НЕЙРОХИМИЯ

т. 9, № 2, 1990

ОБЗОРЫ

УДК 577.15.024

Ca^{2+}-КАЛЬМОДУЛИН И СОПРЯЖЕННЫЕ СИСТЕМЫ РЕГУЛЯЦИИ

ГАЛОЯН А. А.

Институт биохимии им. Г. Х. Буниятяна АН Армении, Ереван

В обзоре схематично обобщены основные и, главным образом, новейшие литературные данные о роли Ca^{2+}-кальмодулиновой системы в регуляции активности ряда ферментов, различных физиологических процессов, а также описаны генетически детерминированные участки (Е-участки) связывания ионов кальция с различными белками, функциональная роль некоторых из них не совсем ясна. Полученные в нашей лаборатории данные о существовании в мозгу пептидной системы регуляции активности некоторых Ca^{2+}-кальмодулинзависимых ферментов (С-модулины), без участия ионов кальция и кальмодулина в концентрации 10^{-9}—10^{-12} М, а также пептидов мозга с величиной M_r 3,5—7 кД, которые активируют как ФДЭ, так и киназу легкой цепи миозина без участия ионов кальция, свидетельствуют о наличии дополнительных систем регуляции активности этих ферментов. Последние пептиды связываются с кальмодулином подобно ионам кальция и затем активируют указанные ферменты. Допускается,что эти нейропептиды гипоталамуса, вероятно, аналогичны подобным во многих других тканях, являющимся первичными регуляторами активности ферментов, когда концентрация ионов кальция составляет в клетке 10^{-8}—10^{-6} М. Другим важным фактором регуляции активности Ca^{2+}-кальмодулинзависимых ферментов являются нейрогормон «С» и подобные соединения, которые, будучи конкурентными ингибиторами ФДЭ cAMP и cGMP, вместе с тем являются транслокаторами ионов кальция. Они из саркоплазматического ретикулума и миоплазмы транспортируют ионы кальция во внеклеточное пространство, благодаря чему уровень Ca^{2+} в клетке заметно снижается, что приводит к релаксации клетки. Представленный механизм расширяет наши представления о новых системах регуляции Ca^{2+}-кальмодулинзависимых ферментов и физиологических процессов.

Ионы кальция являются фундаментальным регуляторным фактором различных внутриклеточных процессов и активатором всех актомиозинзависимых сократительных систем, хотя их молекулярные механизмы могут быть разные в зависимости от различных типов мышц. В мышечных клетках при покое содержание свободного Ca^{2+} составляет около 10^{-7} М. Повышение концентрации Ca^{2+} до 10^{-5} М приводит к сокращению мышц. Во всех типах мышечных клеток Ca^{2+} соединяется со специфическими (sensor) участками соответствующего белка, что вызывает сокращение мышц.

Имеется три типа регуляции сокращения, которые включают различные чувствительные молекулы, связывающие ионы кальция:

1) тропонин С—Ca^2 -связывающий компонент тропонина, участвующий в регуляции сокращения поперечнополосатых мышц позвоночных;

2) регуляторная легкая цепь миозина, играющая роль в регуляции сокращения мышц моллюсков [1]; следует, однако, заметить, что у моллюсков в отсутствие миозина регуляторная легкая цепь полностью активируется актином даже в бескальциевой среде, но может быть ингибирована при добавлении легких цепей гладких мышц позвоночных [2];

3) кальмодулин (КМ), который, связываясь с ионами кальция, активирует киназу легкой цепи миозина, что приводит к сокращению гладкой мускулатуры позвоночных [3], то есть сокращение гладких мышц происходит только при наличии Ca^2 -кальмодулинового комплекса через фосфорилирование. Ионы кальция имеют многогранную функцию в нервной системе. На поверхности клетки они изменяют мембранную стабильность и проницаемость в отношении различных ионов и включаются в процесс реализации нервного импульса.

При стимуляции увеличивается вхождение Ca^2 в нервную клетку, что способствует выделению нейротрансмиттера в синаптическую щель. Огромную роль ионы кальция и КМ играют в активировании ряда ферментов метаболизма как в нервной, так и в других тканях.

В табл. 1 приведены Ca^{2+} -КМ-регулируемые ферменты. Описано более 30 Ca^{2+} -КМ-активируемых ферментов в различных тканях и количество таких ферментов непрерывно растет. Недавно этот список пополнился еще одним ферментом—5′-нуклеотидазой мозга [4]. Можно заключить, что как фосфорилирование, так и дефосфорилирование белков и ферментов, образование биологически активных пептидов, циклических нуклеотидов, нейротрансмиттеров, в частности катехоламинов, сокращение гладких мышц, генерация кальциймобилизирующих фосфолипидов, процессы мембранного транспорта и др., находятся в зависимости от Ca^2 - кальмодулинового комплекса. КМ является ключевым элементом в передаче (количественной) сигналов кальция внутрь клетки [5]. Количественная передача сигнала Ca^2 внутрь клетки посредством КМ состоит, по крайней мере, из четырех компонентов [5]:

а) молекулярные механизмы, которые определяют Ca^2 -зависимое взаимоотношение КМ с белками-мишенями (кинетическая регуляция);

б) локализация КМ и белков-мишеней в клетке (топологическая регуляция);

в) соотношение между концентрацией КМ и различных белков-мишеней (генная регуляция);

г) посттрансляционная модификация белков-мишеней и КМ.

