа фосфорилазы, некоторые формы миозина и т.п.) мало представлены в этих специализированных клетках, то такое предположение вполне обосновано. Кроме того, из некоторых органов (из печени) невозможно выделить РМСА при помощи стандартной аффинной хроматографии на каль-

модулине (возможно, из-за того, что РМСА уже связана с кальмодулином) [125]. Отмывка эритроцитарных мембран от кальмодулина (обработкой EGTA) вызывает уменьшение активности РМСА в 2,5 раза, а добавление избытка кальмодулина – увеличивает активность в 2 раза, т.е. действительно часть РМСА эритроцитов оказывается связанной с кальмодулином в получаемых препаратах мембран [2]. Однако, из исследований *in vivo* известно, что при постоянном низком уровне внутриклеточного Ca^{2+} (в покоящихся клетках) стимуляция кальмодулином РМСА может быть несущественной из-за неактивной конформации кальмодулина [89, 187, 195]. В таком случае кальмодулин – важный динамический регулятор РМСА: повышение внутриклеточного Ca^{2+} вызывает активацию кальмодулина и, в свою очередь, РМСА [89]. Чрезвычайно важно отметить, что кинетика такой регуляции существенно отличается в различных типах клеток (этот аспект кратко рассмотрен в разделе VI).

Нужно также отметить, что многочисленные Ca^{2+} -связывающие белки, помимо кальмодулина, тоже могут модулировать активность РМСА. Витамин D-стимулируемый кальбиндин-9К активирует мембраносвязанную РМСА базолатеральной мембраны слизистой двенадцатиперстной кишки крысы, но не очищенную РМСА эритроцитов [224]. Родственный белок кальбиндин-28К аддитивно с кальмодулином стимулирует РМСА и эритроцитов, и эпителия двенадцатиперстной кишки [221]. Сайты связывания кальбиндина и кальмодулина идентичны [120]. Поскольку аффинность кальбиндина к РМСА в 5–10 раз меньше чем у кальмодулина, то вряд ли это взаимодействие имеет существенное физиологическое значение.

ПРОТЕОЛИЗ

Как и многие другие кальмодулин-связывающие белки, РМСА активируется ограниченным протеолизом [218]. Трипсинолиз при 0 °С [264] сначала приводит к быстрому образованию фрагмента 124 кДа, а затем – 90, 81, 76, 34, 14 кДа; при дальнейшей обработке накапливаются преимущественно фрагменты 76 (далее распадается до 48 и 28), 48, 33,5, 28 и 14 кДа. Фрагменты 33,5 и 14 кДа весьма устойчивы к дальнейшему трипсинолизу. У фрагментов с массой не менее 90 кДа сохраняется способность к активации кальмодулином, а способность к связыванию кальмодулина – у 90 и 25 кДа. Фрагменты массой от 81 до 76 кДа сохраняют активность, но не связывают кальмодулин, и не активируются им.

Получаемые фрагменты идентифицировали при помощи N- и C-концевого секвенирования [265], что позволило создать общую модель фрагментации РМСА при ограниченном трипсинолизе (рис. 4).

Интересно, что фрагменты 90 и 34 кДа остаются связанными друг с другом, если не произошла денатурация после протеолиза [16]. Каль-

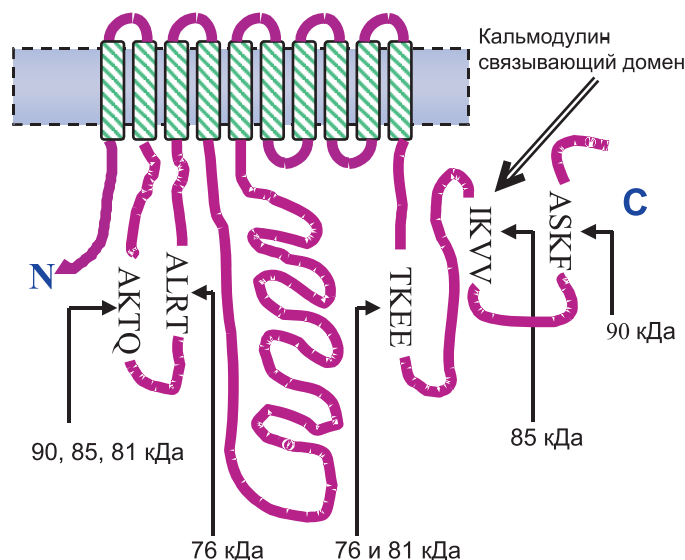


Рис. 4. Схема ограниченного трипсинолиза РМСА.

Молекула РМСА представлена в виде трансмембранной укладки полипептидной цепи. Стрелками показаны сайты, высокочувствительные к действию трипсина, расщепление по которым приводит к образованию фрагментов указанной длины.

модулин и Ca^{2+} усиливают распад 90 кДа до 85, но не до 81 и 76 [1]. Ванадат и магний (запирающие РМСА в конформации E_2) также ускоряют протеолиз, но только до образования фрагмента 81 кДа. Линолевая кислота действует неспецифически, ускоряя образование продуктов меньше 76 кДа. В то же время La^{3+} и АТФ не оказывают заметного влияния на скорость трипсинолиза [1].

Сходные с трипсином образцы расщепления дают протеиназа К, папаин и химотрипсин. Обработка этими протеазами приводит прежде всего к активированному фрагменту 80 кДа. Этот факт говорит о том, что именно целые участки, а не отдельные аминокислотные остатки РМСА экспонированы наружу и доступны для действия протеаз. Аминопептидаза М существенно не влияет на активность РМСА. В то же время карбоксипептидаза А активирует фермент, но в значительно меньшей степени, чем все эндопротеазы [192].

Ca^{2+} -зависимая эндопротеаза кальпаин, присутствующая в цитоплазме всех клеток, активирует РМСА [249]. Этот процесс идет в отсутствие кальмодулина; активации сопутствует образование основного фрагмента с массой около 125 кДа [167]. Активация РМСА каль-

паином необратима, расщепленный фермент более не активируется кальмодулином. В то же время кальмодулин защищает кальмодулин-связывающий домен от протеолитического расщепления. В С-концевом кальмодулин-связывающем домене РМСА эритроцитов человека имеются два близкорасположенные сайта протеолиза [119, 247, 248] за счет которых кальпаин прогрессивно укорачивает молекулу РМСА. В присутствии кальмодулина сначала образуется частично активированный фрагмент массой 127 кДа; при этом удаляется часть ингибиторного домена. Дальнейший протеолиз приводит к образованию более активного фрагмента 125 кДа, который все еще связывает кальмодулин. В конце концов формируется фрагмент 124 кДа, уже больше не связывающий кальмодулин, его активность приближается к активности кальмодулин-стимулированного фермента.

Протеолиз РМСА кальпаином может быть «последней линией защиты» в поддержании низкого Ca^{2+} в цитоплазме при различных стрессах. Действительно, РМСА является предпочтительным субстратом кальпаина в эритроцитах [155, 190]. Регуляция кальпаином *in vivo* может быть однако более сложной, поскольку еще существует и белок кальпастатин – ингибитор кальпаина. Показано, что в эритроцитах линейных крыс с пониженным уровнем кальпастина активность РМСА ниже нормы, хотя происходит накопление фрагмента 124 кДа [208]. Поскольку такой фрагмент должен, наоборот, быть более активным, то возможно, что регуляция РМСА кальпаином в живой клетке значительно сложнее, чем в экспериментах *in vitro*.

С-концевой домен РМСА содержит также сайт 1077-DEID-1080, высокочувствительный к действию каспазы-3, раннего эффектора апоптоза [168, 201]. При действии каспазы-3 происходит образование полностью активного фрагмента 120 кДа [168]. С другой стороны, расщепление РМСА каспазами в нейронах ведет к нарушению Ca^{2+} -гомеостаза, предположительно за счет перемещения с поверхности клетки во внутриклеточные компартменты [201]. Таким образом, роль РМСА в апоптозе пока не вполне ясна.

ОЛИГОМЕРИЗАЦИЯ

При определении размера РМСА методом радиационной инактивации молекулярная масса ее функциональной единицы в интактных мембранах эритроцитов была оценена как 251 кДа [52] или 290 кДа [154], что хорошо соответствует димеру РМСА. В присутствии кальмодулина обнаружено появление компонентов около 1 МДа. Молекулярная масса очищенной РМСА при помощи аналитического ультрацентрифугирования была оценена как 260 кДа для РМСА без кальмодулина и 170 кДа – для кальмодулин-связанной РМСА [188].

Таким образом, два различных метода показали, что активная РМСА в отсутствие кальмодулина является димером, в то же время эффект кальмодулина на четвертичную структуру РМСА может быть достаточно сложным.

Давно известно, что очищенная РМСА активируется кальмодулином в меньшей степени, чем в нативной мембране эритроцитов, а, кроме того, степень активации РМСА кальмодулином зависит от ее концентрации. Эта особенность, а также появление слабой полосы 205 кДа на электрофореграммах очищенной РМСА еще в ранних работах указывало на возможность димеризации фермента [162]. Позднее было показано, что в солюбилизованном виде РМСА находится в равновесии олигомеров и мономеров [128, 133].

Если олигомеризация происходит *in vivo*, то она отражает случайную ассоциацию мономеров, так как концентрация РМСА в плазматической мембране довольно низка. Поскольку олигомеризация требует присутствия Ca^{2+} , предполагалось, что этот процесс нужен для повышения сродства к Ca^{2+} .

РМСА при олигомеризации активируется и становится нечувствительной к действию кальмодулина [130, 133]. В экспериментах по изучению связывания меченого кальмодулина и очищенной РМСА было найдено, что олигомеризация приводит к маскированию одного кальмодулин-связывающего сайта на каждые две ассоциированные молекулы белка [130]. Таким образом, РМСА на своей поверхности, экспонированной в воду, имеет гидрофобную область, участвующую в димеризации, и часть этой области является одновременно сайтом связывания кальмодулина [129]. В то же время и кальмодулин, и антитела к кальмодулин-связывающему пептиду РМСА не активируют олигомеры и не промотируют олигомеризацию, а напротив, препятствуют ей, хотя они не способны вызвать диссоциацию уже сформированного димера [240]. Фрагмент РМСА 124 кДа, получаемый при протеолизе кальпаином, не способен к олигомеризации [240].

При высоком давлении (2.4 кбар) происходит диссоциация димеров РМСА. Этот процесс ускоряется ванадатом, ингибируется Ca^{2+} , а кальмодулин не оказывает влияния [62]. Исследование же термической денатурации РМСА указывает на то, что в составе димера РМСА более стабильна [148].

Однако большинство экспериментов проводились на очищенной солюбилизованной РМСА, в детергентных мицеллах. Поэтому они не позволяют сделать однозначный вывод о параметрах равновесия в нативной плазматической мембране клетки:

активированный димер \longleftrightarrow малоактивный мономер \longleftrightarrow активированный комплекс РМСА-кальмодулин

КИСЛЫЕ ФОСФОЛИПИДЫ

Возможность тщательного изучения влияния липидного состава на активность РМСА появилась только после разработки методов очистки и реконструкции РМСА. Для исследования влияния липидов РМСА выделяют в присутствии очищенного фосфатидилхолина.

