

# СТРУКТУРА, СВОЙСТВА И РЕГУЛЯЦИЯ БЕЛКОВЫХ ПРОДУКТОВ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ЛОКУСА КИНАЗЫ ЛЕГКИХ ЦЕПЕЙ МИОЗИНА

© 2003 г. А. Ю. ХАПЧАЕВ,  
В. П. ШИРИНСКИЙ, А. В. ВОРОТНИКОВ\*

*Институт экспериментальной кардиологии Российского  
кардиологического научно-производственного комплекса МЗ РФ,  
Москва*

I. Введение. II. Ультраструктура сократительного аппарата гладких мышц и немышечных клеток. III. Генетический локус КЛЦМ. IV. Киназа легких цепей миозина. V. h-КЛЦМ. VI. KRP. VII. Фосфорилирование белков генетического локуса КЛЦМ. VIII. Заключение.

## I. ВВЕДЕНИЕ

В клетках эукариот  $Ca^{2+}$  является ключевым компонентом многих сигнальных путей. Связывание различных сигнальных молекул с поверхностными рецепторами клетки вызывает возрастание концентрации свободного  $Ca^{2+}$  в цитоплазме ( $[Ca^{2+}]_i$ ) и инициирует целый ряд внутриклеточных процессов, в том числе зависимых от миозина II типа. В мышечных тканях увеличение  $[Ca^{2+}]_i$  играет ведущую роль

---

*Принятые сокращения:*  $[Ca^{2+}]_i$  – концентрация свободного внутриклеточного  $Ca^{2+}$ ; CaM – кальмодулин; CaMK II –  $Ca^{2+}$ /кальмодулин-зависимая киназа типа II; l-КЛЦМ и h-КЛЦМ – низкомолекулярная и высокомолекулярная изоформы киназы легких цепей миозина, соответственно; skКЛЦМ – КЛЦМ скелетных мышц; KRP – kinase-related protein (телокин); MAP-киназа – митоген-активируемая протеинкиназа; PAK – p21-активируемая киназа; PKA – cAMP-зависимая протеинкиназа; PKG – cGMP-зависимая протеинкиназа; PKC –  $Ca^{2+}$ /фосфолипид-зависимая протеинкиназа; РЛЦ – регуляторные легкие цепи.

\*Адрес для корреспонденции: e-mail: A.Vorotnikov@cardio.ru; факс: (095)4146719.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (гранты 02-04-49341 и 02-04-49417), медицинского института Ховарда Хьюза (ННМИ грант 55000335), фондов Генри Веллкома (The Wellcome Trust грант CRIG 059801) и Джона Фогарти (FIRCA грант R03 TW05786).

в инициации сокращения. В поперечнополосатых скелетных и сердечной мышцах  $Ca^{2+}$  связывается с тропониновым комплексом, расположенным на тонких актин-тропомиозиновых филаментах, что «включает» тонкие филаменты и позволяет им активировать саркомерный миозин и сокращение.

В гладкой мускулатуре и неммышечных клетках  $Ca^{2+}$  запускает, соответственно, процессы сокращения и клеточной подвижности путем активации как тонких филаментов, так и несаркомерного миозина [2, 109, 182, 196]. Первичным акцептором кальциевого сигнала в гладких мышцах и неммышечных клетках является низкомолекулярный белок кальмодулин (CaM). Комплекс  $Ca^{2+}$ /CaM активирует CaM-связывающие белки, в том числе кальдесмон и киназу легких цепей миозина (КЛЦМ). Кальдесмон, аналогично тропонину скелетных мышц, «включает» тонкие филаменты, но для развития сокращения и неммышечной подвижности главным условием является активация миозина путем фосфорилирования его регуляторных легких цепей (РЛЦ). Основным ферментом, осуществляющим эту функцию, является КЛЦМ. Обратную реакцию дефосфорилирования и инактивацию миозина, приводящую к расслаблению гладких мышц, обеспечивает миозин-специфичная фосфатаза РЛЦ миозина.

Фосфорилирование РЛЦ миозина происходит и в поперечнополосатых мышцах [170, 175]. Однако миозин этих мышц активен конститутивно и его фосфорилирование играет лишь модуляторную роль, ускоряя развитие и увеличивая силу максимального сокращения [203]. Фосфорилирование повышает сродство миозина к актину и его АТФазную активность [167], что проявляется только в присутствии связанных с актином тропомиозина и тропонина.

Напротив, в гладкомышечных и неммышечных клетках фосфорилирование РЛЦ миозина играет ведущую роль в регуляции актомиозин-зависимых процессов. Оно многократно стимулирует актин-активируемую  $Mg^{2+}$ -АТФазу миозина и запускает сокращение гладких мышц [192, 216] и неммышечных клеток [123], ретракцию клеток эндотелия [62, 232], агрегацию тромбоцитов [72], рост ламеллоподий и хемотаксис [118], цитокинез [235], кэпирование мембранных рецепторов [117] и клеточную секрецию [32].

В геноме высших позвоночных обнаружено два гена КЛЦМ [71, 177]. Один кодирует КЛЦМ, экспрессирующуюся исключительно в скелетных мышцах и сердечной мышце (*sk*КЛЦМ) [153]. Другой представляет собой сложно организованный генетический локус, кодирующий несколько белковых продуктов, отличающихся по размеру и функциональным свойствам [5]. Среди них высокомолекулярная (*h*-КЛЦМ) и низкомолекулярная (*l*-КЛЦМ) изоформы

КЛЦМ и миозин-связывающий белок KRP, не обладающий протеинкиназной активностью [225]. Все три продукта генетического локуса КЛЦМ используют единую рамку считывания и общий стоп-кодон. Как следствие такой организации, *h*-КЛЦМ содержит уникальный N-концевой домен, тогда как ее С-концевая часть полностью включает в себя последовательность *l*-КЛЦМ. С-концевые последовательности обеих КЛЦМ идентичны последовательности белка KRP. Продукты генетического локуса КЛЦМ по-разному экспрессируются в тканях позвоночных и в онтогенезе [24]. *l*-КЛЦМ имеет широкое распространение в организме, *h*-КЛЦМ в основном экспрессируется в эмбриональном периоде и в немышечных клетках [57, 219, 220], а экспрессия KRP ограничена гладкой и сердечной мускулатурой [24, 45, 82]. Ключевая роль белковых продуктов генетического локуса КЛЦМ в жизнедеятельности клеток обуславливает наличие тонкой регуляции их активности в дополнение к прямому участию  $Ca^{2+}/CaM$ .

Целью настоящего обзора является анализ структуры генетического локуса КЛЦМ и его белковых продуктов, биохимических свойств КЛЦМ и KRP в отношении к регуляции активности актомиозина, их внутриклеточных взаимодействий и локализации, а также предполагаемых механизмов регуляции их активности. В обзоре меньше внимания будет уделено клеточно-физиологическим аспектам, поскольку эти вопросы более полно освещены в обзорах последних лет [2, 5, 88, 169, 200].

## II. УЛЬТРАСТРУКТУРА СОКРАТИТЕЛЬНОГО АППАРАТА ГЛАДКИХ МЫШЦ И НЕМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК

Гладкомышечные клетки не имеют упорядоченных саркомеров, характерных для поперечнополосатых мышц, однако содержат все основные их компоненты: актин, миозин и образования, аналогичные Z-дискам. Тонкие филаменты состоят из актина и тропомиозина, имеют толщину около 7 нм и окружают состоящие из миозина толстые филаменты диаметром 15-17 нм. В совокупности эти структуры образуют миофиламенты, которые ориентированы под углом к продольной оси клетки [15]. Через актин концы миофиламентов закреплены в так называемых плотных тельцах, содержащих основной белок Z-дисков саркомеров  $\alpha$ -актинин. С помощью этих образований (в таком случае называемых плотными бляшками) миофиламенты прикреплены к клеточной мембране. В цитоплазме плотные тельца контактируют также с системой промежуточных филаментов, построенных из десмина и виментина, и служащих для связывания миофиламентов в единую сеть. В силу таких ультраструктурных особен-

ностей распределение миофиламентов в дифференцированной гладкомышечной клетке практически не изменяется.