Имеется ряд кальцийсвязывающих белков, функциональная роль которых еще недостаточно изучена. Кальцийсвязывающими белками являются тропонин С [6], парвальбумин [7, 8], кальсеквестрин [9], белок СВР-1 (Calcium Binding Protein) [10], В-субъединица кальцийнейрина [11], регуляторная цепь миозина [1, 12], кальбиндин Д (витамин-Д-зависимое связывание ионов кальция), белок S-100 [13], аккомодулин [14]. Ca^2 -кальмодулиновая система играет важную роль не только в активировании различных ферментов (в метаболических процессах), но и в осуществлении самых разных биологических процессов (табл. 2). Установлено, что все Ca^2 -связывающие

Таблица 1

Ca^{2+}-кальмодулин регулируемые ферменты

Ферменты	Литература		
ФДЭ cAMP, cGMP	Cheung W. Y. Kakiuchi S. Yamazaki R	1970 1970	[46] [49]
Аденилатциклаза	Cheung W. Y. Klee C. B. Means A. R. Dedman J. R Watsman D. M. и соавт.	1980 1980 1980 1978	[50] [51] [52] [53]
Киназа легкой цепи миозина	Watsman D. M. и соавт. Adelstein R. Klee C. B.	1978 1981	[53] [24]
Фосфорилаза киназа (кальмодулин является субъединицей фермента)	Cohen P. и соавт. Burger E. и соавт.	1978 1983	[54] [55]
NAD-киназа	Anderson J. Cormier M. J.	1978	[64]
Гликогенсинтетаза киназа	Payne M. E. Soderling T.	1980	[65]
Фосфолипаза A_2	Wang J. H Watsman D. M.	1979	[66]
Триптофан-5-монооксигеназа	Yamauchi T. Fujisawa H.	1979	[67]
Тирозин-гидроксилаза	Elmestikawa и соавт.	1983	[68]
Нейрональная протеинкиназа	Kennedy M. B.	1985	[69]
Фосфофруктокиназа	Mayer G.	1984	[70]
Альдолаза	Orosz F. Chistova T. Y. Ovadi J.	1978	[71]
Аденилатциклаза мозжечка	Malnoe A. и соавт.	1982	[72]
5′-нуклеотидаза мозга	Galoyan A. A. Sharova N. P. Gurvitz B. Ja.	1989	[56]
Киназа тяжелой цепи миозина	Rieker J. P. и соавт.	1987	[57]
1. 4. 5-инозитол-фостат-3-киназа	Kimura Y. и соавт.	1987	[58]
cAMP-зависимая протеинкиназа (кальмодулин ингибирует)	Cox D. M. Edstrom R. D.	1982	[59]
Ca^{2+}, Mg^{2+}-АТРаза (микросомная)	Hageboom G. K. Feden J.	1981	[60]
Ca^{2+}, Mg^{2+}-АТРаза (в эритроцитах)	Jarrett H. W. Pannilston J. Cox D. M.	1977	[61]
Ca^{2+}, Mg^{2+}-АТРаза	Vincenzi F. F. и соавт. Coroni P. Carafoli E. Klee C. B. и соавт. Steward A. и соавт.	1980 1981	[62] [63]
Протеинфосфатаза (кальцийнейрин)	Sharma R. K.	1979	[73]
Полиаминзависимая протеинкиназа	Wang J. H.	1982	[74]
Ангиотензинпревращающий фермент	Atmaz V. J. Kuehn C. D.	1985	[75]
Тубулинкиназа	Dasarathy Y. Fanburg B. L.	1983	[76]
Фосфолипаза тромбоцитов человека	Burke B. E. DeLorenzo R. J. Weng P. Y. K. Cheung W. Y.	1988 1981	[77] [78]
Множественные формы Ca^{2+}-кальмодулинзависимой протеинкиназы мозга	Kennedy M. B.	1979	[79]
Мультифункциональная протеинкиназа	Pfe C. и соавт.	1985 1984	[69] [80]

белки имеют генетически детерминированный участок «EF-Hand» [13] (табл. 3). Наиболее древней (ancestral) молекулой является КМ, основной рецепторный белок ионов кальция, биологическое значение которого хорошо установлено. Исследование первичной структуры КМ [15] показало, что КМ содержит 4 Ca^{2+}-связывающих домена: домен I (9—42), домен II (45—78), домен III (82—105) и домен IV (118—149). Для активирования фермента-мишени необходимо, чтобы связалось с КМ 3—4 атома кальция [16]. КМ—кислый

Таблица 2

Роль Ca^{2+}-кальмодулиновой системы в различных процессах

Процессы	Литература		
Деполяризация микротубул	Marcum J. M. и соавт.	1978	[81]
	Sobue K. и соавт.	1981	[82]
Взаимодействие со спектрином и белком	Glennev J. Weber K.	1980	[83]
Транслокация внутриклеточных органелл	Means A. R. и соавт.	1982	[84]
Механизм действия антидиуретического гормона на водный транспорт	Beauwens R. Rentmeesters M.	1981	[85]
Поглощение кислорода печенью	Kimura V. и соавт.	1987	[58]
1, 3, 5 P_3-стимулируемая мобилизация Ca^{2+} ингибируется антагонистами кальмодулина	Hill T. D. и соавт.	1988	[86]
Стимуляция АТР-зависимого транспорта эритроцитов человека	Larsen F. L. Vincenzi F. F.	1979	[87]
Синтез и секреция нейротрансмиттеров	DeLorenzo R. J. и соавт.	1979	[88]
	Fujisawa H.	1984	[89]
Фосфорилирование белков мембран	Schulman H. Greengard P.	1979	[90]
Стимуляция АТР-зависимого транспорта в саркоплазматическом ретикулуме	Katz S. Remtulla M. A.	1978	[91]
Транспорт кальция Ca^{2+}-КМ-зависимое действие кальцитонина на метаболизм липидов у крыс	Olwin B. B.	1985	[92]
	Nishizawa Y. и соавт.	1988	[93]

Таблица 3

EF-участки кальцийсвязывающих белков
(Gerday, 1988, [13])

Белок	Mr	EF-домены	Связывание Ca^{2+}	Основной источник
Парвальбумин	12,000	3	2	мышца
Тропонин С	18,000	4	4	мышца
Кальмодулин	17,000	4	4	везде (ubiquitous)
Р-легкие цепи (миозин)	20,000	4	1	мышца
Щелочные легкие цепи (миозин)	20,000	4	0	мышца
Калбиндин (Витамин Д)	10,000	3	2	кишечник млекопитающих
Калбиндин (Bum.Д)	28,000	4—6	2	кишечник птиц
S-100	2×10,500	2	2	мозг
Онкомодулин	12,000	2	2	опухоль
В-субъединица кальцинейрина	19,000	4	4	мозг
CBP-18	18,000		1	мозг
CBP	20,000	4	1—3	беспозвоночные

Примечание. CBP-18—кальцийсвязывающий белок-18, SCBP—растворимый кальцийсвязывающий белок. Обнаружен ряд новых кальций связывающих белков (Calretimin, CFAg, Calcyclin 12 AgIPRA), pE98-белок, MRP-8 и MRP-14, p11, 42C и 42 A белки, белок p9Ka, белок 18A2, Aequorin, белки, связывающие галактозу uvomorulin, немышечный α-актинин [94].