При добавлении ряда липидов к очищенной солубилизованной РМСА наблюдали увеличение ее АТР-азной активности [160]. Фосфатидилэтаноламин и сфингомиелин имели незначительный эффект, в то время как кислые фосфолипиды активировали РМСА в 7 раз. Наибольшее стимулирование наблюдалось при добавлении кардиолипина или фосфатидовой кислоты (8 нмоль/мкг белка), фосфатидилсерина – 20 и фосфатидилинозита – 50 нмоль/мкг; причем для кардиолипина характерно резкое снижение стимуляции в количествах выше 10 нмоль/мкг белка. Таким образом, для стимулирования РМСА необходимо около 500 молекул соответствующих липидов на молекулу белка. При реконструкции РМСА наблюдали полное стимулирование в липосомах, содержащих 40% фосфатидилсерина. При содержании более 50% практически не заметен активирующий эффект кальмодулина. Также, активированная фосфолипидами РМСА не может быть далее активирована посредством олигомеризации [38].

По-видимому, PIP (фосфатидилинозит-4-фосфат) и PIP₂ (фосфатидилинозит-4,5-дифосфат) – наиболее эффективные липидные активаторы РМСА [10, 60, 104, 185], при реконструкции в липосомах максимальная активация наблюдается при 10%-ном содержании этих липидов. Таким образом, аффинность взаимодействия с РМСА коррелирует с количеством отрицательных зарядов в молекуле липида [230].

Эффект кислых фосфолипидов сходен с действием кальмодулина, проявляясь в понижении $K_{m, Ca}$ и повышении V_{max} . Более тщательное изучение кинетики действия кислых фосфолипидов на очищенную РМСА и фермент интактных мембран эритроцитов показало, что эффекты липидов и кальмодулина различны. Кислые фосфолипиды понижают $K_{m, Ca}$ в большей степени (до 0,25 мкМ), чем кальмодулин (до 0,5 мкМ) [77]. Кроме того, при исследовании скорости фосфорилирования реконструированной РМСА было обнаружено, что кальмодулин ускоряет быструю фазу фосфорилирования и не влияет на скорость дефосфорилирования, в то время как фосфолипиды ускоряют обе фазы фосфорилирования, как и дефосфорилирование [39].

При сравнении действия кислых фосфолипидов и кальмодулина на протеолитические фрагменты РМСА [77] установлено, фрагмент 81 кДа активируется кальмодулином и PIP, а фрагмент 76 кДа – только

PIP. Идентификация сайта протеолиза, ведущего к образованию фрагментов 76 кДа и 81 кДа, позволила определить сайт связывания кислых фосфолипидов в С-концевой области цитоплазматической петли между трансмембранными участками 2 и 3 [265]. Дальнейшая идентификация участков связывания фосфолипидов проводилась путем изучения свойств синтетических пептидов и делеционных мутантов [40, 87, 219]. Оказалось, что свойства синтетических пептидов, соответствующих последовательности фрагмента С-концевой части цитоплазматической петли между трансмембранными участками 2 и 3 длиной 44 а.о., похожи на свойства пептидов кальмодулин-связывающего домена. Все они непосредственно связывают фосфолипиды, а также способны ингибировать РМСа. Кроме того, они связывают и кальмодулин, хотя и с разной аффинностью [87]. Делеции РМСа в районе 296–349 приводят к полной активации фермента и нечувствительности к действию фосфолипидов [219].

Таким образом, эффект кислых фосфолипидов модулируется двумя участками: первым – 44 а.о. во втором цитоплазматическом домене и, в меньшей степени, вторым – в С-концевом кальмодулин-связывающем домене. Оба участка действуют как независимые аутоингибиторные домены [219]. Они весьма гидрофильны и заряжены положительно, т.е. активация происходит преимущественно через взаимодействие с кислыми «головками» фосфолипидов.

В мембранах эритроцитов содержание фосфатидилсерина составляет около 14%, а PIP и PIP₂ – около 1,5%. Они локализованы преимущественно во внутреннем слое мембраны, т.е. легко доступны для взаимодействия с РМСа, и поэтому РМСа нативной мембраны следует считать уже частично активированной. Однако пока трудно представить как кислые фосфолипиды могут играть какую-либо роль в физиологической регуляции активности РМСа в живой клетке [43, 45].

V. ДРУГИЕ МОДУЛЯТОРЫ АКТИВНОСТИ РМСа И ПРОБЛЕМА ПОИСКА ВЫСОКОСПЕЦИФИЧНОГО ИНГИБИТОРА

Для идентификации активности трех основных систем активного транспорта Ca^{2+} (РМСа, SERCA, NCX) используют несколько приемов. Транспорт Ca^{2+} , опосредованный Ca^{2+} -АТФ-азами и обменником, можно различить при помощи использования безнатриевых сред и ингибированием АТФ-аз ортованадатом, лантаном или кадмием [202]. Для отличия активности РМСа от SERCA применяют либо кальмодулин, специфически активирующий РМСа, либо тапсигаргин, селективный ингибитор SERCA [217]. Этот ингибитор

теперь широко применяется, его использование более удобно, чем измерение кальмодулин-активируемой активности, поскольку последняя может зависеть от уровня эндогенного кальмодулина, степени протеолитического расщепления РМСА и других факторов. Однако тапсигаргин не ингибирует малоизученную до сих пор Ca^{2+} -АТР-азу SPCA [225], которая частично присутствует в плазматической мембране (Дмитриев Р.И. с соавт, неопубликованные данные). Т.е. результаты некоторых экспериментов, интерпретированных как транспорт Ca^{2+} РМСА на самом деле могут отражать активность двух различных систем. Это указывает на важность использования высокоспецифичных ингибиторов в физиологических исследованиях ионного транспорта.

К сожалению, для РМСА до сих пор не найдено ингибитора, который удовлетворял бы всем требованиям. Поэтому часто приходится использовать такие малоспецифичные вещества, как ортованадат или эозин Y, которые ингибируют, во-первых другие АТР-азы Р-типа, и, во-вторых, самые различные белки, например, Ca^{2+} -каналы [206]. K_i ванадата для РМСА эритроцитарных мембран – 0,5 мкМ [138], в интактных эритроцитах человека – 3 мМ [220], а в эритроцитах свиньи – 1,6 мкМ [33]. SERCA на порядок менее чувствительна к ванадату. Эозин Y может быть полезен в ряде случаев, так как не ингибирует NCX [11, 96]. K_i эозина для РМСА миомерия 0,8 мкМ [3, 6, 11], для сарколеммы сердца 1 мкМ [96 для эритроцитов – 0,2 мкМ [978]. Ингибитор не влияет на аффинность к Ca^{2+} [14], но понижает V_{\max} и аффинность к АТР [11, 14, 97].

Следует отметить, что было изучено влияние самых различных веществ на активность РМСА [8]. К сожалению, многие из описанных эффектов (как *in vitro*, так и *in vivo*) либо неспецифичны, либо их механизм очень слабо изучен.

ОРГАНИЧЕСКИЕ РАСТВОРИТЕЛИ

Несколько работ посвящено действию низкомолекулярных органических веществ, таких как растворители. Этанол (5%) стимулирует РМСА в 2,4 раза [28], а алканола с большей длиной цепи активируют РМСА еще эффективнее [28]. Этанол при концентрации 0,5%, которая действительно может наблюдаться при интоксикации, активирует РМСА на 30%. Такая активация может быть физиологически важной, поскольку в скелетных мышцах под действием этанола SERCA ингибируется, а концентрация внутриклеточного Ca^{2+} – повышается [234]. Другие органические растворители в ограниченных концентрациях также активируют РМСА [29, 207], но ингибируют в высоких [4].

АНЕСТЕТИКИ

Интересно, что РМСА ингибируется ингаляционными анестетиками типа галотана, закисью азота и ксеноном [90]. Один эквивалент минимальной эффективной дозы галотана ингибирует активность РМСА синапсом крысы на 30%, а ксенона и закиси азота — на 20%. Важно, что не наблюдалось аналогичного эффекта на SERCA и Na^+, K^+ -АТФазу, а фторотил (аналог галотана со слабой анестетической активностью) не ингибировал РМСА [114]. Поскольку физиологический механизм анестезии до сих пор малопонятен, трудно решить: или такое ингибирование РМСА — сопутствующий феномен, или — важный механизм развития анестезии? Галотан тушит флуоресценцию триптофанов очищенной РМСА конкурентно с диэтиловым эфиром, но независимо от фосфатидилхолина и детергентов, что говорит о существовании прямого взаимодействия анестетиков с РМСА [151] или с интерфазой белок-липид [172]. Предполагается также, что их действие связано с предотвращением олигомеризации и связывания кальмодулина [151]. Такой эффект действительно доказан в случае ингибирующего влияния барбитуратов (1 мМ пентобарбитала) [131].

Местные анестетики (дибукаин и лидокаин) также ингибируют активность РМСА синаптических мембран, неконкурентно с субстратами [93]. К сожалению, влияние кальмодулина на этот эффект авторами не исследовалось.

ИОНЫ МЕТАЛЛОВ

Изучение влияния ионов различных металлов на активность РМСА имело большое значение. Лантаноиды ингибируют АТФ-азы Р-типа, в том числе РМСА ($K_{0,5}$ 0,25 мМ [213]). Важно, что La^{3+} усиливает фосфорилирование РМСА, но уменьшает фосфорилирование SERCA, что в ряде случаев чрезвычайно удобно использовать для изучения дифференциальной регуляции этих систем. Тщательное изучение кинетики ингибирования позволило заключить, что эффект лантаноидов на РМСА в нативной мембране объясняется вытеснением связанных Mg^{2+} и Ca^{2+} ; при этом ускоряется переход $E_2 \rightarrow E_1$ и затрудняется переход $E_1P \rightarrow E_2P$ [108].

Большой интерес представляет также изучение ингибирования РМСА ионами кадмия. Кадмий — очень эффективный ингибитор (K_i 2 нМ), хотя природа ингибирования является предметом споров: механизм интерпретируется как неконкурентный с Ca^{2+} [238], или конкурентный [232]. Недавние исследования прояснили эффект кадмия более подробно, оказалось, что Cd^{2+} не влияет на связывание кальмодулина, а обратимость зависит от порядка добавления реаген-

тов: прединкубация с Cd^{2+} без АТФ приводит к необратимой инактивации, в то время как в присутствии АТФ наблюдается обратимое ингибирование, по всей видимости, опосредуемое комплексом Cd^{2+} -АТФ [224]. При использовании интактных клеток эффект Cd^{2+} довольно слаб (K_i 1,5 мМ при рН 7,2 и 0,35 мМ при рН 8,1) [224], следовательно, ионы кадмия способны ингибировать РМСА, действуя только со стороны цитоплазмы.

Описанные эффекты ионов других металлов на РМСА представляют меньший интерес. Ионы Ni^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} ингибируют АТФ-азную активность РМСА конкурентно с Ca^{2+} [113, 261]. Напротив, транспорт Ca^{2+} в мембранах эритроцитов активируется Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} при низких концентрациях [79]. Ba^{2+} не оказывает существенного влияния на РМСА [252]. Описано также ингибирование РМСА солями свинца [32].

