

УДК 577.152.313.16

КАЛЬЦИНЕЙРИН МОЗГА И ГРУППА РОДСТВЕННЫХ
ФОСФОПРОТЕИНФОСФАТАЗ ТИПА 2B

ПАРСАДЯН Г. К.

Институт биохимии им. Г. Х. Бунятыана АН Армении

В обзоре рассматриваются новейшие литературные данные о физико-химических свойствах, структуре и вне- и внутриклеточной регуляции Ca^{2+} -кальмодулинзависимых фосфопротеинфосфатаз. Особое внимание уделяется выделенной из нервной ткани форме фермента—кальцинейрину. Показана необходимость дальнейших исследований, посвященных нейроспецифическим субстратам кальцинейрина и изучению роли этого фермента в регуляции деятельности мозга.

В настоящее время обратимое фосфорилирование белков оценивается как основной путь управления внутриклеточными процессами в клетках эукариотов. Столь разнообразные процессы, как метаболизм, сокращение мышц, мембранный транспорт, секреция, транскрипция и трансляция генов, деление клеток, оплодотворение и даже память регулируются этим универсальным механизмом посттрансляционной модификации [1]. Фосфорилирование или дефосфорилирование сериновых, треонинных и тирозинных остатков приводит к конформационным изменениям в регуляторных белках, модифицирующим их биологические свойства. Степень их фосфорилированности определяется соотношением соответствующих протеинкиназ (ПКаз) и фосфатаз. ПКазы управляют разными способами, но важнейшими регуляторами являются вторичные мессенджеры, аллостерические эффекторы и фосфорилирование [2]. Возникает два вопроса: сколько фосфатаз имеется в клетке и находятся ли они также под контролем вторичных мессенджеров.

Классификация фосфопротеинфосфатаз. Согласно существующим данным, субъединицы (СЕ) четырех фосфопротеинфосфатаз (ФПаз), присутствующих в цитозоле, отвечают за дефосфорилирование сериновых и треонинных остатков множества регуляторных белков [3—6]. Имеются и другие ФПазы, однако они либо локализованы в иных субклеточных образованиях, либо дефосфорилируют предпочтительно тирозинные, а не сериновые и треонинные остатки [7, 8]. Указанные четыре цитоплазматические ФПазы, специфичные к сериновым и треонинным остаткам, были вначале подразделены на два класса—1 и 2, в зависимости от их способности дефосфорилировать β -или α -СЕ

киназы фосфорилазы и чувствительности к двум термостабильным белковым ингибиторам 1 и 2 (1-1 и 1-2). Относящиеся к классу 2 три ФПазы (2А, 2В и 2С) отличаются друг от друга по строению субстратной специфичности и путям регуляции (табл. 1). ФПазы 1, 2А и 2С отличаются

Таблица 1

Характеристика отдельных фосфопротеинфосфатаз (ФПаз) [1]

Метод	ФПаза 1	ФПаза 2А	ФПаза 2В	ФПаза 2С
Предпочтительное действие на α - или β -субъединицы киназы фосфорилазы	β -СЕ да	α -СЕ нет	α -СЕ нет	α -СЕ нет
Ингибирование 1-1 и 1-2	да	нет	нет	нет
Абсолютная потребность в 2-валентных катионах	нет	нет	да (Ca^{2+})	да (Mg^{2+})
Стимулирование кальмодулином	нет	нет	да	нет
Ингибирование трифторсератином	нет	нет	да	нет
Ингибирование оксалаевой кислотой	да	да	да (слабо)	очень низкая
Фосфорилаза фосфатазная активность	высокая	высокая	очень низкая	
Активность к гистону H1, фосфорилированному ПКазой С	очень низкая	очень высокая		
Активность к казеину, фосфорилированному ПКазой А	очень низкая	высокая		
Эффект крайних оснований	ингибирование	активирование		
Действие гепарина на активность к фосфорилазе	ингибирование	нет эффекта или активирование		
Действие <i>p</i> -нитрофенола на активность к фосфорилазе	активирование	ингибирование		
Связывание с гепарин-сефарозой в 0,1М NaCl	удерживание	не связывается		

широкой и перекрывающей субстратной специфичностью, отвечая практически за всю ФПазную активность в экстрактах мышц и печени относительно множества ферментов, регулирующих основные пути биодegradации и биосинтеза в этих тканях [9]. Однако и в других тканях, например в мозгу, эти ферменты присутствуют в высоких концентрациях, хотя соответствующие субстраты там отсутствуют. Полагают, поэтому, что функция указанных ФПаз может быть шире. Возможно, что они участвуют в регуляции уровня фосфорилированности белков, контролирующих синтез и высвобождение нейротрансмиттеров [3].

Установлено, что активность ФПазы 1 контролируется вторичными мессенджерами. Выше уже было указано, что она сильно ингибируется белком 1-1. Однако 1-1 должен при этом быть фосфорилирован сАМР-зависимой ПКазой [10]. Таким образом, ФПаза 1 ингибируется гормонами, вызывающими повышение уровня сАМР, например адреналином [1]. Допаминовые нейроны класса D_1 содержат большие количества изоформы 1-1, называемой DARPP (ФП, регулируемый допамином и сАМР) [12]. Фосфорилирование DARPP происходит под

действием нейротрансмиттера допамина, по-видимому, путем ингибирования ФПазы 1 в этих нейронах.

В отличие от ФПаз 1, 2А и 2С, ФПаза 2В имеет относительно более узкую субстратную специфичность и проявляет весьма слабую активность по отношению к регуляторным ферментам, контролирующим магистральные метаболические пути в мышцах и печени [5]. Фермент этот зависит от Ca^{2+} и стимулируется кальмодулином (КМ) [13]. Однако задолго до этого в скелетных мышцах была обнаружена активность фермента, дефосфорилирующего α -СЕ киназы фосфорилазы [14]. На этом этапе регуляция Ca^{2+} и КМ не была выявлена по следующим трем причинам. Во-первых, в 70-е годы считалось, что при выделении и определении активности ФПаз обязательно должны присутствовать ионы марганца, обеспечивающие максимальную активность и стабильность этих ферментов, а присутствие этих двухвалентных катионов препятствовало выявлению зависимости ФПазы 2В от Ca^{2+} . Во-вторых, препараты ФПазы 2В были в той или иной мере загрязнены ФПазой 2А, проявляющей свою активность в отсутствие двухвалентных катионов. В-третьих, как стало известно, субстрат, используемый для определения активности ФПазы 2В (киназа фосфорилазы), содержит КМ в виде одной из СЕ [3]. В присутствии этого субстрата не наблюдалось никакой стимуляции КМ, поскольку ФПаза 2В экстрагировала из киназы фосфорилазы значительное количество КМ, достаточное для ее максимального активирования. Лишь использование более подходящих субстратов, например I-1, позволило выявить стимулирование фермента КМ [13, 15].