белок с величиной M 16,7 кД, принадлежащий к группе гомологичных белков, связывающих кальций через аналогичные структурные домены. КМ является уникальным членом этого класса белков, так как присутствует во всех эукариотических клетках, осуществляя различные физиологические процессы Ca^{2+}-зависимым способом; КМ содержит одну полипептидную цепь со 148 аминокислотными остатками, включая необычную аминокислоту—триметиллизин [17]. КМ в течение эволюции не подвергался изменению в аминокислотном составе. Связывание Ca^{2+} вызывает заметные конформационные изменения в КМ, которые делают возможным его участие во взаимодействии с ферментами и регуляции их активности. Точная природа фермент-кальмодулинового взаимоотношения не совсем ясна, но выдвинута гипотеза о том, что связывание Ca^{2+} с КМ открывает гидрофобные щели, что может быть важным как для связывания с антагонистами КМ, так и ферментами-мишенями. На каждой молекуле КМ имеется большая гидрофобная щель в каждой половине молекулы. Каждая щель величиной в 10 Å имеет глубину около 9—5 Å. В каждой половине молекулы имеется 5 ароматических остатков: четыре из них находятся на N-концевой половине (Phe 16, Phe 19, Phe 65, Phe 68). Среди 8 лизиновых остатков в КМ млекопитающих наиболее важным для связывания Ca^{2+} является Lis 115, который триметилирован в позиции ε-амино группы. Триметилирование лизина в положении 115 обнаружено в КМ из различных источников, функциональное значение этой посттрансляционной модификации неизвестно.

Антагонисты кальмодулина

Ряд фармакологических агентов ингибирует Ca^{2+}-зависимое активирование ферментов КМ. К первому классу веществ, обладающих этими свойствами, относятся фенотиазины [18]. Эти антагонисты, связываясь с КМ, предотвращают его взаимодействие с белками. Имеется и ряд других фармакологических соединений, которые взаимодействуют с кальмодулином в присутствии Ca^{2+} и предотвращают его стимуляторные эффекты.

Исследования показывают, что эти различные соединения имеют структурное сходство. Традиционными системами для измерения антикальмодулиновых свойств фармакологических агентов являются системы КМ—киназа легкой цепи миозина (КЛЦМ) и КМ-ФДЭ.

В гладкой мышце КМ является ответственным для активации КЛЦМ [21]. Антагонист КМ—трифторпиразин связывается с КМ и разрушает комплекс КМ—КЛЦМ [22].

Кальмодулинсвязывающие белки

К таким белкам относятся калдесмон [23], КЛЦМ [24], белок с M_r 110 кД [24], спектрин и фодрин [25], кальмодулинейрин [26] и др. Калдесмон—щелочной белок с M_r 120 кД [27] связывается с тропонином, тропомиозином и с филаментами актина в гладкой мышце, а также со многими немышечными клетками (тромбоциты). При связывании с актином калдесмон ингибирует вызванное последним активирование АТРазы. КЛЦМ активируется Ca^{2+}-кальмодулиновым комплексом. Цикл сокращения-релаксации гладкой мышцы зависит

от образования и распада Ca^{2+}-КМ-ферментного комплекса. Этот процесс контролируется ионами кальция. Стимулирование (нервное и гормональное) клеток гладких мышц приводит к повышению концентрации Ca^{2+}_i в цитозоле, где он связывается с КМ, образуя Ca^{2+}_i-кальмодулиновый комплекс. Это связывание Ca^{2+} с КМ вызывает конформационные изменения в его молекуле [28], после которых КМ может связываться с ферментом.

Блокаторы вхождения кальция в клетки

Концепция об антагонистах кальция развивалась одновременно и независимо при изучении сердечной ткани [29] и гладкой мышцы [30]. Концепция о блокаторах вхождения кальция внутрь клетки открыла новую область в терапии сердечно-сосудистых заболеваний, и блокаторы вхождения кальция находят все большее применение для лечения грудной жабы, гипертонии и т. д. Имеются два пути активирования кальциевых каналов в тканях гладких мышц [31], которые позволяют разделить их на потенциалуправляемые и рецепторуправляемые каналы.

Потенциалуправляемые каналы открываются в ответ на изменение потенциала действия или деполяризацию. Учитывая то, что некоторые агонисты могут способствовать вхождению кальция без деполяризации, можно было полагать, что они могут действовать через соответствующие рецепторы, открывая кальциевые каналы (рецепторуправляемые каналы).

Блокаторы вхождения кальция могут быть классифицированы как вещества, ингибирующие вхождение кальция через кальциевые каналы плазмалеммы [32]. Все они могут быть разделены на две группы: избирательные и неизбирательные блокаторы вхождения кальция. Избирательные блокаторы вхождения кальция первично действуют на кальциевые каналы, открытые деполяризацией или под влиянием стимулов, в то время как неизбирательные блокаторы одинаково эффективны в отношении Ca^{2+}- и Na^{+}-каналов.