В немышечных клетках актомиозин сходным образом организован в волокна, в виде пучков, пронизывающих цитоплазму, или расположенных субкортикально под мембраной. В зонах контакта актомиозиновых пучков с мембраной располагается белок  $\alpha$ -актинин, который также распределяется периодически вдоль волокон, возможно, формируя структуры типа плотных телец [134]. Основное отличие актомиозиновой системы немышечных клеток от гладкомышечного сократительного аппарата — ее динамический характер. Двигательные процессы в немышечных клетках протекают локально с частой переменной вектора натяжения или сокращения и сопровождаются постоянной перестройкой актомиозина.

Структура актиновых филаментов достаточно консервативна для всех типов мышц и немышечных клеток. Поэтому отсутствие разделения несаркомерных миофиламентов на сократительные единицы определенной длины во многом связано со специфическими особенностями миозина гладких мышц и его способностью полимеризоваться в филаменты, отличные от филаментов миозина поперечнополосатых мышц.

#### СТРУКТУРА И СВОЙСТВА МИОЗИНА

Основным молекулярным мотором всех эукариотических клеток является миозин II типа. Хотя в поперечнополосатых мышцах, гладких мышцах и немышечных клетках экспрессируются продукты разных генов миозина II, все эти белки имеют, в целом, сходную молекулярную организацию. В то же время, отличия в их первичной структуре определяют различные способы филаментообразования и регуляции моторной активности миозинов.

Молекула миозина II типа состоит из двух тяжелых (около 200 кДа) и двух пар легких цепей: существенных и регуляторных с массой 17 и 20 кДа, соответственно (см. обзор [3]). Эти субъединицы формируют единую молекулу, состоящую из стержневого хвоста, связанного через так называемую шейку с двумя глобулярными головками. Филаменты образуются путем латеральной агрегации хвостовых частей молекул миозина. В филаментах гладкомышечного и немышечным миозинов головки располагаются вдоль боковой поверхности филамента и на разных его сторонах имеют противоположную ориентацию, образуя филаменты с боковой полярностью [234]. Молекулы миозина поперечнополосатых мышц ассоциируют антипараллельно и формируют биполярные филаменты с концевым расположением

головок и их противоположной ориентацией, тогда как центральная зона филамента головок не содержит [198].

Головка молекулы миозина (так называемый субфрагмент S1) образована N-концевой частью тяжелой цепи миозина и ассоциированными с ней легкими цепями. В состав S1 входят центры связывания  $Mg^{2+}$ -АТР и актина и связывание этих лигандов приводит к изменению конформации головки миозина. Установлено, что S1 является необходимой и достаточной частью молекулы миозина, способной осуществлять движение в присутствии актина и  $Mg^{2+}$ -АТР, так как в этой части молекулы сосредоточен ее моторный домен [214]. Обнаружен ряд тканеспецифических изоформ миозина гладких мышц [13], различающихся  $Mg^{2+}$ -АТРазной активностью и скоростью транслокации актиновых филаментов *in vitro* [112, 204].

Легкие цепи миозина расположены в области шейки и обвивают тяжелую цепь миозина так, что их N- и C-концевые участки оказываются вблизи друг от друга [174, 233]. По-видимому, одной из важнейших функций легких цепей является стабилизация длинной  $\alpha$ -спирали внутри S1, обеспечивающей передачу сигнала от шейки к апикальной части головки, АТР- и актин-связывающим центрам. В дефосфорилированном миозине взаимодействие головок друг с другом препятствует конформационным изменениям и гидролизу  $Mg^{2+}$ -АТР в активном центре [228, 229]. КЛЦМ активирует миозин, специфически фосфорилируя остаток Ser<sup>19</sup> РЛЦ [94], что изменяет конфигурацию РЛЦ, вышеупомянутой  $\alpha$ -спирали и, по-видимому, взаимодействие головок миозина, приводя к экспонированию актин-связывающих участков S1, активации  $Mg^{2+}$ -АТРазы миозина активном и развитию сокращения.

Другой важной функцией фосфорилирования Ser<sup>19</sup> РЛЦ является регуляция динамики филаментов миозина. В растворе молекула несаркомерного миозина находится в стабильных свернутой (10S) или развернутой (6S) конформациях. При физиологических концентрациях солей и АТР дефосфорилированный миозин не способен полимеризоваться поскольку приобретает 10S конфигурацию так, что стержневая часть молекулы сложена втрое и загнута в сторону головок, взаимодействуя с областью шейки [217]. Это взаимодействие нарушается при фосфорилировании РЛЦ миозина [35, 202] или связывании белка KRP в области шейки (см. ниже) [185], что приводит к разворачиванию молекул миозина и их спонтанной полимеризации в филаменты. Таким образом, фосфорилирование РЛЦ или связывание KRP могут стабилизировать миозин в филаментах, определяя его доступность для актина и участие в силогенерирующих процессах [221].

Было обнаружено, что при дефосфорилировании миозина в гладкой мускулатуре не происходит глубоких структурных перестроек сократительного аппарата [65, 195]. Таким образом, несмотря на высокую концентрацию АТФ (порядка 2–5 мМ), дефосфорилированный миозин остается собранным в филаменты, что может объясняться совокупным воздействием таких факторов, как огромная внутриклеточная концентрация миозина (80–90  $\mu$ М или 40–45 мг/мл!), наличием остаточного (базального) уровня фосфорилирования РЛЦ (2–10 %, в зависимости от ткани), уровнем экспрессии КРР (подробнее см. ниже) или белка р38, который взаимодействует со стержневой частью молекулы миозина и стабилизирует 6S конформацию миозина и его филаменты по механизму, отличному от действия КРР [155].

Регуляция полимеризации-деполимеризации миозина играет важную роль в мышечных клетках, обеспечивая быструю и компартиментализованную сборку и разборку филаментов миозина. В мышечных клетках КРР не экспрессируется, а концентрация миозина II ниже, чем в гладких мышцах и до 50% миозина может находиться в растворимой, нефиламентарной форме. Принято считать, что фосфорилирование РЛЦ миозина является основным путем регуляции динамики миозиновых филаментов в этих системах.

### III. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ЛОКУС КЛЦМ

У позвоночных разные гены кодируют КЛЦМ, фосфорилирующую скелетный и сердечный миозины II (*sk*КЛЦМ), и КЛЦМ, фосфорилирующую гладкомышечный и немышечный миозины II. Экспрессия *sk*КЛЦМ ограничена поперечнополосатыми мышцами и зонды, селективные к кДНК *sk*КЛЦМ, гибридизуются с 3,3 kb мРНК в этой ткани [79, 83, 177]. Напротив, во многих тканях три класса мРНК гибридизуются с пробами к 3'-концу кДНК гладкомышечной/немышечной КЛЦМ. Эти мРНК имеют размер 9,0, 5,5 и 2,7 kb и кодируют три семейства белков [24, 225]. Все они экспрессируются с единого участка в геноме позвоночных, получившего название генетический локус КЛЦМ [24].

До определения генетической организации локуса КЛЦМ в литературе существовало несколько классификаций КЛЦМ гладкомышечных и немышечных клеток, противоречивших друг другу. Считалось, что гладкие мышцы содержат специфичную низкомолекулярную изоформу (*smooth muscle*, *sm*КЛЦМ), а в немышечных и эмбриональных тканях экспрессируется другая изоформа с большей молекулярной массой (*non-muscle*, *nm*КЛЦМ) [51, 57, 186]. В даль-

нейшем оказалось, что *sm*КЛЦМ также экспрессируется в немышечных клетках, а *nm*КЛЦМ может экспрессироваться в гладкомышечных клетках. Были сделаны попытки классифицировать КЛЦМ по молекулярной массе. Однако у различных видов низкомолекулярная изоформа КЛЦМ имеет расчетную массу от 108 до 130 кДа, а высокомолекулярная изоформа – 210–230 кДа. Флуктуации молекулярной массы в результате альтернативного сплайсинга изоформ КЛЦМ (см. ниже) создали дополнительные трудности для этой классификации. В качестве выхода из положения было предложено обозначать семейство высокомолекулярных изоформ КЛЦМ как «большие» или «длинные» КЛЦМ (*big or long*), а низкомолекулярные КЛЦМ, как «малые» или «короткие» КЛЦМ (*small or short*).

По нашему мнению, более объективной представляется классификация на основе структурно-функциональных свойств КЛЦМ, чем по размерам молекул, которые еще окончательно не установлены. Поэтому мы будем далее использовать термины *l*-КЛЦМ (от англ. *light* – «легкая») и *h*-КЛЦМ (от англ. *heavy* – «тяжелая») для обозначения групп низко- и высокомолекулярных изоформ КЛЦМ, соответственно. Подобная классификация была ранее введена и успешно используется для изоформ актин-связывающего белка кальдесмона [141].