После очистки до гомогенного состояния, достигнутого благодаря ПААГ ЭФ с ДДС-Na, Клее и соавт. [16] было обнаружено, что СЕ-состав ФПазы 2В совпадает с кальцинейрином—главным КМ-связывающим белком из мозга. Вскоре было доказано, что кальцинейрин является КМ-регулируемой ФПазой, обнаруживающей такую же субстратную специфичность, что и ФПаза 2В из скелетных мышц [13]. Для справки можно указать и другие наименования, предложенные разными авторами для этого белка: модуляторсвязывающий белок, СаМ—ВР₈₀ и фосфатаза 2 [6].

Физические и химические свойства кальцинейрина. Наличие множества форм ФПаз в нервной ткани показано нами еще в 1980 г. [17]. ФПаза 2В составляет 1% общего белка мозга, однако в периферических тканях она является лишь одним из ряда КМ-связывающих белков. В скелетных мышцах доля ее в общем растворимом белке не превышает 0,03% [1]. Мозговую форму фермента (кальцинейрин) легче было выделять в больших количествах, что способствовало более углубленному ее изучению. Физические и химические свойства и строение кальцинейрина уже описаны в нескольких обзорах [3, 16, 18, 19].

Кальцинейрин является гетеродимером, состоящим из большой СЕ, с M_r 61 кД и малой СЕ, с M_r 19 кД [3]. Принятие необходимых мер предосторожности, исключаяющих денатурирующие условия, вы-

сокую ионную силу, детергенты и длительную экспозицию к Са-хелирующим агентам, позволяет обнаружить обе СЕ в соотношении 1:1 на протяжении всех этапов очистки [20]. Хотя указанные СЕ и не диссоциируют в отсутствие двухвалентных катионов, реконструкция фермента из его изолированных СЕ происходит лишь в присутствии Ca^{2+} [21]. Большая СЕ (кальцинейрин А) является КМ-связываю-

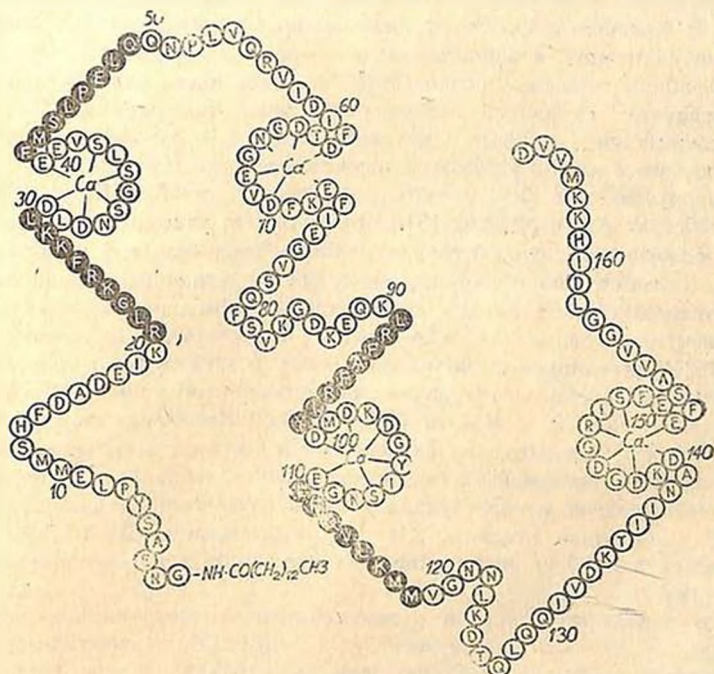


Рис. 1. Строение кальцинейрина В [3]: аминокислотная последовательность, определенная Aitken и соавт. [24], включает четыре Ca^{2+} -связывающие петли, формируемые предполагаемыми восьмичленными спиралями согласно модели «ЕF-крыльев» [25]; темные кружки указывают на положение спиралеобразующих остатков, в соответствии с рассчитанной Levitt, Greer [26] предполагаемой вторичной структурой белка

щим компонентом фермента [21, 22] и содержит каталитический участок [23]. СЕ с M_r 19 кД (кальцинейрин В) представляет из себя Ca^{2+} -связывающий компонент [19, 22, 24] и в ее аминокислотной последовательности выявлено наличие четырех Ca^{2+} -связывающих участков в форме «ЕF-крыльев» [25].

Аминокислотная последовательность, представленная на рис. 1 [3], указывает на высокую степень гомологии между кальцинейрином В и другими представителями семейства Ca^{2+} -связывающих белков с «ЕF-крыльями» на уровне четырех Ca^{2+} -связывающих петель. Участок аминокислотной цепи, соединяющий Ca^{2+} -связывающие уча-

стки II и III кальцийейрина В сходен с выявленными посредством рентгенструктурного анализа участками двух других белков, КМ и тропонина-С, имеющих четыре домена для связывания Ca^{2+} [27, 28]. При рассмотрении N- и С-окончающий доменов II и IV и пептидов, соединяющих Ca^{2+} -связывающие домены I с II и III с IV отмечены заметные различия между этими белками [16]. Особенностью кальцийейрина В является способность глицильного остатка на его N-конце взаимодействовать с миристиловым спиртом, что свидетельствует о гидрофобном характере белка [29]. Эта особенность кальцийейрина В сближает его с группой белков, имеющих отношение к клеточной трансформации, включая каталитическую СЕ с АМР-зависимой ПКазы, цитохром-В5-редуктазу и некоторые структурные белки РНК-ретровирусов, например, p15 gag, его предшественник p65 gag, p60 src, его субстрат p36 и p21 ras [3]. Миристиловый участок, очевидно, играет особую роль, способствуя ассоциации этих белков с мембранами [30]. Кальцийейрин обнаруживается как во фракциях частиц, так и в цитозоле, и миристиловая группа, по-видимому, принимает участие в связывании белка с субклеточными структурами. Интересно, что В-СЕ КМ-регулируемых ФПаз из других тканей, будучи миристилированными, локализируются почти полностью в цитозоле [20]. Между кальцийейрином В и КМ отсутствует функциональная перекрестная реактивность. Кальмодулин не способен ни заменить кальцийейрин В при реконструировании фермента из отдельных СЕ А и В, ни ингибировать процесс реконструкции [19]. В свою очередь, кальцийейрин В не в состоянии заменить КМ при активировании ФДЭ с АМР или кальцийейрина А и не ингибирует стимуляцию этих двух ферментов КМ [16].