Среди избирательных блокаторов кальциевых каналов можно выделить две подгруппы. Подгруппа IA включает три химических класса—верапамил, нифедипин и дилтиазем. Эти вещества блокируют медленные кальциевые токи в миокардиальных препаратах без оказания влияния на быстрые натриевые каналы [33]. Подгруппа IB включает в основном цинаризин и флунаризин как избирательные блокаторы вхождения кальция в препаратах артерии [34]. Описаны также некоторые подтипы потенциалуправляемых каналов в различных клеточных типах [35, 36].

Таким образом, приведенные литературные данные свидетельствуют об огромном общебиологическом значении Ca^{2+}, его основного рецепторного блока—КМ, других Ca^{2+}-связывающих белков. Антагонисты КМ, а также блокаторы вхождения ионов кальция внутрь клетки находят широкое применение в медицинской практике. Необходимо, однако, напомнить, что система Ca^{2+}-КМ функционирует тогда, когда концентрация ионов кальция в цитоплазме повышается до 10^{-5} М. К тому же содержание КМ в цитоплазме в 100 раз превышает концентрацию кальция. Почему же в мозгу и сердце в нормальных условиях проявляется высокая активность как ФДЭ циклических нуклеотидов, так и КЗПКМ? По-видимому, в мозгу (вероят-

но, и в других органах) существуют вещества (возможно, пептиды), оказывающие регулирующее влияние на активность Ca^{2+}-КМ-активируемых ферментов, когда эта система не в состоянии функционировать [37]. Имеется реципрокное взаимоотношение между Ca^{2+}-КМ-зависимыми и независимыми регуляторами активности ферментов. Это взаимоотношение регулируется концентрацией ионов кальция.

Открытие новых полипептидов гипоталамуса—КМ-связывающих, Ca^{2+}-независимых регуляторов ферментативной активности

Из гипоталамуса крупного рогатого скота нам удалось с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-75, ИОХ на Dawex 50×8, а также ВЭЖХ выделить 5 коронаросуживающих полипептидов ($ПФ_1$—$ПФ_5$) с величиной **М** 3, 3,5, 3,5 и 7 кД [38]. Они содержат в большом количестве Ser, Gly, Glu. N-концевыми аминокислотами являются Val, Val, Val, Ala, Pro. После кислотного и ферментативного (трипсин, химотрипсин) гидролиза указанные пептиды полностью теряют биологическую активность. Они вызывают мощное активирование ФДЭ циклических нуклеотидов и 5′-нуклеотидазы мозга, а также КЛЦМ без участия ионов кальция. Нами ранее было показано наличие нейропептидов, активирующих эти ферменты без Ca^{2+}-КМ [39]. Каков механизм действия этих пептидов на активность ферментов и на коронарные сосуды? Исследования, проведенные нами (Бархударян Н. А., Галоян А. А.) совместно с д-ром Ю. Овади (Институт биохимии АН ВНР, Будапешт), были посвящены действию 5-и гипоталамических пептидов на КМ-белок взаимоотношение путем фермент-связанного иммуносорбентного анализа (Enzyme—Zinked Immunosorbent Assay, ELISA) с целью выяснения возможности связывания пептидных фракций с КМ. Этот метод позволяет использовать очень незначительные количества пептидов. Обнаружено, что все 5 полипептидов гипоталамуса ($ПФ_1$—$ПФ_5$) ингибируют образование иммунокомплекса КМ-антитело на 90% и более, причем эффект $ПФ_1$ и $ПФ_2$ был значительно выше ингибирующего воздействия $ПФ_3$, $ПФ_4$ и $ПФ_5$, а ингибирующая концентрация $ПФ_1$—$ПФ_5$ в 600 раз меньше по сравнению с известными антагонистами КМ (трифторпиразин, винбластин и др.). Следует заметить, что трифторпиразин (ТФП) в концентрации 3,9 μM активирует образование иммунокомплекса более чем на 100% (данные Ю. Овади). По-видимому, на КМ имеются участки низкого и высокого сродства ТФП. Участок с высоким сродством связывания с ТФП локализуется на С-конце домена КМ, расположенного поблизости от антигенного участка. Вероятно, связывание $ПФ_1$—$ПФ_5$ с КМ происходит таким же образом (необходимы дополнительные сведения).

С целью исключения связывания $ПФ_1$—$ПФ_5$ с антителами КМ вместо КМ на специальных пластинках фиксировали антитела. Обнаружено, что пептиды не связываются с антителами. Таким образом, пептиды связываются именно с КМ ближе к его антигенному участку (вероятно, с аминокислотными остатками—137—143).

Установлено, что ионы кальция не имеют существенного значения в снижении образования иммунокомплекса КМ-антитело при наличии пептидов ($ПФ_1$—$ПФ_5$). Таким образом, действие $ПФ_1$—$ПФ_5$ на образование иммунокомплекса является Ca^{2+}-независимым процессом [40]. Наши эксперименты показали, что $ПФ_1$—$ПФ_5$ активи-

руют КЛЦМ, когда в среде имеется КМ. Сам КМ не оказывает никакого действия на активность фермента. В комбинации с Ca^{2+} КМ активирует фермент на 50%. При сочетании КМ+ЭДТА+пептид ($ПФ_1$—$ПФ_5$)+КЛЦМ пептиды активируют фермент на 80—100%.

Таким образом, обнаружен новый тип активаторов КЛЦМ (вероятно, и других Ca^{2+}-КМ-зависимых ферментов), связывающихся с КМ без участия Ca^{2+}. Комплексы КМ—нейропептиды ($ПФ_1$—$ПФ_5$) являются мощными активаторами КЛЦМ.

Ca^{2+}-КМ-независимые активаторы ФДЭ циклических нуклеотидов

Три термостабильных активатора, стимулирующие высокоочищенную Ca^{2+}-КМ-зависимую ФДЭ мозга были обнаружены в препаратах частично очищенного нейрогормона «С» (нС). Эти активаторы увеличивают активность ФДЭ в 6—10 раз в отсутствие ионов кальция [4]. Активаторы были очищены до гомогенного состояния с помощью ВЭЖХ и гель-фильтрации. Величина М. этих соединений составляла 5—14 кД. Обработка очищенных активаторов с трипсином (1 мг/мл, 10 мин при 30°) снимала их активирующее влияние на ФДЭ циклических нуклеотидов. Эти данные свидетельствуют о полипептидной природе активаторов. N-концы С-модулинов ацетилированы.