Анализ структуры генетического локуса КЛЦМ впервые продемонстрировал новый для эукариот тип геномной организации. Оказалось, что ген КЛЦМ содержит внутри себя другой ген, кодирующий некиназный С-концевой фрагмент КЛЦМ [24, 33, 58, 225, 240]. Этот короткий белок, открытый и описанный параллельно двумя группами исследователей, получил два независимых названия. Первое из них, телокин, является комбинацией греческого слова *telos* (хвост) и английского *kinase*, буквально означая «хвост киназы» [104]. Второе название, KRP, представляет собой английскую аббревиатуру от «*kinase related protein*» (белок, родственник киназе), что отражает его генетическую связь с КЛЦМ [33]. Хотя в настоящее время очевидно, что телокин и KRP идентичны и оба названия одинаково употребимы в литературе, мы будем использовать второе название.

KRP кодируется 2,7 kb мРНК, транскрипция которой определяется независимым промотором, расположенным в интроне гена КЛЦМ, между экзонами 28 и 29, кодирующими CaM-связывающий участок. В этом интроне были найдены мотив ..ССААТ..ТАТАА..., кодирующий участок посадки рибосом, участок инициации транскрипции, и первые 109 нуклеотидов 5'-некодирующей последовательности мРНК KRP [33, 58] (рис. 1, см. цветную вкладку, стр. 385).

Последующие исследования выявили подобную организацию и других генетических локусов позвоночных. Так, белок FRNK (ФАК-related nonkinase) автономно экспрессируется с гена, находящегося внутри гена киназы фокальных контактов (ФАК) [181], а некаталитический и не связывающий  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM белок экспрессируется с гена  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-зависимой киназы II типа [22]. Были также описаны гены коллагена, содержащие внутри себя меньшие гены, промоторы которых расположены внутри интронов гена коллагена [241].

Генетический локус КЛЦМ простирается приблизительно на 100 kb ДНК и включает 31 экзон. *h*-КЛЦМ кодируют все 31 экзона [24], причем возможны варианты альтернативного сплайсинга пре-мРНК [133]. Экзоны 15-31 и 29-31 кодируют, соответственно, *l*-КЛЦМ и KRP (рис. 1). При этом мРНК *l*-КЛЦМ и *h*-КЛЦМ транскрибируется с использованием экзона 29А, представляющего собой 3'-часть экзона 29 [24]. Генетический локус КЛЦМ человека, названный MYLK, расположен в области 3qcen-q21 третьей хромосомы [173]. В области 3p13 этой же хромосомы обнаружен псевдоген КЛЦМ (MYLKP) [28].

Все три класса мРНК, транскрибируемых с гена КЛЦМ, обладают идентичными 3'-концевыми участками [225]. Пока остается неясным, образуются ли мРНК для *l*-КЛЦМ и *h*-КЛЦМ в результате альтернативного сплайсинга материнской пре-мРНК или, аналогично KRP, их транскрипция происходит с разных промоторов. Также высказано предположение о существовании четвертого класса мРНК, транскрибирующегося с локуса КЛЦМ [226].

Таким образом, структурная организация белковых продуктов генетического локуса КЛЦМ по принципу «один-в-другом» сходна с устройством выдвижной антенны. Все они имеют общее основание (С-конец в KRP, *l*-КЛЦМ и *h*-КЛЦМ), одинаковые звенья (перекрывающиеся последовательности), но переменный размер вследствие дискретного количества дистальных (N-концевых) сегментов. Такая организация позволяет каждому большему из белков сохранять все свойства меньшего, а также приобретать новые, связанные с функционированием уникальных N-концевых доменов. Интересно предположить, что возникновение в природе этого феномена имеет большее значение, чем простое расширение функциональных возможностей исходного белка. Представленный в настоящем обзоре сравнительный анализ строения генетического локуса КЛЦМ, структуры его белковых продуктов и их внутриклеточных функций, а также расположения регуляторных участков, включая фосфорилируемые кластеры, позволяет предположить, что каждый уникальный домен определяет основную функцию данного белка, экспрессируемого генетическим локусом КЛЦМ. Так, известная к настоя-

щему времени главная функция KRP заключается в связывании и регуляции миозина, *l*-КЛЦМ – в активации миозина путем фосфорилирования РЛЦ, а *h*-КЛЦМ – в модуляции взаимодействия различных компонентов цитоскелета. В дополнение к своей определяющей функции, каждый больший по размеру белок только дополнительно использует все свойства более короткого. Такая картина была бы наиболее характерна для клеток, экспрессирующих все компоненты генетического локуса КЛЦМ. Однако, в случаях, связанных с их избирательной экспрессией, можно ожидать, что один белок может принимать на себя функцию отсутствующего компонента или функция последнего рудиментарна для данного типа клеток.

В связи с такой гипотезой интересен эволюционный аспект функциональной геномики КЛЦМ, который указывает на двунаправленность структурно-функциональных изменений исходного белка, которым, по-видимому, является *l*-КЛЦМ. Геном таких ранних эукариот, как дрожжи, не несет гена КЛЦМ, а микроорганизм *Dictyostelium discoideum* экспрессирует КЛЦМ, регулируемое автофосфорилированием, но не  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  [206]. Возможно, что изменение способа активации КЛЦМ путем замены автофосфорилирования на связывание  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM произошло эволюционно и не потребовало значительных структурных изменений. Так, вставка всего лишь из пяти аминокислот из области фосфорилирования РЛЦ, в регуляторный участок *sm*КЛЦМ приводит к внутримолекулярному автофосфорилированию и CaM-независимой активации *l*-КЛЦМ [18], аналогично активации КЛЦМ *Dictyostelium*. У краба *Limulus* также обнаружена короткая форма КЛЦМ (34 кДа), однако этот фермент уже  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM зависим и может фосфорилировать РЛЦ гладких мышц позвоночных [183]. КЛЦМ плодовой мушки *Drosophila* содержит и  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -связывающий участок, и структуру, сходную с N-концевой частью *h*-КЛЦМ, но не содержит актин-связывающего участка и KRP-домена, взаимодействующего с миозином [211]. Кроме того, *Drosophila* не имеет *sk*КЛЦМ, но использует альтернативный сплайсинг для экспрессии различных изоформ КЛЦМ с одного гена, по-видимому, для выполнения различных клеточных функций. Напротив, позвоночные имеют две группы филогенетически и генетически разных CaM-регулируемых КЛЦМ (*l*-КЛЦМ/*h*-КЛЦМ и *sk*КЛЦМ). При этом у первой группы ферментов появляются миозин-связывающий KRP-домен и актин-связывающий участок, а также усложняется устройство генетического локуса, давая начало новому у эукариот принципу геномной организации по типу «ген внутри гена» [24]. Вероятно, феномен «ген внутри гена» возник на поздних этапах эволюции позвоночных и связан со спецификой программирования развития и гомеостаза.

#### IV. КИНАЗА ЛЕГКИХ ЦЕПЕЙ МИОЗИНА

Как фермент, специфически фосфорилирующий РЛЦ миозина, КЛЦМ была впервые обнаружена в скелетных мышцах [170]. Позже КЛЦМ была выделена из гладких мышц [7, 38]. Ген КЛЦМ клонирован из гладкомышечных тканей курицы [156], кролика [59], быка [121], а также из мозга человека [173], фибробластов куриных эмбрионов [225] и слизневики *Dictyostelium* [206].

КЛЦМ различных видов животных различаются по молекулярной массе и обладают аномальной электрофоретической подвижностью. Кажущаяся молекулярная масса, определенная этим методом, составляет 75–90 кДа для *sk*КЛЦМ [29, 153, 171, 238] и 130–160 кДа для *l*-КЛЦМ, что всегда выше расчетной и определенной методами седиментации или гель-фильтрации [9, 12, 59]. Молекула *l*-КЛЦМ асимметрична: соотношение осей молекулы составляет 18,9, а радиус Стокса равен  $68,5 \text{ \AA}$  [12], однако, по данным электронной микроскопии молекула *l*-КЛЦМ может принимать сложенную конформацию в растворе [152]. Согласно другим данным, в физиологических растворах *in vitro* *l*-КЛЦМ существует как смесь олигомерной (2%), димерной (53%) и мономерной (45%) форм, но связывание  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  сдвигает равновесие в сторону образования димеров [14, 49]. Вероятно, олигомеризацию обеспечивает С-концевой домен *l*-КЛЦМ, поскольку в присутствии КРР олигомеризация нарушается [149].