О первичном строении кальцийейрина А сведения чрезвычайно скудны. В этой СЕ сосредоточены все 8—9 остатков триптофана и 10 цистеиновых остатков, обнаруживаемых в кальцийейрине [31].

Другие представители семейства ФПазы 2В. КМ-регулируемые ФПазы, выделенные из скелетных мышц, тромбоцитов, плаценты, сердца и икры морского ежа, также состоят из двух СЕ с Мг, близких к Мг кальцийейринов А и В [1]. А-СЕ ФПазы 2В, выделенная из скелетных мышц, мигрировала при ПААГ ЭФ с ДДС в виде дублета (61/58 кД) [32]. Однако иммуноблоттинг мышечных экстрактов позволил обнаружить лишь форму с Мг 61 кД [22]. Из этого следует, что полоса с Мг 58 кД образуется в ходе очистки, по-видимому, в результате протеолиза. Причина низкой величины Мг (55 кД), выявляемой при выделении А-СЕ из поджелудочной железы, может быть сходной (результат протеолиза), а невозможность обнаружения В-СЕ может быть связана со слабой интенсивностью прокрашивания этого компонента при анализе малых количеств ФПазы 2В [33]. ФПазу 2В идентифицировали во всех тканях млекопитающих, используя в качестве критериев зависимость от Ca^{2+} -КМ, чувствительность к трифторперазину [5] или иммуноблоттинг с антителами к кальцийей-

рину [1, 34]. В то время, как В-СЕ легко обнаруживается иммуно-блоттингом, А-СЕ едва детектируется, что свидетельствует о возможности существования изоформ А-СЕ, плохо вступающих в перекрестную реакцию с антителами к ферменту мозга [20]. Этим можно объяснить результаты более раннего сообщения о слабой детектируемости данного белка в периферических тканях [35]. Консервативная природа В-СЕ способствовала детектированию белков близких по строению к ФПазе 2В у некоторых низших эвкариотов [20].

Из библиотеки сДНК мышей выделен клон сДНК, кодирующий С-терминальную половину каталитического домена А-СЕ ФПазы 2В [36]. Остатки 1-111 этого клона показали 32%-ную идентичность (51% гомологии) относительно остатков 189—300 ФПазы 1 α и 35%-ную идентичность (45% гомологии) с остатками 189—294 ФПазы 2А. Соответствующий КМ-связывающий домен расположен между аминокислотными остатками 176 и 200 в клоне ФПазы 2В.

Эволюционные изменения в строении ФПаз. Использование техники рекомбинантной ДНК позволило в последнее время не только расшифровать первичную структуру четырех основных типов ФПаз, но и прийти к заключению, что гены, кодирующие ФПазы 1, 2А и 2В, относятся к одному семейству генов [37].

Сопоставление аминокислотной последовательности ФПаз 1, 2А и 2В позволило заключить, что участок, соответствующий последовательности остатков аминокислот 59—130 в ФПазе 1 α включает в себя каталитический центр (рис. 2).

Эволюционно консервативные белки обычно выполняют ключевые клеточные функции. Благодаря клонированию соответствующих сДНК установлено, что вышеуказанные ФПазы относятся к числу наиболее древних [38]. Лишь несколько других белков, включая гистоны 3 и 4, и КМ характеризуются большей степенью консервативности (табл. 2). Причина этой консервативности может заключаться не только в незаменимости их функций, но и в том, что они взаимодействуют со многими белковыми субстратами и регуляторными белками, принимая участие во многих клеточных функциях.

В сДНК из мозга человека идентифицированы 2 гена, кодирующие α - и β -изоформы ФПазы 2В [39]. Клонирование сДНК также позволило установить, что по меньшей мере 2 изоформы (58 и 59 кД) могут генерироваться альтернативным сплайсингом β -гена [40]. В результате обнаруживаются изоформы, которые отличаются включением из 18 аминокислот у N-конца и имеют разные С-концы. Наибольшие количества мРНК, кодирующих ФПазы 2В- α и - β обнаружены в мозгу млекопитающих.

С целью выявления новых тканеспецифичных форм ФПаз недавно из геномной библиотеки мозга был выделен клон сДНК, кодирующий белок, сходный более всего с ФПазой 2В, почему он и был обозначен как ФПаз 2В_w. Обнаружена 55%-ная идентичность этого фермента (между остатками 170 и 505, исключая включения и делеции) с первичной структурой ФПазы 2В [37]. Полагают, что основной изофор-

Таблица 2

Сравнение степени эволюционирования консервативных белков [37]

Белок	*Единицы эволюционного периода
Гистон H4	400
Кальмодулин	350
Гистон H3	340
ФПаза 2A- α	100
ФПаза 1- α	88
ФПаза 2B- β	66
Гистон H2A	60
Глутаматдегидро- геназа	55
Тубулин	40
ПКаза A	39
α -СЕ белка G _i	32
K ⁺ -канал	22

Примечание. * За единицу эволюционного периода принимается время в млн. лет, необходимое для 1% изменения в аминокислотной последовательности между двумя рядами поколений. Таким образом, это величина, обратная скорости эволюции белка.

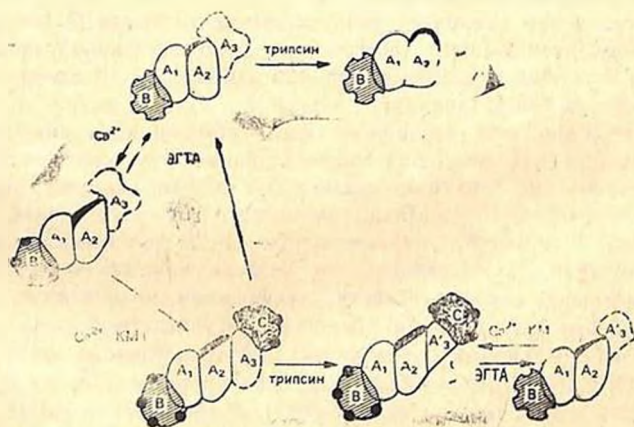


Рис. 2. Группа серин/треонинных фосфопротеинфосфатаз [37]: светлые участки обозначают каталитические домены, а числа в них—% идентичности с фосфопротеинфосфатазой I; каталитический домен фосфопротеинфосфатазы 2B содержит два малых включения из семи и шести остатков; степень идентичности между каталитическими доменами фосфопротеинфосфатаз 2A и 2B составляет 42%; сбоку указано количество аминокислотных остатков в каждом из белков; фосфопротеинфосфатаза 2B- β (но не 2B- α) содержит необычный полипролиновый участок (Pro) у N-конца; кальмодулинсвязывающий домен локализован на дополнительном фрагменте цепи, прилегающем к C-концу. Там же имеется участок (I), участвующий в подавлении активности фермента в отсутствие Ca^{2+} -кальмодулина, а также участок (R), способный взаимодействовать с регуляторной субъединицей с M_r 19 кД

мой является ФПаза 2В, тогда как новая разновидность может быть ее минорным компонентом или отделяется от нее на одном из этапов очистки. Предстоит еще сравнить субстратную специфичность, а также нейрональную и тканевую локализацию этих двух форм ФПазы 2В.