РАЗЛИЧНЫЕ ЛИПИДЫ И СВОБОДНЫЕ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ

Данные о влиянии различных липидов, помимо кислых фосфолипидов, на активность РМСА несколько противоречивы. Сообщалось, что свободные ненасыщенные жирные кислоты (олеиновая и линолевая) активируют очищенную РМСА в 6 раз при концентрации 6 нмоль/мкг белка, понижая $K_{m,\text{Ca}}$ и увеличивая V_{max} [160]; но РМСА в нативных мембранах эритроцитов ингибируется олеиновой кислотой [67]. В других работах указывалось, что эффект олеиновой кислоты на РМСА эритроцитов сложен: в умеренной концентрации наблюдается активирование, а в высокой концентрации – необратимое ингибирование [174, 250]. Линолевая кислота также неспецифически стимулирует трипсинолиз РМСА, ускоряя образование продуктов меньше 76 кДа [1]. Низкие концентрации арахидоновой кислоты препятствуют повышению внутриклеточного Ca^{2+} в лимфоцитах, что может быть интерпретировано как активация РМСА [13].

Аналог природных кислот 8-(5'-азидо-*O*-гексаноилсалициламидо)октановая кислота (AS86) при нековалентном взаимодействии активирует РМСА в 2 раза [184], конкурентно с олеиновой кислотой только в низких концентрациях (100–200 мкМ). Конъюгация же AS-86 вызывает ингибирование РМСА. Лизофосфолипиды стимулируют РМСА [227], холестерин – несколько ингибирует [166], а диацилглицерин – не имеет заметного эффекта [60].

Интересно также, что и абнормальные липиды могут влиять на активность РМСА, например, фосфатидилэтанол, который образуется в мембранах эритроцитов при инкубации с этанолом и при хроническом алкоголизме. Фосфатидилалканолы в концентрации 100 мг/л стимулируют РМСА в два раза, увеличивая $K_{m,\text{Ca}}$ и V_{max} [212].

В отличие от фосфатидилсерина, фосфатидилалканола действуют аддитивно с кальмодулином.

ИНГИБИТОРЫ КАЛЬМОДУЛИНА

Нейролептики фенотиазинового ряда подавляют активацию РМСА не только кальмодулином, но и кислыми фосфолипидами, и ограниченным протеолизом [17]. Поэтому был сделан вывод, что фенотиазины неспецифически связываются и с липидами, и непосредственно с РМСА. Другой ингибитор кальмодулина, производное миконазола R24571 (кальмидазолиум) также непосредственно влияет на активность РМСА, но механизм действия интерпретируется по-разному: как понижение аффинности к Ca^{2+} [143], так и вытеснение АТФ [63]. Эффект ингибируется фосфатидилсеринем [17, 251], АТФ и фосфатом [63]. Сходные результаты получены с еще одним ингибитором кальмодулина, *O*-4-(этоксипутил)бербамином (K_i 8 мкМ), также ингибирующим РМСА конкурентно с АТФ [251]. Вообще эффект антагонистов кальмодулина очень сложен, при обработке клеток фенотиазинами РМСА ингибируется, но одновременно наблюдается понижение внутриклеточного Ca^{2+} [51].

АНТИТЕЛА

Ингибирующие моноклональные антитела (МА) могут быть полезным инструментом во многих случаях, когда по условиям эксперимента эпитоп доступен для взаимодействия. Для экспериментов на целых клетках ингибирующее антитело должно распознавать внеклеточные эпитопы. В настоящее время известно два таких МА [12, 49, 86], но они не влияют ни на АТФ-азную активность, ни на транспорт Ca^{2+} [7, 49]. С другой стороны, получено довольно много гибридомных клонов, продуцирующих МА, которые реагируют с РМСА с цитоплазматической стороны, что могло бы быть полезным для ингибирования РМСА в солюбилизованной форме и в инвертированных мембранных пузырьках. МА 2В3 [231] ингибирует РМСА за счет конкуренции с АТФ; к сожалению, эпитоп этого МА не был локализован. Большая часть МА, полученных против РМСА эритроцитов человека, не влияет на активность [12, 15]. Одно МА, 7С8 активирует и АТФ-азную активность, и транспорт Ca^{2+} [12], что объясняется довольно легко, поскольку его эпитоп расположен в сайте связывания кислых фосфолипидов [9, 219]. Следует отметить, что, к сожалению, практическое использование антител в исследованиях РМСА на сегодняшний день ограничивается преимущественно иммунодетекцией. С другой стороны, применение антител как ингибиторов может все-таки иметь перспективы, поскольку зачастую

они взаимодействуют только с определенными изоформами (в случае РМСА известны в основном специфичные к РМСА4 [9, 12, 15]).

ПОИСК НОВЫХ ИНГИБИТОРОВ РМСА

Немало усилий было потрачено на поиски других белков, модулирующих активность РМСА. Еще в 1984 г. сообщили [181], что в сарколемме сердца имеется белок (56–60 кДа), активирующий РМСА эритроцитов в 2 раза, аддитивно с кальмодулином. Однако этот белок не был идентифицирован. Также из свободного от мембран гемолизата выделили белковый ингибитор РМСА [144]. Его вес определили при помощи гель-фильтрации как 7,5 кДа, его белковая природа как будто была доказана путем трипсинизации, тепловой обработки и лиофилизации [144]. Однако через несколько лет авторы пришли к заключению, что наблюдаемый эффект – артефакт, а ингибирующее действие вызвано комплексами Ca^{2+} -EGTA, которые концентрируются в процессе ионообменной хроматографии [257]. Эти же авторы вновь сообщили о выделении еще одного белкового ингибитора РМСА (50 кДа) аффинной хроматографией на РМСА-агарозе [24].

Таким образом, несмотря на полученный обширный экспериментальный материал, проблема поиска специфических ингибиторов РМСА еще не решена. Однако продолжение исследований позволяет надеяться на успешное решение этой проблемы. Так, в моче крыс с протеинурией обнаружен некий неидентифицированный нейтральный липид, ингибирующий РМСА [150]. Была предпринята попытка разработать ингибитор, который действовал бы как аналог сердечных гликозидов (ингибиторов Na^+ , K^+ -АТФ-азы). Скрининг библиотеки пептидов при помощи фагового дисплея по связыванию со второй внеклеточной петлей РМСА позволил идентифицировать пептид VSNSNWPSFPSS-амид, названный калоксином [54]. Калоксин ингибирует Ca^{2+} -АТФ-азную активность эритроцитов с K_i 0,4 мМ. На наш взгляд, калоксин не удовлетворяет требованиям к эффективному ингибитору для физиологических исследований, поскольку пептиды в микромолярных концентрациях могут оказывать неспецифические эффекты. Однако это указывает на принципиальную возможность разработки новых высокоспецифичных модуляторов.

VI. ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ РАЗЛИЧНЫХ ИЗОФОРМ РМСА

В мембранах эритроцитов человека, давно используемой модели регуляции РМСА, присутствует смесь двух изоформ, РМСА1 и РМСА4. Всего же у млекопитающих известны 4 изоформы РМСА

(PMCA1-PMCA4). Попытки обнаружить существование других изоформ оказались безуспешными [139]. В геномах человека и грызунов имеются четыре гена, называемые АТР2В1-АТР2В4. Для изоформ PMCA млекопитающих 1, 2 и 3 характерна очень высокая степень гомологии, почти идентичность аминокислотных последовательностей, только PMCA4 сравнительно низкоконсервативна. Наиболее вариабельными участками PMCA являются N- и C-концевые фрагменты, C-концевая часть второго цитоплазматического домена и большинство предполагаемых внеклеточных петель.

У эволюционно удаленных организмов набор изоформ отличается, например, *C. elegans* имеет 3 гена PMCA. Пока невозможно точно установить полное родство между всеми изоформами, однако можно проследить некоторые филогенетические связи, которые указывают на родство PMCA2 и PMCA3 (рис. 5).

Помимо существования отдельных генов PMCA, разнообразие их продуктов увеличивается при помощи альтернативного сплайсинга. Сложнейшие последствия этого разнообразия для функциональной регуляции PMCA исчерпывающе рассмотрены в обзоре Штрелера и Закариаса [211], поэтому мы не будем подробно останавливаться на этом вопросе. Отметим только, что альтернативные варианты возникают путем включения-исключения коротких экзонов и селекции донорно-акцепторных сайтов в пре-мРНК. Всего у PMCA млекопитающих известно два сайта альтернативного сплайсинга (рис. 6). Число вариантов различается для разных изоформ (всего доказано существование не менее двадцати вариантов структуры). Роль альтернативного сплайсинга до сих пор не выяснена полностью, но нужно отметить, что существующее разнообразие касается прежде всего регуляторного C-концевого кальмодулин-связывающего аутоингибиторного домена.

Возможность суперэкспрессии PMCA в клетках млекопитающих и насекомых позволила выяснить, например, что PMCA2 имеет аффинность к кальмодулину в 5–10 раз большую, чем PMCA4, а также более высокую базальную активность и большую аффинность к Ca^{2+} в присутствии кальмодулина [111]. Такое различие свойств проистекает прежде всего из-за различия C-концевых доменов, так как PMCA4 с делецией C-концевого домена так же высокоаффинна к Ca^{2+} и кальмодулину, как и PMCA2 [111]. С другой стороны, исследование свойств химер двух изоформ указывает, что C-конец PMCA2 не переносит ее свойства в PMCA4, для этого необходима замена обеих больших цитоплазматических петель, следовательно это указывает на важную роль сайта взаимодействия с аутоингибиторным доменом [25]. Интересно, что изоформа PMCA2 отличается высокой (10-кратной)

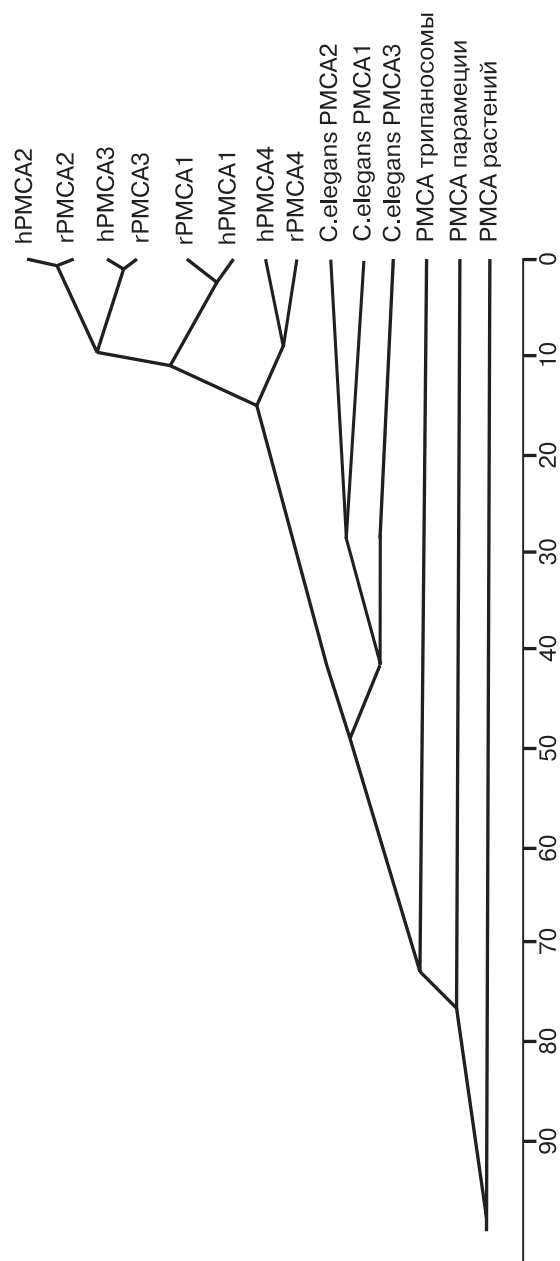
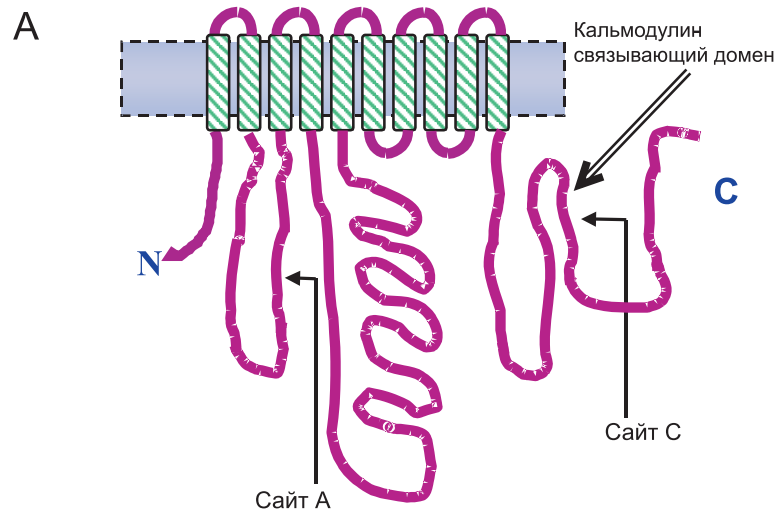


Рис. 5. Кажущееся филогенетическое древо изоформ РМСА млекопитающих и нематоды *C. elegans*. hPMCA – РМСА человека (human), rPMCA – РМСА крысы (rat).