Установление доменной организации КЛЦМ началось с анализа продуктов ограниченного протеолиза *l*-КЛЦМ [46, 54, 55, 101, 161, 224]. Последующее получение кДНК *sk*КЛЦМ [85, 177] и *l*-КЛЦМ [59, 71, 156, 186] позволило более детально картировать функциональные участки в первичной структуре различных КЛЦМ (рис. 2, см. цветную вкладку, стр. 386).

Каталитические домены *sk*КЛЦМ и *l*-КЛЦМ в высокой степени гомологичны друг другу и каталитическим центрам других протеинкиназ [71, 205]. Хотя их трехмерная организация не определена, она считается крайне сходной с таковой у других протеинкиназ [210]. Были установлены кристаллические структуры каталитического домена твитчин-киназы [90] и  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -зависимой протеинкиназы I типа [67], наиболее родственных КЛЦМ, а также протеинкиназы А [120], циклин-зависимой киназы II [41], MAP-киназы [230] и других. Каталитический домен этих протеинкиназ состоит из двух долей с активным центром в пределах линкерной последовательности. В КЛЦМ меньшая по размеру доля связывает  $\text{MgATP}$  так, что  $\gamma$ -фосфат направлен внутрь активного центра, где он переносится на остаток  $\text{Ser}^{19}$  РЛЦ миозина, который, в свою очередь, ориентирован многоточечным связыванием РЛЦ большей долей каталитического домена.

К С-концу от каталитического ядра располагается регуляторный сегмент КЛЦМ, состоящий из автоингибиторного и СаМ-связывающего участков. Регуляторные сегменты *sk*КЛЦМ и *l*-КЛЦМ также высоко гомологичны. С-концевой КРР-домен *l*-КЛЦМ включает участок, ответственный за связывание с миозином вблизи зоны связывания РЛЦ [142, 185, 187]. К N-концу от каталитического центра расположены повторяющиеся структурные элементы, отсутствующие в *sk*КЛЦМ и КЛЦМ беспозвоночных. N-конец *l*-КЛЦМ содержит актин-связывающий участок, на 100% гомологичный и более 95% идентичный в *l*-КЛЦМ разных видов [191]. *l*-КЛЦМ взаимодействует с филаментами нефосфорилированного миозина II типа и актина *in vitro* [184], а в клетках ассоциирована с актомиозин-содержащими волокнами [42, 70].

#### СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ КЛЦМ И КИНЕТИКА ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ РЛЦ

КЛЦМ (АТР:protein phosphotransferase, ЕС 2.7.1.37) является серин/треониновой протеинкиназой и проявляет высокую специфичность к РЛЦ миозина [75, 171], тогда как активность по отношению ко всем другим исследованным субстратам меньше 1% по сравнению с РЛЦ [21]. *l*-КЛЦМ фосфорилирует миозин и изолированные РЛЦ гладких мышц и немышечных тканей, однако практически не фосфорилирует миозин поперечнополосатых мышц [9, 21, 40, 81, 138]. Скорость фосфорилирования изолированных РЛЦ *l*-КЛЦМ *in vitro* на порядок выше таковой для целого миозина [147]. Это может быть связано с конформационными особенностями гладкомышечного миозина и экранированием участка фосфорилирования, расположенными вблизи головами миозина. Так, в сложенной 10S-конформации миозин является плохим субстратом *l*-КЛЦМ [36], но переход миозина в развернутую 6S-конформацию вследствие увеличения ионной силы приводит к повышению скорости реакции [147]. Напротив, *sk*КЛЦМ фосфорилирует РЛЦ всех миозинов II типа [81] и ее активность по отношению к изолированным РЛЦ и целому миозину сопоставима [171].

Фосфорилирование гладкомышечного миозина *l*-КЛЦМ является организованным процессом. *In vitro* *l*-КЛЦМ сначала фосфорилирует РЛЦ одной из головок миозина, т.е. при включении 0,5 моль фосфата на 1 моль связанных с миозином РЛЦ каждая молекула миозина будет иметь одну фосфорилированную головку [165, 166]. Интересно, что *sk*КЛЦМ может фосфорилировать обе головки миозина независимо [167]. Такое различие в механизме фосфорилирования, по-видимому, связано с функционированием миозин-связывающего КРР-домена

в *l*-КЛЦМ (см. ниже), отсутствующего в *sk*КЛЦМ. Скорее всего связывание KRP–домена с миозином координирует каталитический центр *l*-КЛЦМ по отношению к РЛЦ только одной головки. Фосфорилирование РЛЦ приводит к нарушению связывания KRP–домена с миозином и его диссоциации [185]. Поэтому, скорее всего, РЛЦ второй головки миозина фосфорилируется только из раствора с меньшей эффективностью.

*l*-КЛЦМ фосфорилирует РЛЦ миозина гладких мышц по остаткам Ser<sup>19</sup> и Thr<sup>18</sup> *in vitro*, при этом преимущественно фосфорилируется Ser<sup>19</sup> [91,93,94]. Фосфорилирование Ser<sup>19</sup> абсолютно необходимо для активации миозина [94], что подтверждается активирующим эффектом имитирующей мутации Ser<sup>19</sup> > Asp [108]. Дополнительное фосфорилирование Thr<sup>18</sup> еще более стимулирует актин-активируемую Mg<sup>2+</sup>-АТФазу миозина, однако протекает медленнее и требует более высоких концентраций *l*-КЛЦМ *in vitro*. Модификация Thr<sup>18</sup> под действием *l*-КЛЦМ *in vivo* считается маловероятной, но, возможно, происходит при участии других протеинкиназ [91, 208].

Важная роль основных аминокислотных остатков, расположенных к N-концу от Ser<sup>19</sup> РЛЦ и служащих детерминантами узнавания субстрата для *l*-КЛЦМ, была показана в ряде работ [97, 100, 115]. Так, если удаление десяти N-концевых аминокислотных остатков РЛЦ незначительно влияет на кинетические параметры *l*-КЛЦМ, то замена последовательности Lys<sup>11</sup>-Lys<sup>12</sup>-Arg<sup>13</sup> на кислые или нейтральные остатки снижает  $V_{\max}$ , а удаление этой последовательности полностью подавляет реакцию фосфорилирования [100]. В то же время этот кластер аминокислот оказывает меньшее влияние на фосфорилирование РЛЦ в составе миозина - при удалении Lys<sup>11</sup>-Lys<sup>12</sup> способность *l*-КЛЦМ фосфорилировать и активировать миозин сохраняется [97]. Это еще раз указывает на возможную роль взаимодействия KRP-домена *l*-КЛЦМ с миозином в модуляции субстратной специфичности *l*-КЛЦМ.

Остаток Arg<sup>16</sup> РЛЦ играет ключевую роль в субстратном узнавании *l*-КЛЦМ. Перенос Arg<sup>16</sup> в положение 15 смещает фосфорилирование с Ser<sup>19</sup> на Thr<sup>18</sup> [113], удаление Arg<sup>16</sup> полностью подавляет фосфорилирование [97], а замена Arg<sup>16</sup> > Asp приводит к значительному снижению  $V_{\max}$  реакции фосфорилирования [100]. Предполагается, что гуанидиновая группа Arg<sup>16</sup> участвует в переносе остатка фосфорной кислоты. Кроме этого, остатки Val<sup>21</sup> и Phe<sup>22</sup> обеспечивают высокую скорость реакции, не оказывая существенного влияния на сродство [162]. Критичность остатков Arg<sup>16</sup>, Val<sup>21</sup> и Phe<sup>22</sup> РЛЦ как важных субстратных детерминант для *l*-КЛЦМ, была подтверждена сайт-направленным мутагенезом и созданием химерных РЛЦ [242]. Таким образом,

консенсус субстратного узнавания *l*-КЛЦМ можно определить последовательностью X-Lys-Lys-Arg-X-X-Arg-X-X-Ser(P)-X-Val-Phe.