Особенности строения кальцинейрина А. Как и многие другие КМ-регулируемые ферменты, кальцинейрин активируется при ограниченном протеолизе трипсином и химотрипсином [41]. Протеолиз специфично действовал на А-СЕ и приводил к отщеплению КМ-связывающего участка, более чувствительного к протеолитическому расщеплению, чем остальная часть молекулы. Протеолиз кальцинейрина предотвращался Ca^{2+} и КМ [42] и даже одним Ca^{2+} [43]. Эти ранние работы послужили основой создания общей модели, согласно которой КМ-связывающий домен кальцинейрина А (как и других КМ-регулируемых ферментов) должен оказывать ингибирующее влияние на каталитический центр. Функция КМ заключается в удалении этого домена, что приводит к активированию фермента [3]. При использовании более специфических протеназ и высоких концентраций КМ имело место более избирательное протеолитическое расщепление, приводящее к образованию промежуточных продуктов с разным уровнем активности и различными регуляторными свойствами. Все это позволило лучше представить в настоящее время организацию функционального домена кальцинейрина и, помимо того, выделить КМ-связывающий участок [3]. В отсутствие КМ кальцинейрин А быстро превращался в полипептид с M_r 43 кД, который все еще был способен взаимодействовать с кальцинейрином В (не подвергающимся протеолизу), но утрачивал способность связываться и активироваться КМ. Активность этого деривата, измеренная в отсутствие Ca^{2+} и КМ, примерно совпадала с активностью нативного фермента в присутствии Ca^{2+} и КМ. Добавление Ca^{2+} без КМ стимулировало активность этих образцов в 3—4 раза, что значительно превышало активность нативного кальцинейрина в присутствии Ca^{2+} -КМ. Полагают, что такая стимуляция Ca^{2+} осуществляется путем связывания Ca^{2+} с кальцинейрином В. Ca^{2+} и КМ замедляют протеолитическое расщепление А-СЕ. При этом кальцинейрин В сохраняется интактным и продолжает оставаться связанным с гидролизированным кальцинейрином А. Первый интермеднат кальцинейрина А, образующийся при протеолизе, имеет M_r 57 кД и пока остается соединенным с КМ. Как и фрагмент с M_r 43 кД, форма с M_r 57 кД отличается высокой активностью в отсутствие Ca^{2+} -КМ и не стимулируется КМ. Однако в отличие от фрагмента с M_r 43 кД, эта форма кальцинейрина не активируется Ca^{2+} как в присутствии, так и в отсутствие КМ. Таким образом, удаление пептида с M_r 4 кД с конца молекулы повышает активность и устойчивость фермента к действию КМ, что свидетельствует об ингибиторном характере этого пептида. Следовательно, в нем и расположен ингибиторный домен, отличающийся от КМ-связывающего домена. Полагают, что КМ-связывающий домен, сохраненный в 57 кД-разновидности, но утраченный в 43 кД-деривате, предотвращает стимуляцию

Ca^{2+} , медируемую кальцинеирином В и, тем самым, образует другой независимый ингибиторный домен [3]. Присоединение КМ к кальцинейрину усиливает чувствительность каталитического участка к протеолизу. Схематическое изображение способов активирования кальцинейрина КМ и ограниченным протеолизом представлено на рис. 3 [16]. Согласно этой модели, кальцинейрин А содержит, по меньшей мере, 4 функциональных домена.

1. КМ-связывающий участок, сохраняющий эту способность при выделении фермента. Этот чувствительный к протеиназам домен защищается при взаимодействии с КМ.

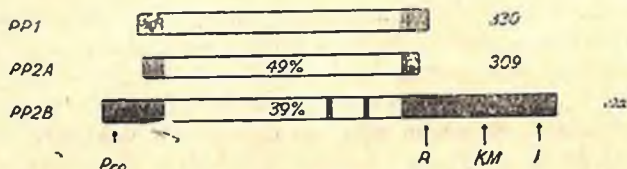


Рис. 3. Схематическое изображение активирования кальцинейрина Ca^{2+} , Ca^{2+} -кальмодулином и трипсином [16]: A_2 , A_1 и A_3 обозначают каталитический, кальцинейрин В-связывающий и кальмодулинсвязывающий домены кальцинейрина А; В—кальцинейрин В; С—кальмодулин. Полуокруги на субъединице представляют участок связывания Ca^{2+} в свободном состоянии, а темные кружки—участки, занятые лигандом. Каталитический участок кальцинейрина А указан черной полосой

2. Кальцинейрин В-связывающий домен, устойчивый к протеолизу, по-видимому, вследствие его защищенности кальцинеирином В.

3. Каталитический участок, чувствительность которого к протеолизу возрастает при взаимодействии фермента с КМ.

4. Ингибиторный домен, отличающийся от КМ-связывающего домена и особо чувствительный к протеолизу как в отсутствие, так и в присутствии КМ. Этот домен расположен искалело от N- или С-концов белка.

В свою очередь, кальцинейрин В содержит четыре Ca^{2+} -связывающих участка. Как выяснилось в опытах с реконструкцией фермента из СЕ А и В, кальцинейрин В играет важную роль в стабилизации активной конформации КМ-регулируемой ФПазы [44]. Сочетание ингибиторного и стимуляторного доменов, скорее всего, является общей характерной чертой КМ-регулируемых ферментов.

Роль Ca^{2+} и кальмодулина в регуляции ФПазы 2В. ФПаза 2В из мозга связывает 1 моль КМ на моль фермента, проявляя весьма высокое сродство ($K_d=0,1$ нМ). КМ активирует фермент в 5–10 раз [1, 18]. Активирование это обратимо, не связано с диссоциацией А- и В-СЕ, но сопровождается конформационными изменениями [1]. Активирование происходит вследствие увеличения V при незначительном изменении величины K_m [18]. Процесс активирования включает связывание 2 ионов кальция с КМ, что, в свою очередь, создает возможность взаимодействия КМ с фосфатазой. Дополнительное связы-

вание ионов кальция приводит к активированию фермента. При длительной инкубации КМ способен также вызвать его дезактивирование. Такая потеря активности не восстанавливается после диссоциации КМ, однако кальцийнейрин может реактивироваться добавлением Ca^{2+} в присутствии КМ. Стимулирование Ca^{2+} носит кооперативный характер, свидетельствуя о том, что для активирования требуется наличие более чем одного моля Ca^{2+} /моль фермента. Однако точное количество занимаемых Ca^{2+} -участков на В-СЕ или на КМ, необходимых для активирования или взаимодействия пока неизвестно [3]. Наличие Ca^{2+} -связывающих участков на двух компонентах очень затрудняет анализ стимулирующего действия Ca^{2+} на фермент.