Внизу показана линейка биологического времени в условных единицах.



В

	PMCA1	PMCA2	PMCA3	PMCA4
Сайт А	□ ■ □	□ ▨ ▨ ■ □	□ ■ □	□ ■ □
z		□ □	□ □	□ □
x	□ ■ □	□ ■ □	□ ■ □	□ ■ □
w		□ ▨ ■ □		
Сайт С	□ ■ □	□ ■ □ ▨ □	□ ▨ ■ □ ▨ □	□ ■ □
b	□ □	□ □	□ □	□ □
a	□ ■ □	□ ■ □ ▨ □	□ ■ □	□ ■ □
c	□ ■ □			
d	□ ■ □			
e	□ ■ □		□ ■ □ ▨ □	
f			□ ▨ ■ □ ▨ □	

Рис. 6. Схема альтернативного сплайсинга РМСА млекопитающих.

А – трансмембранная укладка полипептидной цепи РМСА, в которой стрелками указаны сайты варибельности структуры, возникающей из-за альтернативного сплайсинга. В – известные сплайс-варианты изоформ РМСА. Фланкирующие обязательные экзоны показаны незаштрихованными прямоугольниками. Альтернативные экзоны заштрихованы. Длина включенных альтернативных экзонов варьирует. Пустые ячейки указывают на то, что данный вариант для данной изоформы не известен.

чувствительностью к этанолу (максимальная активация уже при 0,5%) по сравнению с другими изоформами [53].

Сравнение сплайс-вариантов С-конца одной изоформы, РМСА4, показало, что короткий вариант («b») чувствительнее более длинного («a») и к кальмодулину ($K_{0,5} = 17$ и 125 нМ соответственно), и к Ca^{2+} ($K_{0,5} = 0,29$ и $0,84$ мкМ) [80, 176], что может быть объяснено наличием в С-конце дополнительного аутоингибиторного домена – т.е. домена препятствующего связыванию с кальмодулином! Относительно свойств РМСА3f установлено, что такой вариант с весьма коротким С-концевым доменом, который характерен для скелетных мышц, имеет сравнительно малую аффинность к кальмодулину (15 нМ в сравнении с $0,2$ нМ для РМСА2a), т.е. такая изоформа слабо зависит от кальмодулина [88].

Поскольку Ca^{2+} -зависимая активация кальмодулином, как и диссоциация комплекса РМСА-кальмодулин, занимает некоторое время, то это приводит к появлению гистерезисных изменений скорости Ca^{2+} транспорта РМСА при колебаниях внутриклеточного кальция [196, 197]. Быстрые осцилляции Ca^{2+} при замедленной регуляции РМСА в ряде случаев может дать эффект «клеточной памяти». Здесь же нужно отметить, что разные варианты РМСА могут весьма сильно отличаться в кинетике регуляции, например, связывание варианта «4b» с кальмодулином в 20 раз медленнее, чем «4a» [47]). Это позволяет различным типам клеток подгонять свои потребности в скорости ответа на кальциевый сигнал за счет использования изоформ и сплайс-вариантов с разной структурой регуляторных доменов [48].

Фосфорилирование РМСА протеинкиназами А и С приводит к активированию фермента и изменению чувствительности к кальмодулину. Тирозинкиназа, напротив, ингибирует РМСА [68]. Регуляция протеинкиназами также вариант-специфична [211]. Отметим, что сайт фосфорилирования протеинкиназой А имеет только «1b», а протеинкиназа С модифицирует варианты «2a» и «3a» гораздо эффективнее, чем «2b» и «3b» [76].

Сплайс-варианты «b» интересны тем, что на их С-конце присутствует так называемый PDZ-связывающий мотив (например, LETSV для hРМСА4b). Этот мотив обуславливает способность к образованию мультибелковых комплексов с многочисленными белками, содержащими PDZ-домен. К числу белков, взаимодействие которых с РМСА подтверждено, относятся мембрано-ассоциированные гуанилаткиназы (MAGUK) [72], фактор регуляции Na^+/H^+ -обменника (NHERF2) [71], кальций/кальмодулин-зависимая серинпротеинкиназа (CASK) [199] и NO-синтаза NOS-1 [200]. Через PDZ-домены опосредовано и связывание РМСА с цитоскелетом [258]. По-види-

тому, взаимодействие с PDZ не оказывает прямого влияния на каталитические функции РМСА; напротив, РМСА ингибирует NOS-1 [200]!

Сплайсинг в сайте А не приводит к заметным изменениям каталитических свойств, поэтому его физиологическое значение долго оставалось неизвестным. Недавно было показано, что варианты имеют разную локализацию в поляризованных клетках: вариант «w» — преимущественно в апикальной мембране, а варианты «x» и «y» — в базолатеральной [56]. Т.е. сплайсинг в сайте А влияет на структуру участка, взаимодействующего с аппаратом клеточного сортировки.

Таким образом, различия структур вариантов РМСА приводят к чрезвычайно высокой сложности механизмов регуляции *in vivo*.

VII. РЕГУЛЯЦИЯ СОДЕРЖАНИЯ РМСА В КЛЕТКЕ И БИМЕДИЦИНСКИЕ АСПЕКТЫ ЕЕ РЕГУЛЯЦИИ

Время жизни РМСА невелико (в мозге крысы время полужизни — 18 ч [85]), поэтому регуляция экспрессии РМСА может играть большую роль в поддержании концентрации внутриклеточного кальция и ее изменениях под действием тех или иных эффекторов. Такая регуляция может происходить на уровне транскрипции, процессинга мРНК, трансляции и оборота белка. В данном разделе рассматриваются наиболее интересные эффекты такой регуляции и их влияние на протекание физиологических и патологических процессов. Нужно заметить, что во многих случаях механизм наблюдаемых изменений РМСА неизвестен. Вполне обоснованно считается, что изменение количества РМСА должно быть связано с изменением способности выводить Ca^{2+} .

Влияние внеклеточного Ca^{2+} на экспрессию РМСА до сих пор исследовалось сравнительно мало. Известно только, что в капиллярах мозга крыс происходит 1,5-кратное повышение общего количества белка РМСА при гипокальциемии, в то время как в хороидальном сплетении каких-либо изменений при гипо- и гиперкальциемии не наблюдалось [123]. Повышение уровня Ca^{2+} в клетках нейробластомы при деполяризации калием приводит к изменению сплайсинга РМСА2 в сайте А — вместо варианта «w» появляется «x». Причем этот эффект практически закреплен навсегда — он сохраняется даже после 20 пассажей культуры [259].

Повышение внутриклеточного Ca^{2+} при культивировании гранулярных клеток мозжечка новорожденных как в деполяризующих условиях (что приводит к активации KCl-активируемых Ca^{2+} -каналов L-типа), так и в присутствии N-метил-D-аспартата (активация глутамат-зависимых Ca^{2+} -каналов) приводит к значительному повыше-

нию экспрессии РМСА2, 3, 1b и понижению экспрессии РМСА4, в особенности РМСА4b [44, 102]. Подобное явление наблюдалось при постнатальном развитии новорожденных, но при этом отмечается повышение экспрессии РМСА4 [102]. Факт увеличения РМСА удивителен, так как при взрослении одновременно повышается и внутриклеточный Ca^{2+} . Поэтому было выдвинута гипотеза, что увеличение количества РМСА происходит как бы в ответ на первичное повышение Ca^{2+} , чтобы возросла и эвакуирующая способность клетки, предотвращающая необратимые изменения. Действительно, одновременно с РМСА стимулируется экспрессия NCX и некоторых Ca^{2+} -каналов [44]. Позднее было показано, что экспрессия РМСА4b, но не других изоформ, контролируется протеинфосфатазой кальцинейрином на уровнях и транскрипции, и трансляции, но не известно, какие кальцинейрин-регулируемые факторы принимают в этом участие [103].

Внутриклеточный Ca^{2+} повышается в фазах клеточного цикла G_1 и S, и это может быть связано с уменьшением количества РМСА. Действительно, искусственное понижение активности фактора транскрипции c-Myb уменьшает уровень РМСА1 в соответствии с протеканием клеточного цикла – понижение и мРНК, и белка на 40% в фазе G_1/S (в сравнении с G_0), что сопровождается 4–10 кратным снижением способности эвакуировать Ca^{2+} [18, 116]. Напротив, значительное повышение РМСА при суперэкспрессии приводит к замедлению деления клеток и ускорению дифференцировки [105].

При дифференцировке кератиноцитов в культуре параллельно повышению внутриклеточного Ca^{2+} снижается количество белка и активности РМСА [59]. Снижение количества РМСА происходит и при превращении мегакариобластов в тромбоциты [55].

Весьма интересным аспектом является эффект искусственного изменения (как правило, частичного уменьшения или полного подавления) РМСА в живых клетках. Блокада трансляции РМСА1 антисмысловыми олигонуклеотидами (антисенсом) в клетках феохромоцитомы не приводит к заметным изменениям внутриклеточного Ca^{2+} недифференцированных клеток, но вызывает прекращение роста аксонов и исчезновение чувствительности к фактору роста нервов [37]. Длительное подавление РМСА1 антисенсом приводит к повышению цитозольного Ca^{2+} и апоптозу в культивируемых гладкомышечных клетках [193]. Клетки фибросаркомы с нарушенным геном РМСА4 обнаруживают высокую чувствительность к фактору некроза опухоли [164]. Выдвинуто предположение, что повышение уровня Ca^{2+} при недостаточности РМСА приводит к увеличению экзоцитоза лизосом [164].