Активаторы были названы нами С-модулинами, так как они сопровождают нС на многих стадиях очистки и, вероятно, играют роль модулятора нС. Они повышают активность Ca^{2+}-КМ-зависимой ФДЭ в присутствии 0,5 мМ ЭДТА и не оказывают модулирующего действия в присутствии 0,5 мМ $CaCl_2$.

Таким образом, обнаружена новая группа нейропептидов-активаторов Ca^{2+}-КМ-зависимых ферментов, действующих без участия Ca^{2+} и КМ. Как Ca^{2+} независимые, так и Ca^{2+}-КМ-независимые активаторы, на наш взгляд, являются первичными активаторами Ca^{2+}-КМ-активируемых ферментов, так как они активируют эти ферменты в концентрациях ниже 10^{-7} М, в то время как Ca^{2+}-кальмодулиновая система действует, когда в цитоплазме концентрация Ca^{2+} достигает концентрации 10^{-5} М. Установлено идентичность одного из С-модулинов и $T\frac{3}{4}$ [95].

Новый тип регуляции транслокации Са в гладкой мышце в норме и при патологии

Ранее нами была описана новая «семья» коронарорасширяющих нейрогормонов гипоталамуса. Эти гликопептиды были названы веществами «К», «С» и «Г». За последние годы были получены множественные формы этих соединений гипоталамуса [41]; нС и его структурные аналоги являются уникальными регуляторами уровня вторичных посредников клетки—циклических нуклеотидов и ионов кальция. После открытия этой группы регуляторов сердечной активности (коронарорасширяющие и коронаросуживающие соединения гипоталамуса) было установлено, что нС является сложным соединением, не теряющим свою биологическую активность после кислотного и щелочного гидролиза [42]. Это вещество не имеет характерного спектра в УФ-области.

Это значит, что в составе нС и его структурных аналогов существует жесткая структура, комплекс циклических соединений неизвестной природы.

Нами проведены масс-спектральные и ЯМР-спектральные анализы для определения структурных особенностей этого нейрогормона. Механизм действия нС на транслокацию ионов кальция отличается от известных синаптических и эндогенных кальциймобилизующих соединений. Важно отметить, что нС и его структурные аналоги выявляют Ca^{2+}-мобилизующие свойства на уровне саркоплазматического ретикулума гладкой мышцы. Эти вещества входят в цитоплазму через липидный бислой сарколеммы, подобно стероидным гормонам. Об этом свидетельствует тот факт, что нС не оказывает влияния на активность аденилат- и гуанилатциклазы сердца и мозга в опытах *in vitro*. Однако в этих условиях классический активатор аденилат- и гуанилатциклаз полностью сохранял свое активирующее влияние на эти ферменты. Нами было установлено, что нС является мощным ингибитором ФДЭ cAMP и cGMP [43], а также эффективным внутриклеточным Ca^{2+}-модулирующим транслокатором в норме и особенно при некрозе миокарда, когда содержание Ca^{2+} в саркоплазме значительно увеличено. Мы изучали распределение [^{45}Ca] в субклеточных частицах и изменение сродства Ca^{2+} к различным белкам саркоплазматического ретикулума митохондрий сердца и мозга под влиянием нС в норме и при изопротереноловом некрозе миокарда [44]. Предполагалось, что изменение сродства специфических белков к ионам кальция может быть объяснено фосфорилированием и дефосфорилированием ряда белков под влиянием соответствующих cAMP-зависимых протеинкиназ и фосфопротеинфосфатаз. Результаты экспериментов показали, что через 30 мин после введения нС, когда проявляется максимальное коронарорасширяющее влияние нС на кошках в опытах *in situ*, содержание Ca^{2+} в крови увеличивается от 10 до 42,5% по сравнению с контролем. Ясно, что нС регулирует концентрацию Ca^{2+} в клетках гладких мышц. Об этом свидетельствуют результаты исследования влияния нС на КЛЦМ, выделенную из гладких мышц (неопубликованные данные). Ca^{2+}-мобилизующие свойства нС проявляются как в первных клетках [45], так и на поперечнополосатой мускулатуре [46].

Таким образом, Ca^{2+}-мобилизующие и рилизинг-свойства нС не отличаются от других систем транслокации Ca^{2+}. Более того, нС и его структурные аналоги оказывают прямое ингибирующее действие на активность cAMP и cGMP ФДЭ также, как на cAMP-зависимую протеинкиназу мозга и сердца [47]. Конкурируя с cAMP и cGMP за регуляторную субъединицу ферментов, нС ингибирует базальную активность этих ферментов и непосредственно (без участия Ca^{2+} и КМ) ингибирует КЛЦМ гладкой мышцы. Он является уникальным регулятором концентрации Ca^{2+} в клетках, изменяя сродства Ca^{2+}-связывающих белков к ионам кальция в саркоплазматическом ретикулуме, митохондриях и удаляя Ca^{2+} из цитоплазмы во внутриклеточное пространство через сарколемму путем активирования Na^+, Ca^{2+} обмена и Ca^{2+}-насоса посредством Ca^{2+}, Mg^{2+}-АТРазы.

Механизм действия нС изображен на схеме. Недавно получены результаты (данные не опубликованы) о влиянии нС на активность фосфолипазы «С».