Проявление активности ФПазы 2В из скелетных мышц полностью зависит от наличия Ca^{2+} как в присутствии, так и в отсутствие КМ, причем $A_{0,5}$ для этого катиона близко к 1 мкМ. В присутствии насыщающих концентраций КМ (0,03 мкМ) V возрастает примерно в 10 раз, не влияя на K_m к субстратам [13]. Как уже сообщалось выше, активирование ФПазы 2В осуществляется благодаря нейтрализации КМ ингибирующего эффекта 4 кД-домена А-СЕ, отличающегося от КМ-связывающего домена. Отщепление этого весьма чувствительного к протеолизу фрагмента приводит к потере способности Ca^{2+} -зависимого фермента стимулироваться КМ [1].

Ни один из других изученных Ca^{2+} -связывающих белков не способен заменить КМ или взаимодействовать с участком его связывания на кальцийнейрине А. Так, тропонин С не связывает и не активирует кальцийнейрин [3]. Ввиду высокого сродства к КМ кальцийнейрин сам является сильным ингибитором КМ-стимулируемых реакций. Именно благодаря этому свойству он был впервые охарактеризован как ингибитор КМ-зависимой ФДЭ сАМР [45]. Позднее было обнаружено его ингибирующее воздействие на аденилатциклазу и киназу фосфоорилазы [3].

Другие пути регуляции. Длительная инкубация ФПазы 2В с Ca^{2+} -КМ или субстратами дестабилизировала фермент, переводя его в форму, характеризующуюся очень низкой активностью даже в присутствии Ca^{2+} -КМ [13, 15, 46]. Фермент реактивировался переходными металлами, в частности Mn^{2+} [13, 15, 47] или Mg^{2+} в присутствии Ca^{2+} [3]. При умеренно щелочном pH кальцийнейрин, очищенный на КМ-сефарозе, проявлял абсолютную зависимость от Mg^{2+} и восстанавливающих агентов для восстановления максимальной, Ca^{2+} -кальмодулинстимулируемой активности [3, 48]. Другие металлы также в известной степени активировали кальцийнейрин [18]. Изолированная А-СЕ проявляла абсолютную зависимость от Mn^{2+} [23, 44]. Из этого можно заключить, что каталитическая СЕ имеет участок связывания для переходных металлов. В-СЕ не связывает Mn^{2+} [49]. В сырых экстрактах или в частично очищенном состоянии ФПаза 2В скелетных мышц [13, 15] и мозга [20] не нуждается в присутствии Mg^{2+} и не стимулируется Mn^{2+} . Можно предположить,

что экспонирование с Ca^{2+} -КМ вызывает высвобождение какого-то природного кофактора, вероятно иона металла, однако определенного экспериментального подтверждения эта гипотеза еще не нашла. Многие авторы указывают, что Ni^{2+} и Mn^{2+} стимулируют активность аффинно-очищенного кальцинейрина [18, 46, 47]. Эта Mn^{2+} -зависимая форма фермента слабо ингибируется трифторперазином. Имеются сообщения, что кальцинейрин содержит тесно связанные с ним металлы, идентифицированные как Fe и Zn [18], хотя неизвестно, к какой СЕ фермента это относится.

Поскольку в строении киназы фосфоорилазы имеется ряд особенностей, сближающих ее с ФПазой 2В, представляло интерес выяснить, способны ли эта фосфатаза, как и вышеупомянутый фермент, активироваться универсальным механизмом фосфорилирования. Кальцинейрин, выделенный в условиях, не исключающих его частичного дефосфорилирования, содержал 0,2—0,6 моль щелочнолабильного фосфата на 1 моль фермента [3]. Сообщалось также, что А-СЕ может дефосфорилироваться стехиометрически *in vitro* ПКазой С [50]. Однако фосфорилирование не влияло на активность, измеренную в условиях насыщающих концентраций Ca^{2+} и КМ. Поэтому не наблюдалось существенных сдвигов ни в $A_{0.5}$, ни K_m или V .

ФПАЗа 2В может подвергаться и другим посттрансляционным модификациям. Миристилирование приводило к изменениям в активности и субклеточной локализации кальцинейрина В, однако эта модификация необратима, поэтому вряд ли может служить реальным регулятором фермента. Кальцинейрин А служит субстратом для карбоксиметилтрансфераз, способных метилировать до двух карбоксильных групп на 1 моль фермента. Хотя при этом и наступает потеря способности стимулироваться КМ [51], нельзя представить, что этот процесс является физиологически значимым механизмом регуляции ФПаз 2В. Попытки осуществить гликозилирование фермента потерпели неудачу [3]. Хотя ранее мы и привели примеры необратимого активирования кальцинейрина ограниченным протеолизом, вероятно, чтобы таким путем могла бы осуществляться регуляция фермента *in vivo*. Таким образом, единственным достоверно установленным механизмом регуляции активности кальцинейрина *in vivo* остается его взаимодействие с Ca^{2+} и КМ.

Тканевое распределение ФПазы 2В. Широкая распространенность КМ-зависимой ФПазы в тканях эвкарнотов была обнаружена впервые Ingbritsen и соавт. [52], показавшими наличие высоких уровней Ca^{2+} -зависимой, трифторперазинчувствительной ФПазной активности в скелетных мышцах и мозгу, и несколько меньшую активность в сердце, печени и жировой ткани [19]. В отличие от этого, безуспешными оказались первые попытки идентифицировать мозговую форму фермента (кальцинейрин) в других тканях, включая скелетные мышцы, радиоиммунными методами, с использованием антител к кальцинейрину мозга быка [35]. Недавно, однако, использование Вестерн-блот-

тинга тканевых экстрактов с антителами к кальцийнейрину из мозга быка дало возможность обнаружить наличие кальцийнейринподобных белков в скелетных мышцах, сердце, печени, почках, селезенке, тимусе, гладких мышцах и легких быка [20], лимфоцитах свиней [53], плаценте [34] и сперме собак [50]. Используемый метод оказался пригодным лишь при выявлении В-СЕ. А-СЕ зачастую плохо идентифицировались, что позволило предположить о большей тканеспецифичности ее изоформ, плохо взаимодействующих с антителами на фермент мозга [20]. Консервативная природа кальцийнейрина В позволила позднее выявить кальцийнейринподобные белки у низших эвкарриотов, морского ежа и в ядре лягушки [3].