Генный нокаут отдельных изоформ РМСА дает весьма интересные и неожиданные результаты. Например, РМСА4 экспрессирована

во многих тканях организма, но ее полное устранение у мышей приводит только к одному выраженному патологическому признаку – стерильности сперматозоидов (G.E. Shull, неопубликованные результаты). Еще более интересны последствия нокаута РМСА2. Нуль-мутантные мыши имеют характерный фенотип: полная глухота и нарушение координации движений [136]. До этого не было известно, что РМСА2 экспрессируется в значительных количествах в стереоцилиях улитки. Отсутствие РМСА2 приводит к дегенерации волосковых клеток, а также и нейронов спирального ганглия [73]. Позднее было также показано, что гетерозиготы *rmca2*^{+/-} склонны к развитию глухоты в условиях повышенного шума [155], а у линейных мышей, имеющих точечные мутации РМСА2, наблюдается глухота, тремор и некоординированные движения шеи [229, 290]. Любопытно однако, что в клетках мозжечка таких мышей, вопреки ожиданиям, K^+ -индуцированное повышение Ca^{2+} значительно меньше, как и скорость восстановления Ca^{2+} [229]. Видимо, в клетках мутантов происходит некая адаптация для поддержания Ca^{2+} -гомеостаза в условиях острой недостаточности РМСА [229].

Несмотря на столь блестящие успехи в изучении физиологической роли отдельных изоформ РМСА у мышей, пока не установлено четкой корреляции между специфическими нарушениями деятельности РМСА и какой-либо болезнью человека, в том числе и глухоты.

Немало работ посвящено исследованиям активности РМСА при эндокринных расстройствах организма. Например, экспрессия РМСА1 в клетках эндотелия сосудов повышается при воздействии вазоконстриктора ангиотензина II [140]. Это явление реализуется через множественные пути передачи сигнала: регулируемый протеинкиназой С (при действии форболового эфира – [142]), повышением Ca^{2+} (при действии тапсигаргина или иономицина) или цАМР (при действии изопротеренола, фенилэфрина, Cl-цАМФ) [140]. Такие воздействия регулируют экспрессию и РМСА, и SERCA [141].

Сообщалось о повышенной активности РМСА эритроцитов при гипертиреозидизме и пониженной – при гипотиреозидизме [75]. В то же время активность РМСА не изменялась при гиперпаратиреозидизме и наследственной доброкачественной гиперкальциемии [74].

Вполне вероятно роль нарушений функции РМСА в этиологии сахарного диабета и гипертонии, однако данные по этому вопросу несколько противоречивы: активность РМСА понижается при добавлении инсулина к мембранам адипоцитов в среде с низкой концентрацией Ca^{2+} [170, 171], но такой эффект не наблюдается в гепатоцитах [149], а в почках инсулин стимулирует РМСА [145–147]. Инсулин оказывает прямой сосудорасширяющий эффект, при этом понижая

внутриклеточный Ca^{2+} в гладких мышцах сосудов, что должно быть связано с активацией РМСА [152]. Интересно, что инсулин-имитирующие антитела (сыворотки пациентов с синдромом инсулиновой резистентности) понижают активность РМСА почек, в отличие от самого инсулина [159]. Очевидно, что инсулин имеет непрямой эффект на активность РМСА.

При экспериментальном инсулин-зависимом диабете (индуцируемом стрептозотоцином) у крыс происходят заметные изменения активности РМСА. В мозге активность снижена и частично восстанавливается при инсулиновой терапии [121], однако этот эффект проявляется только в среднем и промежуточном мозге, а не в коре, т.е. может быть изоформ-специфичным. В то же время и в печени [216], и в сарколемме сердца [35, 215] активность РМСА повышена. В почках активность РМСА существенно не изменяется [189].

У больных инсулин-зависимым сахарным диабетом активность РМСА эритроцитов снижена [100, 194, 214]. Была выдвинута гипотеза, что данное явление связано с интенсивным гликозилированием мембраны (экспонированных остатков лизина, в том числе и молекулы РМСА) [100]. По другим данным, обработка глюкозой в высокой концентрации не приводит к существенным изменениям активности РМСА эритроцитов [179]. У больных инсулин-независимым диабетом существенных изменений активности Ca^{2+} -АТФ-азы эритроцитов не обнаружено [153].

Очевидно, что наблюдаемые изменения активности РМСА при диабете не связаны с прямым эффектом инсулина на РМСА или регуляцией ее экспрессии. Предполагается участие в этом процессе протеинкиназы С [216]. Нельзя также исключить, что изменения активности РМСА вызваны какими-либо нарушениями метаболизма мембран. Действительно, гиперлипидемия у кроликов (при высокожировой диете) приводит к повышению базальной активности РМСА в эритроцитах на 31% и кальмодулин-активируемой – на 123% [178]. Но, поскольку РМСА сарколеммы сердца ингибируется холестерином [166], следует предположить, что при гиперлипидемии повышенная активность РМСА скорее всего является компенсаторным механизмом, вызванным повышенной кальциевой проницаемостью мембран с нарушенным липидным составом. При ожирении активность РМСА в эритроцитах крыс оказывается пониженной [182], а в клетках почечного эпителия не изменяется, но, в то же время, активность РМСА не стимулируется инсулином [263].

При гипертонии также повышен внутриклеточный Ca^{2+} и снижена активность РМСА эритроцитов [61, 226, 237]. В тромбоцитах такой же эффект наблюдается при повышенном диастолическом, но

не систолическом давлении (т.е. связано с нарушением кальциевого гомеостаза периферической системы кровообращения, но не сердечной мышцы) [69]. Предполагается, что это связано с фосфорилированием остатков тирозина РМСА тромбоцитов, которое вызывает либо прямое ингибирование РМСА, либо ее ускоренный распад [34]. Это противоречит данным других авторов, не обнаруживших при гипертензии изменения активности и количества РМСА [64, 222], а также сообщению о повышенной способности эвакуировать Ca^{2+} клетками гладких мышц аорты гипертонической линии крыс [156]. Кроме того, не обнаружено связи полиморфизмов во всех экзонах РМСА1 по крайней мере при обычных формах гипертензии [30, 31]. Здесь также нужно упомянуть, что пониженный уровень кальпа-статина в гипертонической линии крыс приводит к повышенному протеолизу РМСА и снижению ее активности [208]. Возможно, что разные формы гипертензии связаны с разными механизмами компенсации затрудненного клеточного гомеостаза Ca^{2+} . Однако большинство данных указывают, что при гипертензии активность РМСА понижена, хотя и не понятно, что является причиной, а что — следствием. Существует также гипотеза о том, что пониженная чувствительность к инсулину при гипертензии может быть связана с какими-либо системами ионного транспорта, в том числе и РМСА [152].

Интересно, что обычно многочисленные внутриклеточные регуляторы активируют РМСА, тогда как при патологических состояниях ее активность чаще всего оказывается сниженной. Вот характерный пример, иллюстрирующий эту закономерность — у собак при экспериментальном субарахноидальном кровоизлиянии активность РМСА снижается [245]. Это очень грубый стресс, приводящий к разрушительным последствиям. Однако простагландин F_{2a} , выделяющийся при таком стрессе, вызывает сужение базилярной артерии мозга и повышение активности РМСА [70]. Таким образом, в масштабах и клетки, и организма РМСА служит одним из компенсаторных механизмов в условиях патологии. Естественно, если способность РМСА бороться с нерегулируемым нарушением кальциевого гомеостаза исчерпана, то это приводит к развитию осложнений, углублению болезненного состояния.

Регуляция внеклеточного Ca^{2+} , в частности, его выделения в почках и экзокринных железах (например, в молочной железе), как и его поступления в кишечнике может также в значительной степени зависеть от РМСА. Показано, например, что экспрессия РМСА в тонкой кишке крысы повышается витамином D и снижается при старении [23, 26, 115]. Витамин D регулирует экспрессию РМСА и в почках [99, 112]. Гиперкальциурия, вызванная низкофосфатной диетой,

приводит к специфическому уменьшению экспрессии изоформ РМСА2б и РМСА3 [46], что может быть адаптационным ответом, призванным сократить реабсорбцию Ca^{2+} из мочи.

Во время лактации уровень всех четырех изоформ РМСА в молочной железе повышается довольно значительно, что должно отражать необходимость секреции большого количества кальция с молоком [180]. Таким образом, РМСА может быть важной для поддержания уровня не только внутриклеточного, но и внеклеточного кальция – как в отдельных тканях, так и на уровне всего организма.

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как видно из вышесказанного, структура РМСА напоминает структуру другой Ca^{2+} -АТФ-азы, SERCA, но дополнительно обладает двумя аутоингибиторными доменами, которые позволяют осуществлять тонкую регуляцию АТФ-азной и Ca^{2+} -транспортирующей активностей фермента. Многочисленные стимулы активируют РМСА посредством нейтрализации этих аутоингибиторных доменов. К числу важных эффекторов РМСА относятся: Ca^{2+} -кальмодулин, кислые фосфолипиды, кальпаин и каспазы, протеинкиназы А и С, а также и олигомеризация. Интересным фактом также является чувствительность ко многим веществам разных классов, например, к ингаляционным анестетикам и этанолу.

Наличие четырех изоформ и многочисленных сплайс-вариантов РМСА еще более усложняет ее регуляцию. До сих пор остается много белых пятен в картине функционирования РМСА. Однако за последние годы достигнут значительный прогресс в изучении особенностей отдельных изоформ, выявлены принципиально новые факты, например, взаимодействие РМСА с PDZ-доменами.

Важное биомедицинское значение РМСА очевидно. Нарушение отдельных изоформ у животных приводит к четким патологическим фенотипам, таким как глухота или стерильность. Развитие ряда заболеваний человека, например, сахарного диабета, также ассоциировано с определенными изменениями функции РМСА.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зварич Е.И., Шахпаронов М.И., Могданов Н.Н., Джеймс П.Х., Карафоли Э. (1991) Биол. мембраны, **8**, 677–688.
2. Кондратюк Т.П., Прищепя Л.А., Курский М.Д., Осипенко А.А. (1988) Биохимия, **53**, 793–798.
3. Костерин С.А., Браткова Н.Ф., Бабич Л.Г., Шинлова О.П., Слинченко Н.Н., Шлыков С.Г., Зимица Б.П., Ровенец Н.А., Велких Т.А. (1996) Укр. биохим. ж., **68**, 50–61.