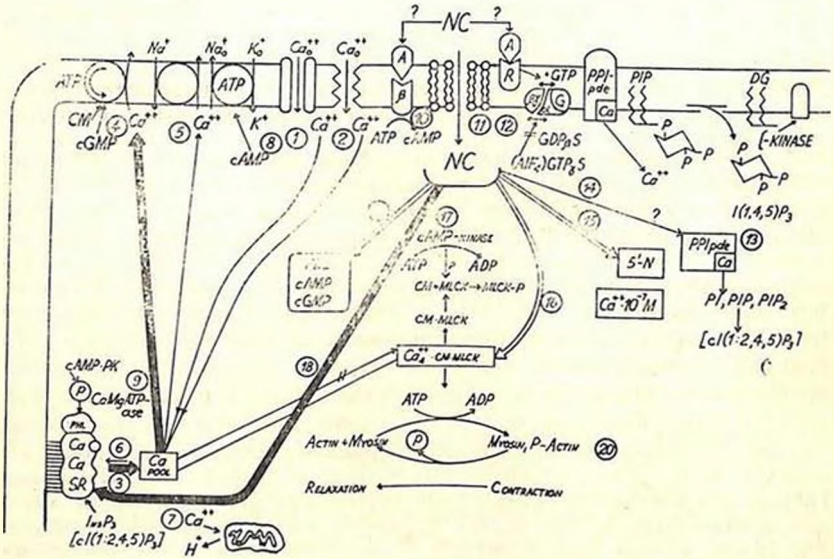

Схема. Молекулярные механизмы транслокации ионов кальция и релаксации гладкой мышцы под влиянием нейрогормона «С».

1, 2—вольтаж и рецепторуправляемые мембранные каналы, *3*—выделение Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума (СР), *4*—удаление Ca^{2+} из сарколеммы, *5*—удаление Ca^{2+} путем Na, Ca—обмена, *6*—удаление ионов кальция из миоплазмы реализуется кальциевым насосом саркоплазматического ретикулума (через Ca, Mg-АТРазу), *7*—выделение Ca^{2+} митохондриями (не существенно при физиологических условиях), *8*—cAMP-стимулирование Na, K-АТРазы облегчает обмен внеклеточного натрия на кальций, *9*—фосфорилирование фосфоламбана cAMP-зависимой протеинкиназой увеличивает АТРазную активность саркоплазматического ретикулума, *10*—аденилатциклазная система, *11*—липидный бислой сарколеммы, *12*—кальциймобилизующие рецепторы и модель активации клеток по Cockcroft (1988), *13*—цитозольная полифосфоинозитид фосфодиэстераза (Ca-активируемая фосфолипаза С) (PI, PIP, PIP_2-субстраты), *14*—влияние нейрогормона «С» на цитозольную фосфолипазу «С», *15*—ингибирование активности 5'-нуклеотидазы нейрогормоном «С», *16*—ингибирование активности киназы легкой цепи миозина (КЛЦМ) нейрогормоном «С», *17*—ингибирование КЛЦМ фосфорилированием КЛЦМ-cAMP-зависимой протеинкиназой, *18*—влияние нейрогормона «С» на выделение Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума, *19*—ингибирование активности cAMP и cGMP фосфодиэстеразы под влиянием нейрогормона «С», *20*—цикл сокращения и расслабления гладкой мышцы. Фосфорилирование миозина зависит от активности КЛЦМ и фосфатазы. При активации фосфатазы комплекс кальмодулин—КЛЦМ разрушается. Схема гомеостаза Ca^{2+} и механизмы сокращения—релаксации гладкой мышцы даны по Rüegg [1988]

Таким образом, нС и его аналоги являются новым типом регуляторов ферментативной активности, действующих путем удаления ионы и саркоплазматического ретикулума.

мы и саркоплазматического ретикулума.

Ca^{2+}-CALMODULIN AND COUPLED SYSTEMS OF THE REGULATION

GALOYAN A. A.
Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Armenia, Yerevan.

This review summarizes data on the role of Ca^{2+}-calmodulin system in the control of activity of several enzymes and various physiological processes. We also describe genetically determined regions responsible for the binding of calcium ions with various proteins, whose fuctional role is not yet completely clear. Data of our laboratory demonstrate presence in the brain of a peptide system responsible for the control of activity of certain Ca^{2+}-calmodulin-dependent enzymes (C-modulins) in the absence of calcium ions and calmodulin. These peptides are present in concentrations of 10^{-9}—10^{-12}M and probably represent an additional control system for thecontrol of calmolulin-dependent enzymes. The another peptides bind to calmodulin like calcium ions and activate such enzymes as PDE of cAMP, 5'-nucleotidase and myosin L-chain kinase. These hypothalamic neuropeptides probably are similar to those present in various other tissues and serve as primary regulators of the enzyme activity, when calcium concentration in the cell is 10^{-8}—10^{-7} M. Another important factor involved in the activity control of Ca^{2+}-calmodulin-dependent enzymes is neurohormone C and other similar compounds which competitively inhibit PDE of cAMP and cGMP and are involved in Ca^{2+} translocation. The mechanism presented in the review extends our views about new systems for the control of Ca^{2+}-calmodulin-dependent enzymes in physiological processes.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Szent-Györgi A. G., Szentkiraly E. M.* J. Mol Biol., v. 74. p. 179—203, 1973.
2. *Kendrick-Jonec J., Scholey J.* J. Muskle Res Cell. Mot, v. 2, p. 347—372, 1981.
3. *Dabrowska R., Aromatorio D., Sherry J. M. F., Hartshorne D. J.* BBRC v. 78, p. 1263—1272, 1977.
4. *Galoyan A. A., Sharova N. P., Gurvitz B. Ju.* Neurochem Res., v. 14, № 12, 1213—1221, 1989.
5. *Haiah J., Watterson D. M.* —In: Calcium and Calcium Binding Proteins (eds. Ch. Gerday, L. Bolis, R. Gilles), p. 191—200, Springer Verlag, Berlin, New York, 1988.
6. *Herzberg O., James M. N. C.* Nature (London), v. 313, p. 653—659 1985.
7. *Hamoir G.* Acta Zool. Patrol. (Antwerpen), v. 46, p. 284—301, 1968.
8. *Heizman C. W.* Experientia, v. 40, p. 910—931. 1984.
9. *McLennan D. H., Wang PT. S.* Proc. Nat. Acad. Sci., v. 68, p. 1231—1235, 1971.
10. *Manalan A. S., Klee C. B. J.* Biol. Chem., v. 259, p. 2047—2050, 1984.
11. *Aitken A., Klee C. B., Cohen P.* Eur. J. Biochem., v. 139. p. 663—671, 1984.
12. *Lehman W., Szent-Gyorgi A. G.* J. Gen. Physiol., v. 66. p. 1—30, 1975.
13. *Gerday Ch.* —In: Calcium and Calcium. Binding Proteins (eds. Ch. Gerday, L. Bolis, R. Gelles), Springer Verlag, Berlin, p. 23—37, 1989.
14. *McManus J. P., Brower L. M.* Methods Enzymol., v. 139, p. 156—168, 1987.
15. *Watterson D. M., Sharief F., Vanaman T. C.* J. Biol. Chem., v. 255, 962—975, 1980.