Определенные разными авторами кинетические константы реакции переноса остатка фосфорной кислоты незначительно отличаются в зависимости от источника фермента.  $K_m^{ATP}$  для *sk*КЛЦМ составляет 0,15–0,28 мМ, тогда как *l*-КЛЦМ обладает более высоким сродством (0,05–0,12 мМ). По разным данным,  $K_m^{P_{11C}}$  для обеих КЛЦМ варьирует от 5 до 24  $\mu$ М [9, 63, 75, 92, 238]. *l*-КЛЦМ катализирует перенос фосфата по последовательному механизму, при котором фермент сначала связывает  $Mg^{2+}$ -АТР, а затем РЛЦ. Высвобождение продуктов реакции происходит также последовательно, но в обратном порядке [193]. Продукты реакции фосфорилирования являются конкурентными ингибиторами *l*-КЛЦМ ( $K_i^{MgADP}$  равна 140  $\mu$ М [92]) и *sk*КЛЦМ ( $K_i^{фосфо-РЛЦ}$  равна 1,4  $\mu$ М [63]).

В условиях *in vitro* *l*-КЛЦМ способна катализировать обратную реакцию синтеза АТР из АДФ в присутствии фосфорилированного миозина и  $Ca^{2+}/CaM$  [92]. Однако поскольку синтез АТР протекает значительно медленнее гидролиза, а АТР является сильным конкурентным ингибитором, эта реакция вряд ли реализуется *in vivo*.

#### КАТАЛИТИЧЕСКИЙ ДОМЕН

По результатам исследований протеолитической деградации КЛЦМ каталитический домен был локализован ближе к С-концевой части молекулы КЛЦМ. Было обнаружено, что последовательный протеолиз фермента приводит к отщеплению различных по длине N- и С-концевых частей и накоплением относительно устойчивого фрагмента размером 61 кДа. Этот фрагмент сохраняет каталитическое ядро и обладает активностью, параметры которой сопоставимы с таковыми полноразмерной КЛЦМ [101, 205]. Каталитическое ядро КЛЦМ состоит из 240 аминокислотных остатков, проявляющих высокую степень гомологии с каталитической субъединицей киназы фосфорилазы *b* и сGMP-зависимой киназы [71]. По-видимому, связывание  $Mg^{2+}$ -АТР и создание условий для переноса  $\gamma$ -фосфата АТР на модифицируемый остаток белка-субстрата требует консервативной структуры, общей для всех протеинкиназ. В каталитическом ядре КЛЦМ такой консенсусной последовательностью является Gly-X-Gly-X-X-Gly-(X)<sub>14</sub>-Lys [71, 124]. Конформация  $Mg^{2+}$ -АТР-связывающего участка не подвергается заметным перестройкам и он постоянно доступен для связывания  $Mg^{2+}$ -АТР [116, 124].

К N-концу от участка связывания  $Mg^{2+}$ -АТР был выявлен кластер, богатый кислыми остатками и высоко консервативный среди разных КЛЦМ. Мутации в этой области приводят к значительному

повышению  $K_m^{РЛЦ}$ , не влияя на  $V_{max}$  фосфорилирования РЛЦ [80, 85]. Аналогично, мутация Glu<sup>599</sup> или Glu<sup>643</sup> в каталитическом ядре *l*-КЛЦМ птиц<sup>1</sup> повышает  $K_m^{РЛЦ}$  соответственно в 35 и 100 раз [81]. Скорее всего, кислый участок к N-концу от области связывания Mg<sup>2+</sup>-АТФ взаимодействует с кластером основных остатков Lys<sup>11</sup>-Lys<sup>12</sup>-Arg<sup>13</sup> в РЛЦ. При этом происходит прочное удержание субстрата, а остатки Glu<sup>599</sup> и Glu<sup>643</sup> в каталитическом центре взаимодействуют с Arg<sup>16</sup> РЛЦ, стабилизируя фермент-субстратный комплекс и координируя перенос фосфата на Ser<sup>19</sup> РЛЦ. По-видимому, такое многоточечное взаимодействие фермента с субстратом и обеспечивает высокую субстратную специфичность КЛЦМ и скорость фосфорилирования РЛЦ миозина.

#### РЕГУЛЯТОРНЫЙ СЕГМЕНТ

Наличие регуляторного сегмента в молекуле КЛЦМ было первоначально показано с помощью ограниченного протеолиза как *sk*КЛЦМ, так и *l*-КЛЦМ. Так, деградация *l*-КЛЦМ сопровождается образованием неактивного 64 кДа фрагмента, который далее расщепляется до 61 кДа фрагмента с восстановлением киназной активности, уже не зависящей от Ca<sup>2+</sup>/CaM [46, 54, 101, 224]. Была установлена идентичность N-концевых последовательностей 64 и 61 кДа фрагментов [46, 96], что послужило основанием для локализации регуляторного сегмента *l*-КЛЦМ к С-концу от каталитического домена. Был предложен механизм деградации *l*-КЛЦМ, согласно которому на первой стадии происходит отщепление как N-концевой части, так и С-концевого домена *l*-КЛЦМ, включая CaM-связывающий участок. Образующийся 64 кДа фрагмент неактивен вне зависимости от присутствия Ca<sup>2+</sup>/CaM благодаря наличию автоингибиторной С-концевой последовательности. Дальнейший протеолиз приводит к отщеплению автоингибиторного пептида и образующийся 61 кДа фрагмент приобретает конститутивную активность [101]. Последующие исследования с применением синтетических пептидов, соответствующих определенным участкам *sk*КЛЦМ и *l*-КЛЦМ [26, 53, 114, 161], протеолитического расщепления *l*-КЛЦМ [46, 96, 101, 163] и мутационного анализа [105, 186] позволили доказать существование автоингибиторной последовательности, картировать регуляторный сегмент и сформулировать гипотезу псевдосубстратного ингибирования.

С помощью направленного мутагенеза было показано, что автоингибиторной является N-концевая часть регуляторного сегмента [31], тогда как С-концевая часть ответственна за связывание Ca<sup>2+</sup>/CaM

<sup>1</sup> В данном обзоре единая нумерация остатков *l*-КЛЦМ курицы используется для всех изоформ КЛЦМ, если не оговорено отдельно.

[53, 186]. Частично перекрываясь, эти последовательности вместе формируют регуляторный сегмент КЛЦМ. Так, в структуре *l*-КЛЦМ курицы, регуляторной является следующая последовательность:

...<sup>787</sup>SKDRMKKY**MARRKWOKTGHAVRAIGRLSS**<sup>815</sup>...,

где остатки, важные для автоингибирования выделены жирным шрифтом, Ca<sup>2+</sup>/CaM-связывающий участок подчеркнут, а остатки, принципиальные для связывания Ca<sup>2+</sup>/CaM, выделены курсивом.

Первоначально ингибиторный участок был локализован в последовательности Lys<sup>786</sup>-Arg<sup>808</sup>, поскольку Arg<sup>808</sup> был идентифицирован как С-концевой остаток неактивного CaM-нерегулируемого 64 кДа фрагмента, а Lys<sup>786</sup> — как С-концевой остаток конститутивно активного 61 кДа фрагмента [156, 163]. Кроме того, синтетические пептиды Ala<sup>783</sup>-Gly<sup>804</sup> и Ser<sup>787</sup>-Val<sup>807</sup> являются значительно более сильными конкурентными ингибиторами *l*-КЛЦМ [114, 161], чем короткие пептиды Ala<sup>783</sup>-Ala<sup>796</sup> и Arg<sup>797</sup>-Val<sup>807</sup> [53]. Наконец, киназная активность мутанта *l*-КЛЦМ, ограниченного с С-конца по остатку Trp<sup>800</sup>, существенно ниже по сравнению с активностью мутантов, ограниченных по Thr<sup>778</sup> или Lys<sup>793</sup>, а наличие Arg<sup>797</sup> и Arg<sup>798</sup> является критичным для ингибирования активности *l*-КЛЦМ [97, 99].

Анализ первичной структуры автоингибиторного участка *l*-КЛЦМ показывает, что количество и расположение основных аминокислот крайне сходно с таковым в последовательности РЛЦ, окружающей фосфорилируемый Ser<sup>19</sup>. На этом основании было сделано предположение о том, что этот участок представляет собой псевдосубстратную последовательность. Согласно модели псевдосубстратного ингибирования, автоингибиторный участок *l*-КЛЦМ взаимодействует с активным центром фермента, имитируя связывание субстрата, тогда как связывание Ca<sup>2+</sup>/CaM происходит в непосредственной близости и нарушает это взаимодействие [114, 163]. В подтверждение этой модели, в регуляторном участке были обнаружены две спиральные структуры Asp<sup>777</sup>-Lys<sup>785</sup> и Arg<sup>790</sup>-Trp<sup>800</sup>, разделенные петлей, обеспечивающей относительную подвижность каталитического домена и регуляторного сегмента *l*-КЛЦМ (рис. 3, см. цветную вкладку, стр. 387). Эта петля может служить гибким шарниром, позволяющим молекуле *l*-КЛЦМ складываться так, что С-концевая спираль взаимодействует с активным центром и ингибирует фермент. Связывание Ca<sup>2+</sup>/CaM активирует *l*-КЛЦМ благодаря отведению этой спирали в сторону от каталитического центра [20, 114].