4. Костерин С.А., Браткова Н.Ф., Слинченко Н.Н., Зимица В.П. (1998) Биофизика, **43**, 1037–1042
5. Курский М.Д., Слинченко Н.Н., Любаковская Л.А. (1990) Укр. биохим. ж., **62**, 66–71.
6. Любаковская Л.А., Слинченко Н.Н., Бурчинская Н.Ф., Курский М.Д. (1990) Биохимия, **55**, 1237–1243.
7. Овчинников Ю.А., Модянов Н.Н., Шахпаронов М.И., Зварич Е.И. (1987) Биол. мембраны, **4**, 1237–1243.
8. Пестов Н.Б. (1999) Дисс. «Структурно-функциональная организация Ca^{2+} -АТФазы плазматических мембран человека» канд. хим. наук. М: Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, 100 с.
9. Пестов Н.Б., Корнеева Т.В., Костина М.Б., Шахпаронов М.И. (1999) Биоорган. хим., **25**, 505–512.
10. Петруняк В.В., Северина Е.П., Орлов С.Н., Безлепкина Т.А., Панюшина Е.А. (1989) Биохимия, **54**, 974–979.
11. Слинченко Н.Н., Браткова Н.Ф., Костерин С.А., Зимица В.П., Черныш И.Х. (1998) Биохимия, **63**, 685–690.
12. Фещенко М.С., Зварич Е.И., Шахпаронов М.И., Модянов Н.Н. (1991) Биол. мембраны, **8**, 1237–1247.
13. Ходорова А.Б., Асташкин Е.И. (1997) ДАН РАН, **355**, 126–128.
14. Черныш И.Х., Слинченко Н.М. (1999) Укр. биохим. ж., **71**, 86–89.
15. Adamo H.P., Caride A.J., Penniston J.T. (1992) J. Biol. Chem., **267**, 14244–14249.
16. Adamo H.P., Grimaldi M.E., Bredston L.M. (2000) Biochim. Biophys. Acta, **1464**, 127–134
17. Adunyah E.S., Niggli V., Carafoli E. (1982) FEBS Lett., **143**, 65–68.
18. Afroze T., Husain M. (2000) J. Biol. Chem., **275**, 9062–9069.
19. Altamirano A.A., Beaube L. Cell Calcium **19**, 503–525.
20. Alves G.G., Lima L.M., Favero-Retto M.P., Lemos A.P., Peres-Sampaio C.E., Meyer-Fernandes J.R., Vieyra A., Sola-Penna M. (2001) Biosci Rep., **21**, 25–32.
21. Anderson R.G.W. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **90**, 10909–10913.
22. Antoine S., Pinet C., Coulombe A. (2001) J. Membr. Biol. **179**, 37–50.
23. Armbrecht H.J., Boltz M.A., Wongsurawat N. (1994) Biochim. Biophys. Acta., **1195**, 110–114.
24. Au K.S. (1996) Biochem. Mol. Biol. Int., **39**, 197–203.
25. Ba-Thein W., Caride A.J., Enyedi A., Paszty K., Croy C.L., Filoteo A.G., Penniston J.T. (2001) Biochem J., **356**, 241–245.
26. Barley N.F., Howard A., O'Callaghan D., Legon S., Walters J.R. (2001) Am. J. Physiol., **280**, G285–G290.
27. Bayley P.M., Findlay W.A., Martin S.R. (1996) Protein Sci., **5**, 1215–1228.
28. Benaim G., Cervino V., Lopez-Estrano C., Weitzman C. (1994) Biochim. Biophys. Acta, **1195**, 141–148.
29. Benaim G., de Meis L. (1989) FEBS Lett., **244**, 484–486.
30. Benkwitz C., Kubisch C., Kraft K., Neyses L. (1997) J. Mol. Med., **75**, 62–66.
31. Benkwitz C., Oberdorf-Maass S., Neyses L. (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun., **261**, 515–520.
32. Bettaiya R., Yallapragada P.R., Hall E., Rajanna S. (1996) Ecotoxicol. Environ. Safety, **33**, 157–162.
33. Bewaji C.O., Bababunmi E.A. (1987) Int. J. Biochem., **19**, 721–724.
34. Blankenship K.A., Dawson C.B., Aro-noff G.R., Dean W.L. (2000) Hypertension, **35**, 103–107.
35. Borda E., Pascual J., Wald M., Sterin-Borda L. (1988) Can. J. Cardiol., **4**, 97–101.
36. Brandt P., Ibrahim E., Bruns G.A., Neve R.L. (1992) Genomics, **14**, 484–487.

37. *Brandt P.C., Sissen J.E., Neve R.L., Vanaman T.C.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **93**, 13843–13848.
38. *Bredeston L.M., Rega A.F.* (2002) *Biochem. Biophys. Acta*, **1420**, 57–62.
39. *Bredeston L.M., Rega A.F.* (2002) *Biochem. J.*, **361**, 355–361.
40. *Brodin P., Falchetto R., Vorherr T., Carafoli E.* (1992) *Eur. J. Biochem.*, **204**, 939–946.
41. *Brown B.J., Hilfiker H., DeMarco S.J., Zacharias D.A., Greenwood T.M., Guerini D., Strehler E.E.* (1996) *Biochim. Biophys. Acta.*, **1283**, 10–13.
42. *Carafoli E.* (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 2115–2118.
43. *Carafoli E.* (1994) *FASEB J.*, **8**, 993–1002.
44. *Carafoli E., Genazzani A., Guerini D.* (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **266**, 624–632.
45. *Carafoli E., Stauffer T.J.* (1994) *Neurobiology*, **25**, 312–324.
46. *Caride A.J., Chini E.N., Penniston J.T., Dousa T.P.* (1999) *Kidney Int.*, **56**, 1818–1825.
47. *Caride A.J., Elwess N.L., Verma A.K., Filoteo A.G., Enyedi B., Bajzer Z., Penniston J.T.* (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 35227–35232.
48. *Caride A.J., Filoteo A.G., Penheiter A.R., Pószty K., Enyedi B., Penniston J.T.* (2001) *Cell Calcium*, **30**, 49–57
49. *Caride A.J., Gorski J.P., Penniston J.T.* (1988) *Biochem. J.*, **255**, 663–670.
50. *Caroni P., Carafoli E.* (1981) *J. Biol. Chem.*, **256**, 3263–3270.
51. *Capuozzo E., Verginelli D., Crifo C., Salerno C.* (1997) *Biochim. Biophys. Acta.*, **1357**, 123–127.
52. *Cavieres J.D.* (1984) *Biochim. Biophys. Acta.*, **771**, 241–244.
53. *Cervino V., Benaim G., Carafoli E., Guerini D.* (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 29811–29815.
54. *Chaudhary J., Walia M., Matharu J., Escher E., Grover A.K.* (2001) *Am. J. Physiol.*, **280**, C1027–C1030.
55. *Cheng H.Y., Magocsi M., Cooper R.S., Penniston J.T., Borke J.L.* (1994) *Cell. Physiol. Biochem.*, **4**, 31–43.
56. *Chicka M.C., Strehler E.E.* (2003) *J. Biol. Chem.* in press.
57. *Chiesi M., Vorherr T., Falchetto R., Waelchli C., Carafoli E.* (1991) *Biochemistry*, **30**, 7978–7983.
58. *Chiesi M., Zurini M., Carafoli E.* (1984) *Biochemistry*, **23**, 2595–2600.
59. *Cho J.K., Bikle D.D.* (1997) *J. Cell. Physiol.*, **172**, 146–154.
60. *Choquette D., Hakim G., Filoteo A., Plishker G.A., Bostwick J.R., Penniston J.T.* (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **125**, 908–915.
61. *Chung W.S., Lee S.H., Kim J.C., Heo W.D., Kim M.C., Park C.Y., Lim C.O., Kim W.B., Harper J.F., Cho M.J.* (2000) *Plant Cell*, **12**, 1393–107.
62. *Coelho-Sampaio T., Ferreira S.T., Benaim G., Vieyra A.* (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 22266–22276.
63. *Coelho-Sampaio T., Teixeira-Ferreira A., Vieyra A.* (1990) *J. Biol. Chem.*, **266**, 10249–10253.
64. *Dagher G., Amar M., Kherif A.* (1987) *Biochim. Biophys. Acta*, **903**, 218–228.
65. *Dagher G., Lew V.L.* (1988) *J. Physiol.*, **407**, 569–586
66. *Daugirdas J.T., Arrieta J., Ye M., Flores G., Bailie D.C.* (1995) *J. Clin. Invest.*, **95**, 1480–1489.
67. *Davis F.B., Davis P.J., Blas S.D., Schoenl M.* (1987) *Biochem. J.*, **248**, 511–516.
68. *Dean W.L., Chen D., Brandt P.C., Vanaman T.C.* (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 15113–15119.
69. *Dean W.L., Pope J.E., Brier M.E., Aronoff G.R.* (1994) *Hypertension*, **23**, 31–37.
70. *Deliconstantinos G., Fotiou S.* (1986) *J. Endocrinol.*, **110**, 395–404.
71. *DeMarco S.J., Chicka M.C., Strehler E.E.* (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 10506–10511.
72. *DeMarco SJ, Strehler EE.* (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 21594–21600.

73. Dodson H.C., Charalabapoulou M. (2001) *J. Neurocytol.*, **30**, 281–292.
74. Donahue H.J., Penniston J.T., Heath H. III (1989) *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **68**, 893–898.
75. Dube M.P., Davis F.B., Davis P.J., Schoenl M., Blas S.D. (1986) *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **62**, 253–257.
76. Enyedi Á., Elwess N.L., Filoteo A.G., Verma A.K., Pászty K., Penniston J.T. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 27525–27528.
77. Enyedi Á., Flura M., Sarkadi B., Gardos G., Carafoli E. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 6425–6430.
78. Enyedi Á., Minami J., Caride A.J., Penniston J.T. (1988) *Biochem. J.*, **252**, 215–220.
79. Enyedi Á., Sarkadi B., Nyers A., Gardos G. (1982) *Biochim. Biophys. Acta*, **690**, 41–49.
80. Enyedi Á., Verma A.K., Heim R., Adamo H.P., Filoteo A.G., Strehler E.E., Penniston J.T. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 41–43.
81. Enyedi Á., Vorherr T., James P., McCormick D.J., Filoteo A.G., Carafoli E., Penniston J.T. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 12313–12321.
82. Falchetto R., Vorherr T., Brunner J., Carafoli E. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 2930–2936.
83. Falchetto R., Vorherr T., Carafoli E. (1992) *Protein Science*, **1**, 1613–1621.
84. Ferreira H.G., Lew V.L. (1975) *J. Physiol. (London)*, **252**, 86P–87P.
85. Ferrington D.A., Chen X., Krainev A.G., Michaelis E.K., Bigelow D.J. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **237**, 163–165.
86. Feschenko M.S., Zvaritch E.I., Hofmann F., Shakhparonov M.I., Modyanov N.N., Vorherr T., Carafoli E. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 4097–4101.
87. Filoteo A.G., Enyedi Á., Penniston J.T. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 11800–11805.
88. Filoteo A.G., Enyedi Á., Verma A.K., Elwess N.L., Penniston J.T. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 4323–4328.
89. Foder B., Scharff O. (1981) *Biochim. Biophys. Acta*, **649**, 367–376.
90. Franks J.J., Horn J.-L., Janicki P.K., Singh G. (1995) *Anesthesiology*, **82**, 108–117.
91. Friere M.M., Carvalho-Alves P.C., Barrabin H., Scofano H.M. (1997) *Biochim. Biophys. Acta*, **1323**, 291–298.
92. Fujimoto T. (1993) *J. Cell. Biol.*, **120**, 1147–1157.
93. García-Martin E., Gutierrez-Merino C. (1990) *J. Neurochem.*, **54**, 1238–1246.
94. Garrahan P.J., Rega A.F. (1978) *Biochim. Biophys. Acta*, **513**, 59–65.
95. Gassner B., Luterbacher S., Schatzmann H.J., Wuthrich A. (1998) *Cell Calcium*, **9**, 95–103.
96. Gatto C., Hale C.C., Xu W., Milanick M.A. (1995) *Biochemistry*, **34**, 965–972.
97. Gatto C., Milanick M.A. (1993) *Am. J. Physiol.*, **264**, C1577–C1586.
98. Gimble J.M., Waisman D.M., Gustin M., Goodman D.B., Rasmussen H. (1982) *J. Biol. Chem.*, **257**, 10781–10788.
99. Glendenning P., Ratajczak T., Dick I.M., Prince R.L. (2000) *Arch. Biochem. Biophys.*, **380**, 126–132.
100. Gonzalez Flecha F.L., Bermudez M.C., Cedola N.V., Gagliardino J.J., Rossi J.P. (1990) *Diabetes*, **39**, 707–711.
101. Greeb J., Shull G.E. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 18569–18576.
102. Guerini D., Garcia-Martin E., Gerber A., Volbracht C., Leist M., Merino C.G., Carafoli E. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 1667–1676.
103. Guerini D., Wang X., Li L., Genazani A., Carafoli E. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 3706–3712.
104. Guilherme A., Reis-Silva C., Moraes-Albuquerque J.H., Oliveira M.M., Vieyra A. (1998) *Biosci. Rep.*, **18**, 79–89.
105. Hammes A., Oberdorf-Maass S., Jenatschke S., Pelzer T., Maass A.