16. *Babu Y. S., Sack J. S., Greenhough T. J., Bugg C. E., Means A. R., Cook W. J.* Nature (London), v. 315, 37—40, 1985.
17. *Babu Y. Y., Sack J. S., Greenhough T. J., Bugg C. E., Means A. R., Cook* W. J. Nature (London), v. 316, p. 37—40, 1985.
18. *Levin A. M., Weiss B.* Mol. Pharmacol., v. 12, p. 581—587, 1976.
19. *Reufogalis M. D., Minocherhomjal A. M., Al-Jobore A.* Can. J. Biochem. Cell. Biol., v. 61, p. 927—933, 1983.
20. *Van Belle H.* —In: Advances in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Research (eds. P. Greengard, G. Robison, R. Paoletti, S. Nicosia), v. 17, p. 557—567, 1984.
21. *Hartshorne D. J., Siemankowski R.* Ann. Rev. Physiol., v. 43, p. 519—530, 1981.
22. *Hidaka H., Yamaki T., Totsuka T., Asano M.* Mol. Pharmacol., v. 15, p. 49—59, 1979.
23. *Mooseker M. S.* Ann. Rev. Cell. Biol., v. 1, p. 209—241, 1985.
24. *Adelstein R. S., Klee C. B.* J. Biol. Chem., v. 256, p. 7501—7509, 1981.
25. *Glenney J. R., Glenney P.* Cell Motil., v. 3, p. 671—682, 1983.
26. *Sharma R. K., Desai R., Waisman D. M., Wang J. H.* J. Biol. Chem., v. 254, 4276—4282, 1979.
27. *Marston S. B., Lehman M.* Biochem. J., v. 231, p. 517—522, 1985.
28. *Kuo W. N., Kuo J. F.* J. Biol. Chem., v. 251, p. 4283—4286, 1976.
29. *Fleckenstein A., Kammermeier H., Döring H. J., Freund H. J. Z.* Kreislaufforsh, v. 56, p. 839—853, 1967.
30. *Godfraind T., Polster P.* Circ. Res., suppl. 1, p. 81—91, 1968.
31. *Bolton T. B.* Physiol. Rev., v. 59, p. 606—718, 1979.
32. *Godfraind T.* Acta Pharmacol. Toxicol., supp. 11, p. 5—30, 1986.
33. *Fleckenstein A.* Calcium Antagonism in Heart and Smooth Muscle. Wiley, N. Y., 1983.
34. *Godfraind T., Dien D.* J. Pharmacol. Exp. Ther., v. 217, p. 510—515, 1981.
35. *Nilius B., Hess P., Zansman J. B., Tsien R. W.* Nature (London), v. 316, p. 443—446, 1985.
36. *Nowycky M. C., Fox A. P., Tsien R. W.* Nature (London), v. 316, p. 440—448, 1985.
37. *Галоян А. А., Гурвиц Б. Я.* Нейрохимия, т. 5, № 4, с. 420—422, 1986.
38. *Галоян А. А., Бархударян Н. А., Валко К., Закарян Т.* Нейрохимия, т. 7, № 4, с. 519—524, 1988.
39. *Галоян А. А., Бобрускин И. Д., Гурвиц Б. Я., Абрамян Г. Э.* Нейрохимия, т. 8, № 1, с. 78—86, 1989.
40. *Галоян А. А.* Тезисы докладов III Республиканской конф. «Достижения физико-химической биологии и биотехнологии и пути их внедрения», с. 1, Ереван, 1989.
41. *Галоян А. А., Срапионян Р. М., Карапетян Р. О., Абеляк Ж. Г., Саакян Ф. М., Саакян С. А., Абрамян С. С., Григорян Л. А., Одабашян А. Б., Бочко И.Ф.* Нейрохимия, т. 5, № 4, с. 354—364, 1986.
42. *Галоян А. А.* Некоторые проблемы биохимии гипоталамической регуляции, Ереван, Айастан, 1965.
43. *Галоян А. А., Гурвиц Б. Я., Погосян М. А.* Вопросы биохимии мозга, т. 11, с. 89—96, 1976.
44. *Galoyan A. A., Kevorkian G. A. Voskanian L. H., Alexanian S. S., Muradian M. Sh.* Neurochem. Res., v. 13, № 5, p. 493—498, 1988.
45. *Акопян А. Р., Срапионян Р. М., Карапетян Р. О., Галоян А. А.* Нейрохимия, т. 6, № 2, с. 227—230, 1987.
46. *Галоян А. А., Алексанян С. С., Иванов И. И.* Докл. АН АрмССР, т. 65, № 4, с. 238—241, 1977.
47. *Galoyan A. A., Gurvitz B. Ja., Sarkisian G. A., Kirakosova A. S.* —In: Cyclic Nucleotides and Therapeutic Perspectives (eds. G. Cehovic, G. Robison), p. 165—181, N. Y., Pergamon Press, 1979.