Последующие экспериментальные данные позволили пересмотреть псевдосубстратную модель. Так, было установлено, что основные остатки КЛЦМ, являющиеся предполагаемыми аналогами субстрат-

ных детерминант РЛЦ, не критичны для автоингибирования фермента [78]. Напротив, наиболее важной для автоингибирования является область  $\text{Tyr}^{794}\text{--Met--Ala}^{796}$  *l*-КЛЦМ [207]. Более того, замена тех отрицательно заряженных остатков в каталитическом ядре *l*-КЛЦМ, которые, согласно псевдосубстратной гипотезе, должны были бы взаимодействовать с основными остатками в псевдосубстратном участке, влияла на связывание автоингибиторной последовательности, но не РЛЦ [128]. Интересно, что шесть из таких остатков консервативны и в других  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -зависимых киназах, а их мутации ослабляют связывание автоингибиторной последовательности и повышают способность  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  активировать *l*-КЛЦМ в 2–100 раз [60].

Таким образом, хотя автоингибирование участвует во внутримолекулярной регуляции активности *l*-КЛЦМ, его механизм отличен от простой мимикрии РЛЦ. Эти и другие данные по пространственной структуре комплексов  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  с  $\text{CaM}$ -связывающими пептидами *sk*КЛЦМ [77, 102] и *l*-КЛЦМ [144], позволили сформулировать более широкую концепцию о внутристерическом механизме регуляции активности КЛЦМ (*intrasteric autoregulation*). Однако несмотря на постоянный интерес и непрекращающиеся исследования в этой области, до сих пор нет полного понимания структурных аспектов этого механизма.

Активация *l*-КЛЦМ происходит при эквимольарном связывании  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  [27, 37]. Структурные элементы  $\text{CaM}$ -связывающих участков одинаковы для *sk*КЛЦМ и *l*-КЛЦМ, поскольку замена  $\text{CaM}$ -связывающего участка *sk*КЛЦМ эквивалентной последовательностью *l*-КЛЦМ не изменяет способности  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  активировать фермент [135]. Направленным мутагенезом было показано, что для прочного связывания  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  важны остатки  $\text{Arg}^{797}\text{--Lys}^{799}$  и  $\text{Gln}^{801}\text{--Lys}^{802}$  *l*-КЛЦМ [52] (см. рис. 3), а гомологичные остатки *sk*КЛЦМ выполняют ту же функцию [78]. Удаление С-концевой последовательности *l*-КЛЦМ начиная от  $\text{Ser}^{815}$  не изменяет ни связывания  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ , ни его способности регулировать активность *l*-КЛЦМ. Однако последующее удаление еще пяти С-концевых остатков полностью нарушает связывание  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  и приводит к образованию автоингибированного фрагмента, активность которого восстанавливается только путем дальнейшего протеолиза. Вместе с тем с помощью сайт-специфического мутагенеза показано, что остатки  $\text{Glu}^{811}$  и  $\text{Arg}^{812}$  важны для  $\text{CaM}$ -зависимой активации *l*-КЛЦМ, а мутации гидрофобных остатков  $\text{Gly}^{804}$ ,  $\text{Phe}^{810}$  и  $\text{Leu}^{813}$  приводят к значительному снижению или полной потере связывания  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  [16, 17].

Таким образом, область вокруг  $\text{Trp}^{800}$  имеет крайне важное регуляторное значение поскольку вовлечена как в автоингибирование

*l*-КЛЦМ, так и в связывание  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ . Интересно также, что наличие именно остатка Трр достаточно характерно для CaM-связывающих последовательностей многих белков, включая и актин-связывающий белок кальдесмон [141]. Замена Трр<sup>800</sup> *l*-КЛЦМ на ряд других остатков (Gly, Met, Leu или Тур) приводит к существенному снижению или полному ингибированию активности фермента даже в присутствии насыщающих концентраций  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  [143].

Важную регуляторную функцию может выполнять фосфорилирование внутри регуляторного сегмента КЛЦМ. Так, КЛЦМ из слизневики *Dictyostelium* гомологична *l*-КЛЦМ высших эукариот, но значительно короче и, в том числе, не содержит С-концевого KRP-домена (см. рис. 2). Этот фермент не регулируется связыванием  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ , но содержит автоингибиторную последовательность, удаление которой повышает активность КЛЦМ *Dictyostelium* в 10 раз [206]. Активация фермента достигается путем внутримолекулярного автофосфорилирования по остатку Thr<sup>289</sup>, который гомологичен остатку His<sup>805</sup> *l*-КЛЦМ, а также при фосфорилировании Thr<sup>166</sup> неизвестной киназой [188].

Гипотеза о том, что связывание  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  и автофосфорилирование активируют КЛЦМ, нарушая взаимодействие автоингибиторной последовательности с активным центром, подтверждается еще и тем, что моноклональные антитела против последовательности 808–815 *l*-КЛЦМ активируют фермент в отсутствие  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  [11]. Таким образом, прочное связывание лиганда (в качестве которого может выступать комплекс  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ , антитело или фосфат) в определенной области регуляторного сегмента *l*-КЛЦМ приводит к диссоциации автоингибиторной последовательности от каталитического центра, освобождая его для связывания субстрата [11, 18, 127]. Вполне вероятно, что отмеченная выше шарнирная петля, ограниченная остатками 785–790 *l*-КЛЦМ, а также длина спирали, расположенной к С-концу от этой петли, могут определять степень отведения автоингибиторного участка от каталитического центра. В этом случае регуляторный сегмент должен обладать определенной жесткостью. Действительно, мутация Ala<sup>806</sup> > Pro приводит к стерическому излому первичной структуры и существенному подавлению связывания CaM [158].

Связывание  $\text{Ca}^{2+}$  с CaM абсолютно необходимо для активации КЛЦМ, а сродство  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  к *l*-КЛЦМ очень высоко и составляет 1 нМ [9, 27, 106]. При этом ассоциация  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  с КЛЦМ происходит значительно быстрее ( $k_{on}$  меньше 0,002 s<sup>-1</sup>), чем диссоциация ( $k_{off} = 0,03$  s<sup>-1</sup>), которая возрастает в 100 раз при потере последним ионов  $\text{Ca}^{2+}$  [106, 107]. Ряд исследований показал сложный и, возможно, ступенчатый механизм этих взаимодействий. Кроме того, что формирование комплекса требует конформационных изменений в обоих

белках, исследование структуры кристалла комплекса  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  с CaM-связывающим пептидом КЛЦМ также выявило нетривиальность этого взаимодействия (см. ниже).

В молекуле кальмодулина длинная центральная спираль пространственно разделяет два концевых глобулярных домена, каждый из которых содержит два  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих участка EF-типа и вступает во взаимодействие с КЛЦМ. При этом, N-концевой домен содержит участки низкого сродства, тогда как С-концевой домен связывает  $\text{Ca}^{2+}$  с высоким сродством. Таким образом, при изменении концентраций  $\text{Ca}^{2+}$  в физиологических диапазонах насыщение CaM ионами  $\text{Ca}^{2+}$  и его связывание с КЛЦМ может происходить в два этапа. Более того, как показывает расчет, в нестимулированных клетках до 50–80% CaM может постоянно содержать  $\text{Ca}^{2+}$  в С-концевых  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих участках и, таким образом, быть практически постоянно связанным с КЛЦМ своим С-концевым доменом [107]. Такого взаимодействия, однако, недостаточно для активации КЛЦМ, которая требует насыщения ионами  $\text{Ca}^{2+}$  N-концевого домена CaM и его последующего связывания с КЛЦМ.