- Gollnick F., Meyer R., Afflerbach J., Neyses L. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 30816–30822.
106. Hammes A., Oberdorf-Maas S., Rother T., Nething K., Gollnick F., Linz K.W., Meyer R., Hu K., Han H., Gaudron P., Ertl G., Hoffmann S., Ganten U., Vetter R., Schuh K., Benkwitz C., Zimmer H.G., Neyses L. (1998) *Circ. Res.*, **83**, 877–888.
107. Hao L., Rigaud J.-L., Inesi G. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 14268–14275.
108. Herscher C.J., Rega A.F. (1996) *Biochemistry*, **35**, 14917–14922.
109. Herscher C.J., Rega A.F., Adamo H.P. (1996) *Biochem. J.*, **315**, 673–677.
110. Herscher C.J., Rega A.F., Garrahan P.J. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 10400–10406.
111. Hilfiker H., Guerini D., Carafoli E. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 26178–26183.
112. Hoenderop J.G., Dardenne O., Van Abel M., Van Der Kemp A.W., Van Os C.H., St-Arnaud R., Bindels R.J. (2002) *FASEB J.*, **16**, 1398–1406.
113. Hogstrand C., Verboost P.M., Wendelaar Bonga S.E. (1999) *Toxicology*, **133**, 139–145.
114. Horn J.L., Janicki P.K., Franks J.J. (1999) *Life Sci.*, **64**, PL179–PL183.
115. Horst R., Prapong S., Reinhardt T., Koszewski N., Knutson J., Bishop C. (2000) *Biochem. Pharmacol.*, **60**, 701–708.
116. Husain M., Jiang L., See V., Bein K., Simons M., Alper S.L., Rosenberg R.D. (1997) *Am. J. Physiol.*, **272**, C1947–C1959.
117. Ishii T., Takeyasu K. (1995) *EMBO J.*, **14**, 58–67.
118. James P., Maeda M., Fischer R., Verma A.K., Krebs J., Penniston J.T., Carafoli E. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 2905–2910.
119. James P., Vorherr T., Krebs J., Morelli A., Castello G., McCormick D.J., Penniston J.T., De Flora A., Carafoli E. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 8289–8296.
120. James P., Vorherr T., Thulin E., Forsen S., Carafoli E. (1991) *FEBS Lett.*, **278**, 155–159.
121. Janicki P.K., Horn J.-L., Singh J., Janson V.E., Franks W.T., Franks J.J. (1995) *Life Sci.*, **56**, 357–363.
122. Kasas S., Hofmann F., Celio M.R., Carafoli E. (1992) *Scanning Microsc.*, **14**, 276–281.
123. Keep R.F., Ulanski L.J. 2nd, Xiang J., Ennis S.R., Lorriss Betz A. (1999) *Brain. Res.*, **815**, 200–205.
124. Keeton T.P., Shull G.E. (1995) *Biochem. J.*, **306**, 779–785.
125. Kessler F., Bennardini F., Bachs O., Serratosa J., James P., Caride A.J., Gazzotti P., Penniston J.T., Carafoli E. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 16012–16019.
126. Khodorov B., Pinelis V., Vergun O., Storozhevyykh T., Fajuk D., Vinskaya N., Arsenjeva E., Khaspekov L., Lyzin A., Isaev N., Andreeva N., Victorov I. (1995) *FEBS Lett.*, **371**, 249–252.
127. Knauf P.A., Proverbio A.F., Hoffman J.F. (1974) *J. Gen. Physiol.*, **63**, 324–336.
128. Kosk-Kosicka D., Bzdega T. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 18184–18189.
129. Kosk-Kosicka D., Bzdega T. (1990) *Biochemistry*, **29**, 3772–3776.
130. Kosk-Kosicka D., Bzdega T., Johnson J.D. (1990) *Biochemistry*, **29**, 1875–1879.
131. Kosk-Kosicka D., Fomitcheva I., Lopez M.M. (1996) *Biochemistry*, **35**, 900–905.
132. Kosk-Kosicka D., Inesi G. (1985) *FEBS Lett.*, **189**, 67–71.
133. Kosk-Kosicka D., Lopez M.M., Fomitcheva I., Lew V.L. (1995) *FEBS Lett.*, **371**, 57–60.
134. Kosk-Kosicka D., Scaillet S., Inesi G. (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 3333–3338.
135. Kozel P.J., Davis R.R., Krieg E.F., Shull G.E., Erway L.C. (2002) *Hear. Res.*, **164**, 231–239.

136. *Kozel P.J., Friedman R.A., Erway L.C., Yamoah E.N., Liu L.H., Riddle T., Duffy J.J., Doetschman T., Miller M.L., Cardell E.L., Shull G.E.* (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 18693–18696.
137. *Krizaj D., Copenhagen D.R.* (1998) *Neuron*, **21**, 249–256.
138. *Kubitscheck U., Pratsch L., Passow H., Peters R.* (1995) *Biophys. J.*, **69**, 30–41.
139. *Kumar R., Haugen J.D., Penniston J.T.* (1993) *J. Bone Mineral Res.*, **8**, 505–513.
140. *Kuo T.H., Liu B.-F., Diglio C., Tsang W.* (1993) *Arch. Biochem. Biophys.*, **305**, 428–433.
141. *Kuo T.H., Liu B.F., Yu Y., Wuytack F., Raeymaekers L., Tsang W.* (1997) *Cell Calcium*, **21**, 399–408.
142. *Kuo TH, Wang KK, Carlock L, Diglio C, Tsang W.* (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 2520–2525.
143. *Lamers J.M., Stinis J.T.* (1983) *Cell Calcium*, **4**, 281–294.
144. *Lee K.S., Au K.S.* (1983) *Biochim. Biophys. Acta*, **742**, 54–62.
145. *Levy J., Gavin J.R. III.* (1995) *Int. J. Obesity Relat. Metab. Disord.*, **19**, 97–102.
146. *Levy J., Gavin J.R. III, Hammerman M.R., Avioli L.V.* (1986) *Diabetes*, **35**, 899–905.
147. *Levy J., Gavin J.R. III, Morimoto S., Hammerman M.R., Avioli L.V.* (1986) *Endocrinology*, **119**, 2405–2411.
148. *Levi V., Rossi J.P., Castello P.R., Gonzalez Flecha F.L.* (2002) *Biophys J.*, **82**, 437–446.
149. *Lin S.-H., Wallace M.A., Fain J.N.* (1983) *Endocrinology*, **113**, 2268–2275.
150. *Lindner A., Hinds T.R., Joly A., Schreiner G.F.* (1999) *J. Am. Soc. Nephrol.* **10**, 1170–1178.
151. *Lopez M.M., Kosk-Kosicka D.* (1998) *Biophys. J.*, **74**, 974–980.
152. *McCarty M.F.* (1994) *Med. Hypotheses*, **42**, 226–236.
153. *Migdalís I.N., Xenos K., Chairopoulos K., Varvarigos N., Leontíades E., Karmaniolas K.* (2000) *Diabetes Res.*, **49**, 113–118.
154. *Minocherhomjee A.M., Beaugard G., Potier M., Roufogalis B.D.* (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **116**, 895–900.
155. *Molinari M., Anagli J., Carafoli E.* (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 27992–27995.
156. *Monteith G.R., Kable E.P.W., Chen S., Roufogalis B.D.* (1996) *J. Hypertens.*, **14**, 435–442.
157. *Morgans C.W., El Flar O., Bernson A., Wssle H., Taylor W.R.* (1998) *J. Neurosci.*, **18**, 2467–2474.
158. *Naderali E.K., Buttell N., Taggart M.J., Bullock A.J., Eisner D.A., Wray S.* (1997) *J. Physiol. (London)*, **505**, 329–336.
159. *Nagy K., Grunberger G., Levy J.* (1990) *Endocrinology*, **126**, 45–52.
160. *Niggli V., Adunyah E.S., Carafoli E.* (1981) *J. Biol. Chem.*, **256**, 8588–8592.
161. *Niggli V., Adunyah E.S., Penniston J.T., Carafoli E.* (1981) *J. Biol. Chem.*, **256**, 395–401.
162. *Niggli V., Penniston J.T., Carafoli E.* (1979) *J. Biol. Chem.*, **254**, 9955–9958.
163. *Niggli V., Sigel E., Carafoli E.* (1982) *J. Biol. Chem.*, **257**, 2350–2356.
164. *Ono K., Wang X., Han I.* (2001) *Mol. Cell Biol.*, **21**, 8276–8288.
165. *Orlov S.N., Pokudin N.I., Reznikova M.B., Rjazhsky G.G., Postnov Y.V.* (1983) *Eur. J. Biochem.*, **132**, 315–319.
166. *Ortega A., Mas-Oliva J.* (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **139**, 868–874.
167. *Papp B., Sarkadi B., Enyedi Á., Caride A.J., Penniston J.T., Gardos G.* (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 4577–4582.
168. *Pászty K., Verma A.K., Padányi R., Filoteo A.G., Penniston J.T., Enyedi Á.* (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 6822–6829.