48. *Cheung W. Y.* Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 29, p. 478—482, 1970.
49. *Kakiuchi S., Yamazaki R.* Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 41, № 5, p. 1104—1110, 1970.
50. *Cheung W. Y.* Science, v. 207, p. 19—27, 1980.
51. *Klee C. B., Crouch T. H., Richman P. L.* Ann. Rev. Biochem., v. 49, p. 489—515, 1980.
52. *Means A. R., Dedman J. R.* Nature (London), v. 285, p. 73—77, 1980.
53. *Watsman D. M., Singh T. J., Wang J. H.* J. Biol. Chem., v. 253, № 10, p. 3387—3390, 1978.
54. *Cohen P., Picton C., Klee C. B.* FEBS Lett., v. 104, p. 24—29, 1979.
55. *Burger D., Stein E. A., Cox J. A.* J. Biol. Chem., v. 258, p. 14733—14739, 1983.
56. *Galoyan A. A., Sharova N. P., Gurvitz B. Ja.* Intern. Symposium on Molecular organization of biological structure, Moscow, p. 139, 1989 Abstract.
57. *Riecker J. P.* et al. J. Biol. Chem., v. 262. № 31, p. 87, 1987.
58. *Kimura Y.* et al. Arch. Biochem. Biophys., v. 257, (2), № 87, p. 363, 1987.
59. *Cox D. E., Edström R. D.* J. Biol. Chem., v. 257, p. 12728—12733, 1982,
60. *Hogeboom G. K., Feden J. S.* Biochim. Biophys. Res. Commun., v. 99, № 2, 1981.
61. *Jarrett H. W., Pennisten J. T.* Biochim. Biophys. Res. Commun., v. 77, p 1210—1216, 1977.
62. *Vincenzi F. F.* et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 356, p. 232—244, 1980.
63. *Coronl P., Carafoli E.* J. Biol. Chem., v. 256, p. 3263—3270. 1981.
64. *Anderson L. M., Cormier M. J.* Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 84, № 3, p. 595—602, 1978.
65. *Pojne M. E., Soderling T. R.* J. Biol. Chem., v. 255, № 17, p. 8054—8056, 1980.
66. *Wang J. H., Watsman D. M.* Curr. Top. Cell. Regul., v. 15, p. 47—107, 1979.
67. *Yamauchi T., Fujisawa H.* Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 90, № 1, p. 28—35, 1979.
68. *ElMestikawa S., Glowinski J., Haman M.* Nature, v. 302, p. 830—832, 1983.
69. *Kennedy M. B. J.* Neurochem., v. 44, p. 30, 1985.
70. *Mayer G. W.* Eur. J. Biochem., v. 143, p. 513—520, 1984.
71. *Orosz F., Christova T. V., Ovadi J.* Mol. Pharmacol., v. 33, p. 678—681. 1988.
72. *Malnoe A., Cox J. A., Stein E. A.* Biochim. Biophys. Acta, v. 714, p 84—92, 1982.
73. *Klee C. B.* et al. Proc Natl. Acad. Sci. USA, v. 76. p. 6270—6273, 1979.
74. *Stewart A., Ingebristen T. S., Cohen P., Manalan A., Klee C. B.* FEBS Lett., v. 137, p. 8—84, 1982.
75. *Sharma R. K., Wang J. H.* PNAS USA, v. 82, p. 2603—2607, 1985.
76. *Atmaz V. J., Kuehn G. D.* Fed. Proc Fed. Am Soc. Exp. Biol., v. 42. p. 2249 1983.
77. *Da Sarathy Y., Fonburg B. L.* J. Cell. Physiol., v. 137, № 1, p. 179, 1988.
78. *Burke B. E., DeLorenzo R. J.* PNAS USA, v. 78, № 2, p. 991—996, 1981.
79. *Wong P. Y. K., Cheung W. Y.* Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 90. p. 473—480, 1979.
80. *Pifl C., Plank B., Wyskovsky W., Bertel O., Hellman G., Suko J.* Biochim. Biophys. Acta, v. 773, p. 197—206, 1984.
81. *Marcum J. M.* et al. PNAS USA, v. 75, № 8, p. 3771—3775, 1978.
82. *Sobue K., Muramoto Y., Fujida M., Kuchuchi S.* Proc. Nat. Acad Sci. USA. Biol. Sci. v. 78, p. 5652—56 5, 1981.
83. *Glenney J. R., Weber K. J.* Biol. Chem., v. 255, p. 10551—10554, 1980.
84. *Means A. R., Tash J. S., Chafoula S.* Physiol. Rev., v. 62, p. 1—39, 1982.
85. *Beauwens R., Rentmesters M.* Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 99, № 2, 491—495, 1981.
86. *Hill T. D.* et al. J. Biol. Chem., v. 263, p. 16479, 1988.
87. *Larsen F. L., Vincenzi F. F.* Science, v. 204, p. 306—309, 1979.
88. *De Larenzo R. J.* PNAS USA, v. 76, № 10, p. 5402—5406, 1979.

89. *Fujisawa H., Yamauchi Y. T., Nakata H., Okuno S.* Federat. Proc., 43. p. 3011—3014, 1984
90. *Shulman H., Greengard P.* PNAS USA. v. 76, № 10, p. 5402—5406. 1979.
91. *Katz S., Rettulla M. A.* Biochem. Biophys Res. Coomun., v. 83, p 1373—1379 1978.
92. *Olwin B. B., Storm D. R.* Biochemistry. v. 24. p. 8081—8086, 1085.
93 *Nishizawa Y.* et al. J. Clin. Invest., v. 82, № 4, p. 1165. 1938.
94. *Heizmann C. W., Braun K.* The role of calcium in biological systems. ed. L. J. Anghilert Copyright CRC Press, Inc., Boca Raton, FL. p. 21—65, 1990.
95. *Галоян А. А., Гурвич Б. Я., Ли Т., Шайдли Дж.* Нейрохимия. №4. 1990.

Поступила 25.I.1990