С-концевой домен CaM взаимодействует с *l*-КЛЦМ электростатически [218], что замедляет диссоциацию  $\text{Ca}^{2+}$  из CaM [111]. В системе, содержащей  $\text{Ca}^{2+}$ , CaM и *l*-КЛЦМ, все взаимодействия компонентов происходят кооперативно. При этом, степень кооперативности зависит от концентраций компонентов, а также от наличия субстрата *l*-КЛЦМ – РЛЦ [157]. Экспериментально показано, что связывание РЛЦ вызывает переориентацию  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  по отношению к *l*-КЛЦМ, приводя к компактизации структуры *l*-КЛЦМ и усилению связывания N-концевого домена CaM с *l*-КЛЦМ [129]. Можно считать, что аналогичные изменения конформации белкового комплекса могут происходить и в обратной последовательности при активации фосфорилирования РЛЦ. Другими словами, связывание С-концевого домена CaM с КЛЦМ возможно при низкой  $[\text{Ca}^{2+}]$ , тогда как повышение уровня  $\text{Ca}^{2+}$  приводит к усилению кооперативных взаимодействий между  $\text{Ca}^{2+}$  и CaM, CaM и КЛЦМ, последующей ассоциации N-концевого домена CaM с КЛЦМ, изомеризации молекулы КЛЦМ с освобождением активного центра, связыванию и фосфорилированию РЛЦ.

Описанная гипотеза имеет экспериментальные подтверждения в двух отношениях. Во-первых, кинетический анализ взаимодействия изолированных С- и N-концевых доменов CaM с КЛЦМ действительно показывает их последовательное связывание, причем С-концевой домен связывается первым [168]. Во-вторых, простого связывания CaM оказывается недостаточно для активации КЛЦМ, так как

замена четырех остатков Met на Leu в CaM не изменяет сродства, но снижает способность такого мутанта активировать *l*-КЛЦМ [47]. Определенные мутации в регуляторном участке *l*-КЛЦМ также приводят к появлению конститутивно активного фермента, но не изменяют связывания Ca<sup>2+</sup>/CaM [186]. Хотя N-конец CaM не критичен для образования комплекса CaM с пептидом, соответствующим CaM-связывающей области *l*-КЛЦМ, способность CaM активировать *l*-КЛЦМ зависит от наличия кислых N-концевых остатков Glu<sup>6</sup>-Glu-Glu<sup>8</sup> [164]. Аналогично, мутант CaM с удаленными остатками 2-8 связывается, но не активирует *sk*КЛЦМ [126, 164]. Наконец, N-конец CaM играет существенную роль в его ориентации относительно каталитического центра целой молекулы *l*-КЛЦМ [126].

Таким образом, специфические межбелковые контакты и их правильная ориентация относительно друг друга могут играть важную роль в активации КЛЦМ. Локализованные изменения элементарных взаимодействий могут не находить существенного отражения в таких измеряемых стандартными биохимическими методами параметрах связывания, как сродство, стехиометрия и даже скорость ассоциации-диссоциации компонентов белкового комплекса. Как следствие, любые интервенции в субмолекулярную структуру компонентов таких комплексов с помощью молекулярно-биологических и биохимических модификаций могут давать весьма неожиданные результаты и приводить к неадекватным интерпретациям при отсутствии четкого понимания структурных основ взаимодействия.

Получение кристаллов комплекса Ca<sup>2+</sup>/CaM с CaM-связывающим пептидом *l*-КЛЦМ позволило установить молекулярную структуру этого комплекса с высоким разрешением и выявить роль отдельных остатков КЛЦМ в связывании Ca<sup>2+</sup>/CaM [102, 144]. Шарнирная петля разделяет центральную спираль молекулы CaM на две части (остатки 65–93 и 74–82), обеспечивая относительную подвижность концевых глобулярных доменов CaM. Связывая пептид *l*-КЛЦМ, Ca<sup>2+</sup>/CaM значительно изменяет конформацию, складывается и обвивает одиночную  $\alpha$ -спираль пептида так, что формирует туннель, в котором пептид располагается в антипараллельной ориентации, т.е. С-концевой домен CaM связывает N-конец пептида, а N-концевой домен CaM взаимодействует с С-концом пептида. Между CaM и пептидом образуется около 185 контактов, но два гидрофобных остатка CaM-связывающего пептида *l*-КЛЦМ (Trp<sup>800</sup> и Leu<sup>813</sup>) играют принципиальную якорную роль. Более того, одна сторона туннеля, образованного CaM, выстлана гидрофобными остатками, которые взаимодействуют с гидрофобной стороной  $\alpha$ -спирального пептида. Положительно заряженные остатки другой стороны пептида обра-

зуют множественные солевые мостики с противоположной стороной туннеля, формируемой С-концевым доменом СаМ [144]. Жесткость  $\alpha$ -спирали СаМ-связывающего пептида имеет важное значение и ее нарушение мутацией Ala<sup>806</sup> > Pro приводит к существенному снижению связывания СаМ [158].

Эти структурные данные и описанная выше последовательность взаимодействия С- и N-концевых доменов СаМ с КЛЦМ позволяют предложить следующую модель активации КЛЦМ. Регуляторный сегмент КЛЦМ загнут в сторону каталитического ядра так, что его N-концевой домен расположен дистально по отношению к активному центру фермента и сначала связывает С-концевой домен Са<sup>2+</sup>/СаМ за счет электростатических взаимодействий. Повышение уровня Са<sup>2+</sup> сопровождается насыщением N-концевых Са<sup>2+</sup>-связывающих участков СаМ и экспонированием гидрофобных остатков в N-концевом домене СаМ. Это позволяет установление гидрофобных контактов и обеспечивает кооперативность процесса. Складываясь, молекула СаМ обвивает регуляторный сегмент вдоль по направлению к его С-концу, наиболее приближенному к активному центру КЛЦМ и, тем самым, блокирует взаимодействие автоингибиторной последовательности КЛЦМ с активным центром, отводя ее в сторону. Вполне вероятно, что в пространстве и времени этот процесс напоминает застегивание молнии, где Са<sup>2+</sup> играет роль поводка, а скорость процесса обеспечивается описанной выше кооперативностью взаимодействий внутри этого белкового комплекса.

#### УЧАСТКИ СВЯЗЫВАНИЯ АКТИНА И МИОЗИНА

КЛЦМ взаимодействует с актином *in vitro* и *in vivo*. Средство изолированной I-КЛЦМ к F-актину составляет 0,5–1  $\mu$ М, а стехиометрия связывания – 1 моль на 12–13 моль актина [237], что соответствует связыванию одной молекулы I-КЛЦМ на полный оборот спирали актинового филамента. Средство I-КЛЦМ к актин-тропомиозину выше в 2–3 раза, хотя прямого взаимодействия I-КЛЦМ с тропомиозином не показано. По-видимому, связывание тропомиозина приводит к конформационным перестройкам или стабилизации F-актина, усиливая связывание I-КЛЦМ. В клетках I-КЛЦМ также локализуется с актин-содержащими миофиламентами [42, 136, 237].

Работы с использованием изолированных рекомбинантных фрагментов и делеционных мутантов I-КЛЦМ, экспрессированных в клетках, убедительно доказывают, что актин-связывающий участок I-КЛЦМ расположен непосредственно в N-конце молекулы, в пределах первых 63 остатков [61, 110, 190, 191, 239]. Этот участок крайне консервативен (>95%) среди различных I-MLCK. Последова-

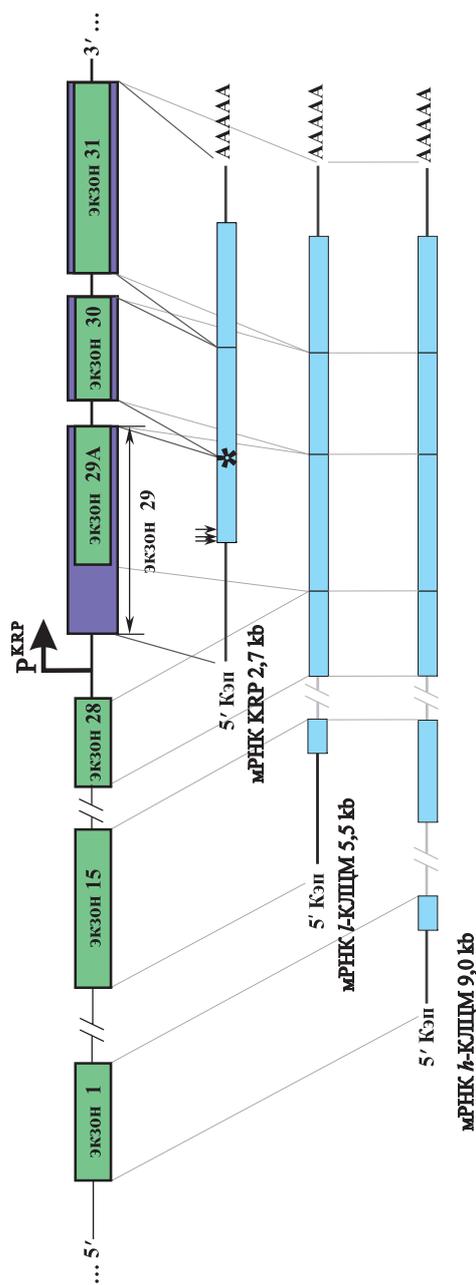


Рис. 1. Структурная организация и транскрипты генетического локуса КЛЦМ.