Сравнение активности ФПазы 2В в разных тканях также сталкивается с определенными трудностями, связанными с быстрым гидролизом их тканевыми протеазами, переводящими фермент в Ca^{2+} -КМ-независимую форму, а затем и приводящими к его инактивации. Ничего не известно и о тканеспецифичных ингибиторах ФПазы 2В. Между тем, хотя в сырых экстрактах мозга и скелетных мышц выявляется примерно сходная активность этого фермента [3], вестерн-блоттинг свидетельствует примерно о 10—20-кратном превышении содержания этого белка в нервной ткани по сравнению со скелетной мышцей [20].

Кальцийнейрин составляет около 1% от общего белка мозга и является одним из основных КМ-связывающих белков [20]. В периферических тканях содержание ферментного белка не превышает 0,03% от общей массы белка [19].

Субклеточное распределение ФПазы 2В. КМ-регулируемая ФПаза мозга, спермы, клеток простейших детектируется как в цитозоле, так и в субклеточных частицах [20, 54, 55]. Гранулярная форма, не солибилизируется полностью неионными детергентами и может связываться не только с клеточными мембранами, но и с элементами цитоскелета [3]. В других тканях фермент оказался растворимым и полностью экстрагировался при высокой ионной силе в отсутствие детергентов [20]. Согласно данным иммуногистохимии, небольшие количества кальцийнейрина связаны с постсинаптическими плотностями [56] и диффузно распределены в цитоплазме, преимущественно в постсинаптических локусах, плазматических мембранах и микротрубочках дендритов [57].

В целом господствует мнение, что КМ-зависимая ФПаза в ядре отсутствует [35, 58]. Что касается распределения кальцийнейрина на клеточном уровне, он выявляется иммунохимически во всех регионах ЦНС, но распределен очень гетерогенно: наибольшее количество обнаружено в хвостатом теле и гипоталамусе [57]. Фермент специфически локализован в нейронах, хотя одни нейроны более богаты им, чем другие [59]. В палочках зрительного аппарата и радужной оболочке он локализован в фоторецепторах, а также биполярных и ганглионарных клетках [60]. Некоторые популяции клеток хвостатого ядра, некоторые пирамидальные клетки II—IV уровней неокортекса и пи-

рамидальные клетки субрегионов СА1—СА2 гиппокампа отличаются высоким содержанием кальцинейрина, тогда как клетки V уровня неокортекса, нейроны черной субстанции и бледного шара, а также клетки Пуркинье мозжечка, отличаются значительно более низкими концентрациями фермента. В клетках нервной ткани кальцинейрин распределен по всей цитоплазме (дендриты, аксоны, перикарион и аксональные окончания) [59].

Субстратная специфичность. В отличие от многих ФПаз, отличающихся широкой специфичностью в отношении к ФП, кальцинейрин проявляет высокую степень субстратной специфичности [3, 16, 18, 19]. К числу быстро дефосфорилирующихся субстратов кальцинейрина, известных к настоящему времени, относятся α -СЕ киназы фосфорилазы, I-1 ФПазы I и регуляторная СЕ сАМР-зависимой ПКазы типа II [16].

Как показано на табл. 3, большинство субстратов ФПазы 2В фосфорилируются сАМР или СМР. Другие субстраты, например, легкие цепи мюозина, или субстратный белок сGMP-зависимой ПКазы (G-белок) дефосфорилируются гораздо слабее (0,1—0,5 мкмоль в

Таблица 3

Субстратная специфичность кальцинейрина [19]

Субстраты	Киназа	V (нмоль в мин мг)	K _m (мкМ)
I—1	сАМР	2083	2,5
PAKDP 32	сАМР	260	1,6
C-субстрат	сGMP	80	3,8
Блок КГ	сАМР	320	3,0
α -СЕ киназы фосфорилазы	сАМР	1040	5,9
Регуляторная Е ПКазы II	сАМР	1000	5,0
сАМР-зависимая ФДЭ	сАМР		
Белки микротрубочек:			
MAP-2	сАМР	403—1700	21
Tau	или	630—29	1,4—3,3
Основной блок мюозина	Ca ²⁺	392	8,0

мин/мг) [13, 31]. Кальцинейрин может дефосфорилировать также казеин, гистоны VS и IIa, а также модельные субстраты, как например, фосфотирозин и паранитрофенилфосфат [16]. Фосфотирозинный остаток в белках считался плохим субстратом, однако в настоящее время появились сведения, что кальцинейрин способен дефосфорилировать некоторые ФП, фосфорилированные по тирозину [18].

В отличие от ФПаз I, 2A и 2C, ФПазы 2В не дефосфорилируют в сколь-нибудь заметной мере ферменты, непосредственно участвующие в регуляции основных метаболических процессов, что говорит о ее сравнительно узкой специфичности *in vivo* [3]. Blumental и соавт. [61] обнаружили, что пептид, соответствующий 81—99 остаткам R-СЕ сАМР-зависимой ПКазы типа II, дефосфорилировался с K_m и V, характерными для интактного белка.

Хотя окончательные выводы о структурных параметрах субстрата, определяющих специфичность фермента пока не сформулированы, указывается, что важной структурной детерминантой субстратов КМ-

зависимых ФПаз может служить амфипатичная плоская β -конфигурация [16]. Каких-либо особенностей в аминокислотной последовательности в участке, где происходит гидролиз фосфорильного остатка серина установить не удалось. К числу обнаруженных потенциальных *in vivo* субстратов из нервной ткани относятся 63 кД-изофермент ФДЭ, DARPP, белок КР с M_r 18 кД, выделяемый из гранулярной фракции нервных клеток (функция неизвестна), и связанные с микротрубочками белки MAP-2 и Tau.