169. Penniston J.T., Enyedi Á., Verma A.K., Adamo H.P., Filoteo A.G. (1997) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **834**, 56–64.
170. Pershadsingh H.A. McDonald J.M. (1979) *Nature*, **281**, 495.
171. Pershadsingh H.A. McDonald J.M. (1981) *Biochem. Int.*, **2**, 243.
172. Pflugmacher D., Sandermann H. Jr. (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, **1415**, 174–180.
173. Pikula S., Wrzosek A., Famulski K.S. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, **1061**, 206–214.
174. Pine R.W., Vincenzi F.F., Carrico C.J. (1983) *J. Trauma*, **23**, 366–371.
175. Pinet C., Antoine S., Filoteo A.G., Penniston J.T., Coulombe A. (2002) *J. Membr. Biol.*, **187**, 185–201.
176. Preiano B.S., Guerini D., Carafoli E. (1996) *Biochemistry*, **35**, 7946–7953.
177. Post H., Wiche R., Sen P.C., Hoffbauer G., Albrecht M., Seitz J., Aumuller G., Wilhelm B. (2002) *Prostate*, **52**, 159–166.
178. Raess B.U., Porro R.F., Tunnicliff G. (1995) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **201**, 410–417.
179. Raftos J.E., Edgley A., Bookchin R.M., Etzion Z., Lew V.L., Tiffert T. (2001) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **280**, C1449–C1454.
180. Reinhardt T.A., Filoteo A.G., Penniston J.T., Horst R.L. (2000) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **279**, C1595–C1602.
181. Reinlib L.J., Clark A.F., Carafoli E. (1984) *J. Bioenergetics Biomembranes*, **16**, 611–622.
182. Remke H., Wilsdorf A., Rehorek A. (1991) *Exp. Pathol.*, **43**, 67–73.
183. Reusch R.N., Huang R., Kosk-Kosicka D. (1997) *FEBS Letters*, **412**, 592–596.
184. Rossi J.P.F.C., Delfino J.M., Caride A.J., Fernandez H.N. (1995) *Biochemistry*, **34**, 3802–3812.
185. Rossi J.P., Rega A.F. (1989) *Biochim. Biophys. Acta*, **996**, 153–159.
186. Rothenberg K.G., Ying Y., Kolhouse J.F., Kamen B.A., Anderson R.G.W. (1990) *J. Cell. Biol.*, **110**, 637–649.
187. Roufogalis B.D. (1979) *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **12**, 1331–1349.
188. Sackett D.L., Kosk-Kosicka D. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 9987–9991.
189. Sahai A., Ganguly P.K. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **169**, 537–544.
190. Salamino F., Spartore B., Melloni E., Michetti M., Viotti P.L., Pontremoli S., Carafoli E. (1994) *Cell Calcium*, **15**, 28–35.
191. Santiago-Garcia J., Delgado-Coello B.A., Mas-Oliva J. (2000) *Mol. Cell Biochem.*, **209**, 105–112.
192. Sarkai B., Enyedi Á., Fuldés-Papp Z., Górdos G. (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 9552–9557.
193. Sasamura S., Furukawa K., Shiratori M., Motomura S., Ohizumi Y. (2002) *Jpn. J. Pharmacol.*, **90**, 164–172.
194. Schaefer W., Priessen J., Mannhold R., Gries A.F. (1987) *Klin. Wochenschr.*, **65**, 17–21.
195. Scharff O., Foder B. (1982) *Biochim. Biophys. Acta*, **691**, 133–143.
196. Scharff O., Foder B., Skibsted U. (1983) *Biochim. Biophys. Acta*, **730**, 295–305.
197. Scharff O., Foder B. (1986) *Biochim. Biophys. Acta*, **861**, 471–479.
198. Schneider C., Mottola C., Dolzani L., Romeo D. (1982) *Adv. Exp. Med. Biol.*, **141**, 463–472.
199. Schuh K., Uldrijan S., Gambaryan S., Roethlein N., Neyses L. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 9778–9783.
200. Schuh K., Uldrijan S., Telkamp M., Roethlein N., Neyses L. (2001) *J. Cell Biol.*, **155**, 201–205.
201. Schwab E.L., Guerini D., Didszun C., Bano D., Ferrando-May E., Fava E., Tam J., Xu D., Xanthoudakis S., Nicholson D.W., Carafoli E., Nicoletta P. (2002) *Cell Death Differ.*, **9**, 818–838.
202. Shimizu H., Borin M.L., Blaustein M.P. (1997) *Cell Calcium*, **21**, 31–41.

203. Shull G.E., Greeb J. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 8646–8657.
204. Smallwood J.I., Waisman D.M., Lafreniere D., Rasmussen H. (1983) *J. Biol. Chem.*, **258**, 11092–11097.
205. Smart E.J., Foster D.C., Ying Y.-S., Kamen B.A., Anderson R.G.W. (1994) *J. Cell Biol.*, **124**, 307–313.
206. Sobolevsky A.I., Yelshansky M.V., Khodorov B.I. (2000) *Mol. Pharmacol.*, **57**, 334–341.
207. Sola-Penna M., Lemos A.D.P., Vieyra A. (1995) *Z. Naturforsch.*, **50**, 845–853.
208. Soldati L., Vezzoli G., Salarci S., Spaventa R., Barber B.R., Azzani T., Bianchi G. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **222**, 572–575.
209. Street V.A., McKee-Johnson J.W., Fonseca R.C., Tempel B.L., Noben-Trauth K. (1998) *Nature Genet.*, **19**, 390–394.
210. Strehler E.E., James P., Fischer R., Heim R., Vorherr T., Filoteo A.G., Penniston J. T., Carafoli E. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 2835–2842.
211. Strehler E.E., Zacharias D.A. (2001) *Physiol. Rev.*, **81**, 21–50.
212. Suju M., Davila M., Poleo G., Doccampio R., Benaim G. (1996) *Biochem. J.*, **317**, 933–938.
213. Szasz I., Sarkadi B., Schubert A., Gardos G. (1978) *Biochim. Biophys. Acta*, **512**, 331–340.
214. Szlachowska M., Schaefer W., Gries A.F., Kinalska I. (1992) *Endokrynol. Pol.*, **43**, 23–29.
215. Taira Y., Hata T., Ganguly P.K., Elimban V., Dhalla N.S. (1991) *Am. J. Physiol.*, **260**, E626–E632.
216. Takahashi H., Murata T., Hanahisa Y., Yamaguchi M. (1998) *Mol. Cell Biochem.*, **178**, 311–316.
217. Tao J., Haynes D.H. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 24972–24982.
218. Taverna R.D., Hanahan D.J. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **94**, 652–659.
219. de Tezanos Pinto F., Adamo H.P. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 12784–12789.
220. Tiffert T., Lew V.L. (2001) *Cell Calcium*, **30**, 337–342.
221. Timmermans J.A., Bindels R.J., Van Os C.H. (1995) *J. Nutrition*, **125**, 1981S–1986S.
222. Timmermans J.A., Thien T., Smits P., van Os C.H. (1994) *Am. J. Hypertens.*, **7**, 90–95.
223. Tokumura A., Mostafa M.H., Nelson D.R., Hanahan D.J. (1985) *Biochim. Biophys. Acta*, **812**, 568–574.
224. Toledo-Maciel A., Goncalves-Gomes S, de Gouveia Castex M, Vieyra A. (1998) *Biochemistry*, **37**, 15261–15265.
225. Ton V.-K., Mandal D., Vahadji C., Rao R. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 6422–6427.
226. Touyz R.M., Milne F.J., Reinach S.G. (1992) *J. Hypertens.*, **10**, 571–578.
227. Toyoshima C., Nakasako M., Nomura H., Ogawa H. (2000) *Nature*, **405**, 647–655.
228. Toyoshima C., Nomura H. (2002) *Nature*, **418**, 605–611.
229. Ueno T, Kameyama K, Hirata M, Ogawa M, Hatsuse H, Takagaki Y, Ohmura M, Osawa N, Kudo Y. (2002) *Neurosci Res.*, **42**, 287–297.
230. Verbist J., Gadella T.W., Raeymaekers L., Wuytack F., Wirtz K.W., Casteels R. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, **1063**, 1–6.
231. Verbist J., Wuytack F., Raeymaekers L., Van Leuven F., Cassiman J.-J., Casteels R. (1986) *Biochem. J.*, **240**, 633–640.
232. Verboost P.M., Flik G., Pang P.K.T., Lock R.A.C., Wendelaar Bonga S.E. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 5613–5615.
233. Verma A.K., Filoteo A.G., Stanford D.R., Wieben E.D., Penniston J.T., Strehler E.E., Fischer R., Heim R., Vogel G., Mathews S., Strehler-Page M.-A., James P., Vorherr T., Krebs J., Carafoli E. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 14152–14159.

234. *Vieyra A.* (1996) *Biosci. Rep.*, **16**, 115–127.
235. *Vieyra A., Caruso-Neves C., Meyer-Fernandes J.R.* (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 10324–10330.
236. *Vincenzi F.F., Hinds T.R., Raess B.U.* (1980) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **356**, 245–257.
237. *Vincenzi F.F., Morris C.D., Kinsel L.B., Kenny M., McCarron D.A.* (1986) *Hypertension*, **8**, 1058–1066.
238. *Visser G.J., Peters P.H., Theuvenet A.P.* (1993) *Biochim. Biophys. Acta*, **1152**, 26–34.
239. *Vorherr T., Chiesi M., Schwaller R., Carafoli E.* (1992) *Biochemistry*, **31**, 371–376.
240. *Vorherr T., Kessler T., Hofmann F., Carafoli E.* (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 22–27.
241. *Vorherr T., Quadroni M., Krebs J., Carafoli E.* (1992) *Biochemistry*, **31**, 8245–8251.
242. *Waisman D.M., Gimble J.M., Goodman D.B.P., Rasmussen H.* (1981) *J. Biol. Chem.*, **256**, 415–419.
243. *Waisman D.M., Gimble J.M., Goodman D.B.P., Rasmussen H.* (1981) *J. Biol. Chem.*, **256**, 409–414.
244. *Walters J.R.F.* (1989) *Am. J. Physiol.*, **256**, G124–G128.
245. *Wang J., Ohta S., Sakaki S., Araki N., Matsuda S., Sakanaka M.* (1994) *J. Neurosurg.*, **80**, 269–275.
246. *Wang X., Reznick S., Li P., Liang W., van Breemen C.* (2002) *Cell Calcium*, **31**, 265–277.
247. *Wang K.K.W., Roufogalis B.D., Villalobo A.* (1988) *Arch. Biochem. Biophys.*, **267**, 317–327.
248. *Wang K.K.W., Roufogalis B.D., Villalobo A.* (1989) *J. Membrane Biol.*, **112**, 233–245.
249. *Wang K.K.W., Villalobo A., Roufogalis B.D.* (1988) *Arch. Biochem. Biophys.*, **260**, 696–704.
250. *Wetzker R., Klinger R., Frunder H.* (1983) *Biochim. Biophys. Acta*, **730**, 196–200.
251. *Xu Y., Liu J., Zhang S., Liu L.* (1987) *Biochem. J.*, **248**, 985–988.
252. *Xu Y.H., Roufogalis B.D.* (1988) *J. Membr. Biol.*, **105**, 155–164.
253. *Xu W., Wilson B.J., Huang L., Parkinson E.L., Hill B.J., Milanick M.A.* (2000) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **278**, C965–C972.
254. *Yang Y.-C., Yingst D.R.* (1989) *Am. J. Physiol.*, **256**, C1138–C1144.
255. *Yao Y., Gao J., Squier T.C.* (1996) *Biochemistry*, **35**, 12015–12028.
256. *Yazawa M., Vorherr T., James P., Carafoli E., Yagi K.* (1992) *Biochemistry*, **31**, 3171–3176.
257. *Yingst D.R., Barrett V.E.* (1994) *Biochim. Biophys. Acta*, **1189**, 113–118.
258. *Zabe M., Feltzer R.E., Malle E., Sattler W., Dean W.L.* (1999) *Cell Calcium*, **26**, 281–287.
259. *Zacharias D.A., Strehler E.E.* (1996) *Current Biol.*, **6**, 1642–1652.
260. *Zhang B.-X., Zhao H., Loessberg P., Muallem S.* (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 15419–15425.
261. *Zhao D., Elimban V., Dhalla N.S.* (1991) *Moll. Cell Biochem.*, **16**, 151–160.
262. *Zhao J., Vasilets L.A., Yoshimura S.H., Gu Q., Ishii T., Takeyasu K., Schwarz W.* (1997) *FEBS Lett.*, **408**, 271–275.
263. *Ziegelhoffer A., Ravingerova T., Styk J., Sebkova J., Waczulikova I., Breier A., Dzurba A., Volkova K., Carsky J., Turecky L.* (1997) *Moll. Cell Biochem.*, **176**, 191–198.
264. *Zurini M., Krebs J., Penniston J.T., Carafoli E.* (1984) *J. Biol. Chem.*, **259**, 618–627.
265. *Zvaritch E., James P., Vorherr T., Falchetto R., Modyanov N., Carafoli E.* (1990) *Biochemistry*, **29**, 8070–8076.