Физиологическая роль. Как уже было отмечено, в отличие от ФПаз с широким спектром действия, регулирующих ключевые ферменты углеводного и липидного обмена, ФПаза 2В характеризуется как фермент, дефосфорилирующий белки, регулирующие активность других ФПаз и ПКаз, например, ингибитор-1 и его изоформу DARPP, регуляторную СЕ. 32 Р-зависимой ПКазы-11 и α -СЕ киназы фосфо-

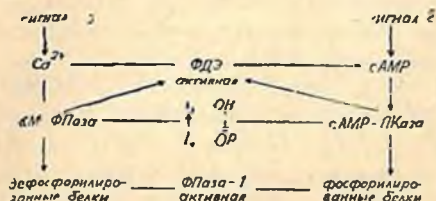


Рис. 4. Механизмы, по которым сигналы, поступающие через Ca^{2+} , способны ослаблять сигналы, поступающие через cAMP [2]. КМ-ФПаза— кальмодулинзависимая фосфопротеинфосфатаза 2В, I-I-ОН и I-I-ОР— дефосфорилирующая и фосфорилирующая формы ингибитора-1; cAMP-ПКаза—cAMP-зависимая протеинкиназа

рилазы [2]. В присутствии микромолярных концентраций Ca^{2+} ФПаза 2В эффективнее остальных фосфатаз гидролизует I-I в скелетных мышцах [5]. Наступающее вследствие этого повышение активности ФПазы I приводит к подавлению активности фосфорилазы II, следовательно, снижает интенсивность гликогенолиза. В мозгу же DARPP-32 и G-белок, ингибирующие в фосфорилированном состоянии ФПазу I, специфически локализованы соответственно в допаминопептиновых нейронах неостриатума и мозжечка, где наблюдаются особенно высокие уровни кальцийейрина [19]. Дефосфорилирование (и инактивирование) I-I ФПазой 2В способствует повышению активности ФПазы I, и если этот процесс действительно происходит *in vivo*, может оказаться, что Ca^{2+} этим путем участвует в регуляции ФПазы I. Этот уникальный каскадный механизм, в котором одна ФПаза активирует другую (рис. 4), позволяет сигналам, поступающим через Ca^{2+} -систему, корректировать метаболические пути, находящиеся под контролем циклических нуклеотидов. Инактивируя I-I и DARPP, кальцийейрин служит антагонистом cAMP-зависимой ПКазы, фосфорилирующей эти регуляторные белки [2]. Кроме того, дефос-

фосфорилирующая форма ФДЭ с M_r 60 и 63 кД, ФПаза 2В, способствует ослаблению внеклеточных сигналов, реализуемых через сАМР (рис. 3).

В настоящее время интенсивно исследуется роль ФПазы 2В в регуляции транспорта Ca^{2+} в нейронах. Дигидропиридинчувствительный Ca^{2+} -канал с M_r 160 кД фосфорилируется КМ-зависимой мультисеринкиназой и дефосфорилируется кальцинеином [62]. Хотя обнаружено дефосфорилирование ряда белков сперматозоидов в присутствии КМ-зависимой ФПазы, вопрос об участии этого фермента в регуляции подвижности спермы остается пока еще открытым [3]. Имеются предварительные данные о том, что микроинъекции комплекса Ca^{2+} -КМ-кальцинеин стимулируют экзоцитоз у *Raphesium* [55].

Особый интерес в последнее время вызывает тирозин-фосфатазная активность ФПазы 2В. К числу субстратов, дефосфорилирующихся по фосфотирозиновому остатку, относится урогастроновый рецептор эпидермального фактора роста [34] и фосфотирозинсодержащий фрагмент R-СЕ сАМР-зависимой ПКаза [63]. Однако эти опыты проведены *in vitro* с использованием очищенной на КМ-сепарозе Mn^{2+} -зависимой модифицированной ФПазы 2В.

Несмотря на объемные сведения о строении КМ-зависимой ФПазы и путях ее регуляции, физиологическая роль этого фермента пока еще мало изучена. Наиболее важные функции он должен, по-видимому, выполнять в мозгу, где концентрация его достигает 1%. Однако окончательных выводов нет в связи с отсутствием сведений об *in vivo* дефосфорилировании ряда субстратов кальцинеина в ответ на сигналы, повышающие уровень внутриклеточного Ca^{2+} . Во многом неизвестна также физиологическая роль белков НС, дефосфорилирующихся этим ферментом или значение ковалентной модификации в регуляции их деятельности. Возможно, микроинъекция КМ-зависимой фосфатазы или ее антител в определенные клетки позволит проследить за физиологическим ответом и идентифицировать ФП, подвергающиеся при этом дефосфорилированию.

BRAIN CALCINEURIN AND A GROUP OF RELATED TYPE-2B PROTEIN PHOSPHATASES

PARSADANIAN H. K.

Institute of Biochemistry, Armenian Academy of Sciences, Yerevan

The newest literature data concerning the physico-chemical properties, structure and extra- and intracellular regulation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein phosphatase are considered. The special attention is paid to the neuronal form of the enzyme, calcineurin. The importance of the investigations devoted to the neurospecific substrates of calcineurin and the role of the enzyme in the regulation of brain function is emphasized.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Cohen P. Ann. Rev. Biochem., v. 58, p. 453-508, 1989.
2. Cohen P. Proc. R. Soc. London, Ser. B, v. 234, p. 115-144, 1988.
3. Klee C. R., Cohen P.—In: Molecular Aspects of Cellular Regulation (ed. P. Cohen), p. 225-248, Elsevier, Amsterdam, New-York, Oxford, 1988.
4. Cohen P. Nature, v. 296, p. 63-65, 1982.
5. Ingebritsen T. S., Cohen P. Science, v. 221, p. 331-338, 1983.
6. Merlevede W.—In: Advances in Protein Phosphatases (ed. W. Merlevede, J. Di Salvo), v. 1, p. 1-18, Leuven University Press, Leuven, 1985.
7. Bradford A. P., Yeaman S. J.—In: Advances in Protein Phosphatases (eds. W. Merlevede, J. Di Salvo), v. 3, p. 73-106, Leuven University Press, Leuven, 1986.
8. Foukes J. G. Curr. Top. Microbiol. Immunol., v. 107, p. 163-180, 1983.
9. Cohen P. Eur. J. Biochem., v. 101, p. 433-448, 1985.
10. Huang F. L., Glinsmann W. H. Eur. J. Biochem., v. 70, p. 419-425, 1976.
11. Foukes J. G., Cohen P. Eur. J. Biochem., v. 97, p. 251-255, 1979.
12. Hemmings H. C., Greengard P., Tung H. Y. L., Cohen P. Nature, v. 310, p. 503-508, 1984.
13. Stewart A. A., Ingebritsen T. S., Mana'an A., Klee C. B., Cohen P. FEBS Lett., v. 137, p. 80-84, 1982.
14. Antoniw J. F., Cohen P. Eur. J. Biochem., v. 63, p. 45-54, 1976.
15. Stewart A. A., Ingebritsen T. S., Cohen P. Eur. J. Biochem., v. 132, p. 289-295, 1983.
16. Klee C. B., Mana'an A. S., Krinks M. H.—In: Calcium Regulation in Biological Systems (eds. S. Ebashi, M. Endo, K. Imahori, S. Kakiuchi, Y. Nishizuka), p. 29-39, Academic Press, Tokyo, 1984.
17. Парсадзян Г. К., Тер-Татевосян Л. П., Бунятыя Г. Х. Докл. АН СССР, т. 257, с. 1258-1261, 1981.
18. Martin B. L., Graves D. J.—In: Advances in Protein Phosphatases (eds. W. Merlevede, J. Di Salvo), v. 4, p. 95-125, Leuven University Press, Leuven, 1987.
19. Klee C. B., Krinks M. H., Mana'an A. S., Draetta G. F., Newton D. L.—In: Advances in Protein Phosphatases (eds. W. Merlevede, J. Di Salvo), v. 1, p. 135-146, 1985.
20. Krinks M. H., Mana'an A. S., Klee C. B. Federat. Proc., v. 44, p. 707a, 1985.
21. Sharma R. K., Desai R., Waisman D. M., Wang J. H. J. Biol. Chem., v. 254, p. 4276-4280, 1979.
22. Klee C. B., Crouch T. H., Krinks M. H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 76, p. 6270-6273, 1979.
23. Gupta R. C., Khandewala R. L., Sutakhe P. V. FEBS Lett., v. 193, p. 104-108, 1985.
24. Aitken A., Klee C. B., Cohen P. Eur. J. Biochem., v. 139, p. 663-671, 1984.
25. Kretsinger R. H. CRC, Crit. Rev. Biochem., v. 8, p. 119-174, 1980.
26. Levitt M., Greer T. J. Mol. Biol., v. 114, p. 181-191, 1977.
27. Babu Y. S., Sack J. S., Greenough T. J., Bugg C. E., Means A. R., Cook W. J. Nature, v. 315, p. 37-40, 1985.
28. Herzberg O., James M. N. A. Nature, v. 313, p. 653-659, 1985.
29. Aitken A., Cohen P., Santikari S., Williams D. H., Calder A. G., Klee C. B. FEBS Lett., v. 150, p. 314-318, 1982.
30. Pelman D., Garber E. A., Gross F. R., Hanafusa H. Nature, v. 314, p. 374-377, 1985.
31. Klee C. B., Krinks M. H., Mana'an A. S., Cohen P., Stewart A. A. Methods, Enzymol., v. 103, p. 227-244, 1983.
32. Stewart A. A., Ingebritsen T. S., Cohen P. Eur. J. Biochem., v. 132, p. 289-295, 1983.

33. Burnham D. B. *Biochem. J.*, v. 231, p. 335-341, 1985.
34. Pallen C. J., Valentine K. A., Wang J. H., Ho'tenderg H. O. *Biochemistry*, v. 24, p. 4727-4730, 1985.
35. Wallace R. W., Tallant E. A., Cheung W. Y. *Biochemistry*, v. 19, p. 1831-1837, 1980.
36. Kincaid R., Nightingale M. S., Martin B. H. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 85, p. 8983-8987, 1985.
37. Cohen P. T. W. *Genet. Human Nutr.* (in press).
38. Cohen P. T. W., Dombrovi V.—In: *Advances in Protein Phosphatases* (eds. W. Merlevede, J. Di Salvo), v. 5, p. 447-463, Leuven University Press, Leuven, 1989.
39. Kuno T., Takeda T., Harai M., Ito A., Mukai H., Tanaka C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 165, p. 1352-1358, 1989.
40. Gueurni D., Klee C. B. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 85, p. 9138-9187, 1989.
41. Simonelli P. F., Li H. C.—In: *Advances in Protein Phosphatases* (eds. W. Merlevede, J. Di Salvo), v. 1, p. 175-190, 1985.
42. Manalan A. S., Klee C. B. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 80, p. 4291-4295, 1983.
43. Tallant E. A., Cheung W. Y. *Biochemistry*, v. 22, p. 973-979, 1983.
44. Merat D. L., Hu Z. Y., Carter T. C., Cheung W. Y. *J. Biol. Chem.*, v. 260, p. 11053-11059, 1985.
45. Klee C. B., Krinks M. H. *Biochemistry*, v. 17, p. 120-126, 1978.
46. Pallen C. J., Wang J. H. *J. Biol. Chem.*, v. 259, p. 6134-6141, 1984.
47. Li H. C., Chan W. S. *Eur. J. Biochem.*, v. 144, p. 447-452, 1984.
48. Tallant E. A., Cheung W. Y. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 232, p. 269-279, 1984.
49. Pallen C. J., Wang J. H. *J. Biol. Chem.*, v. 261, p. 16115-16120, 1985.
50. Tung H. Y. L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 138, p. 783-788, 1986.
51. Billingsley M. L., Kincaid R. L., Lovenberg W. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 82, p. 5612-5616, 1985.
52. Ingebritsen T. S., Stewart A. A., Cohen P. *Eur. J. Biochem.*, v. 132, p. 297-307, 1983.
53. Chantler P. D. *J. Cell. Biol.*, v. 101, p. 207-216, 1985.
54. Tash J. S., Klee C. B., Means R. L., Tran A., Krinks M. H., Means A. R. *J. Cell. Biol.* (in press).
55. Momayezi M., Lumpert C. J., Kersken H., Gras U., Pattner H., Krinks M. N., Klee C. B. *J. Cell. Biol.*, v. 105, p. 181-189, 1987.
56. Carlin R. K., Grab D. J., Siekevitz P. J. *J. Cell. Biol.*, v. 89, p. 449-455, 1981.
57. Wood J. G., Wallace R. W., Whitaker J. N., Cheung W. Y. *J. Cell. Biol.*, v. 84, p. 66-76, 1980.
58. Klumpp S., Steiner A. S., Schultz J. E. *Eur. J. Cell. Biol.*, v. 164, p. 164-770, 1983.
59. Solimena M., Klee C. B., Krinks M. H., DeCamilli P.—In: *Abs. II European Congress on Cell Biology*, Budapest, Hungary, 1986.
60. Cooper N. F. G., McLaughlin B. J., Tallant E. A., Cheung W. Y. *J. Cell. Biol.*, v. 101, p. 1212-1218, 1986.
61. Blumenthal D. K., Takio K., Hansen R. S., Krebs E. G. *J. Biol. Chem.*, v. 261, p. 814-8145, 1986.
62. Hosey M. M., Borsotto M., Lazdunski M. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 83, p. 3733-3737, 1986.
63. Chan C. P., Gallis B., Blumenthal D. K., Pallen C. J., Wang J. H., Krebs E. G. *J. Biol. Chem.*, v. 261, 9890-9895, 1986.

Поступила 20. XII. 1990