Представлена часть экзонов локуса КЛЦМ и схема кодирования трех семейств мРНК размером 9,0, 5,5 и 2,7 kb и соответствующих h-KLRB, h-KLRB и KLRB (кодирующие участки мРНК выделены голубым цветом). Независимый промотор (P<sup>KLRB</sup>) расположен в интроне КЛЦМ, разделяющем экзоны 28 и 29. Экзоны, кодирующие KLRB обозначены фиолетовым цветом. мРНК h-KLRB и h-KLRB используют меньший экзон 29A вместо экзона 29. Альтернативный сплайсинг пре-мРНК KLRB определяет два вида мРНК, только одна из которых содержит единственный дополнительный кодон в начале второго экзона (отмечен звездочкой). Для всех мРНК показаны 5'- и 3'-некодирующие сигнальные последовательности, содержащие участки экзирования и полиаденилирования. Стрелками обозначены альтернативные участки инициации трансляции KLRB. Подробности в тексте.

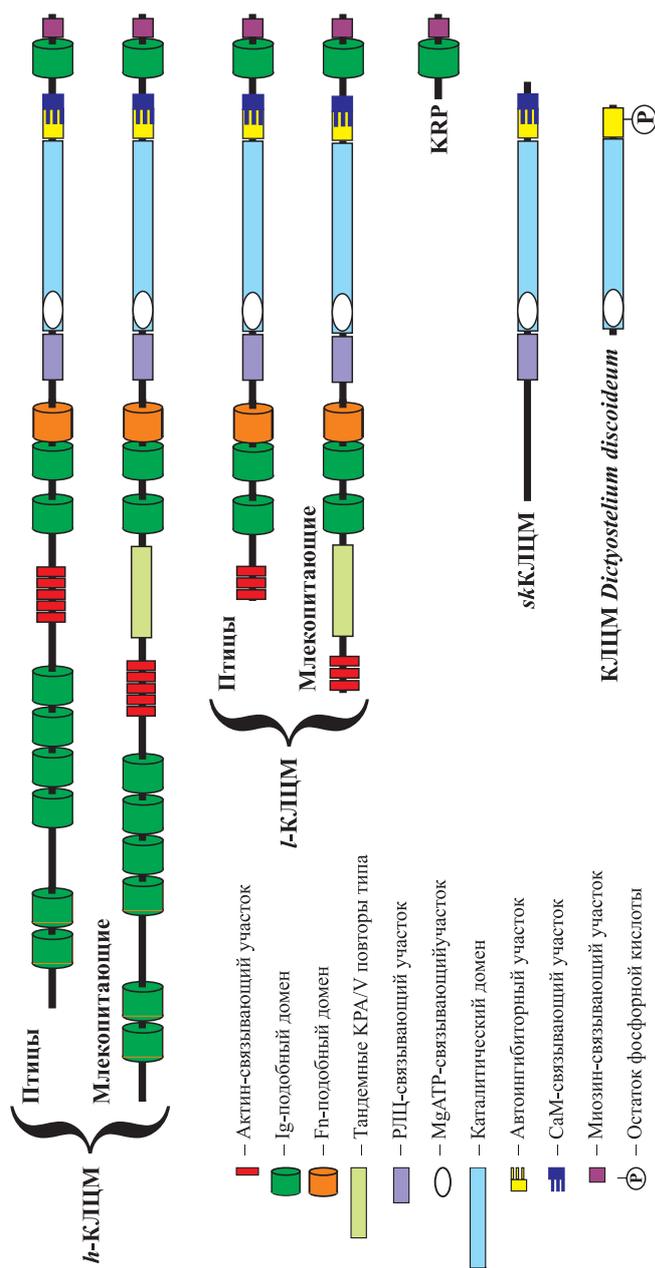


Рис. 2. Доменная организация КЛЦМ и KRP.

Представлена сравнительная доменная организация белковых продуктов генетического локуса КЛЦМ птиц и млекопитающих, а также структуры sKLCM и КЛЦМ *Dicyostelium*. Условные обозначения структурных элементов приведены слева. h-KLCM включает всю последовательность I-KLCM, а также уникальную N-концевую последовательность. С-концевая часть обоих КЛЦМ экспрессируется независимо как белок KRP, включающий Ig-подобный домен и миозин-связывающий участок.

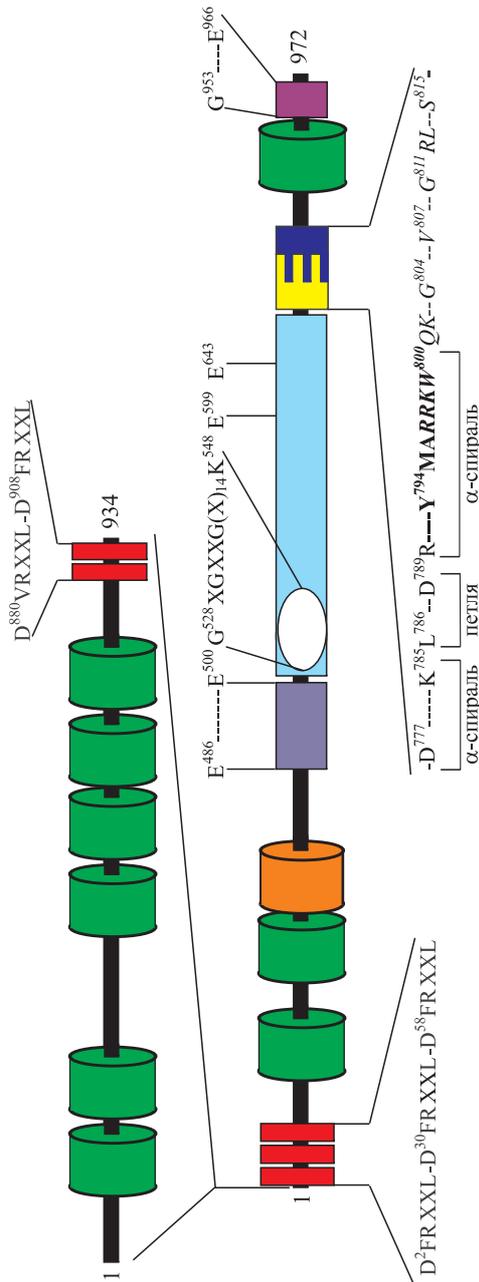


Рис. 3. Распределение функционально важных последовательностей в КЛЦМ.

Нумерация остатков приведена по структуре /-КЛЦМ курицы, включающей 972 остатка. Дополнительная N-концевая последовательность h-КЛЦМ приведена в верхней части рисунка и имеет независимую нумерацию. Условные обозначения структурных элементов идентичны приведенным на рис. 2. Размер каждого из Ig- и Fn-подобных доменов составляет около 100 аминокислотных остатков. Отдельно показано расположение DFRXXL-мотивов, ответственных за связывание КЛЦМ с актином, АТР-связывающей последовательности G<sup>528</sup>-K<sup>548</sup> в каталитическом центре (остатки 516–762), последовательности E<sup>486</sup>-E<sup>500</sup> и кислых остатков E<sup>599</sup> и E<sup>643</sup>, важных для связывания РЛЦ миозина, а также элементов регуляторного сегмента (остатки 777–815). Остатки, важные для аутоингибирования и связывания CaM выделены, соответственно, жирным шрифтом и курсивом. В регуляторном сегменте α-спираль D<sup>777</sup>-K<sup>785</sup> с C-концевой петлей L<sup>786</sup>-D<sup>789</sup> отделяет аутоингибиторную α-спираль R<sup>791</sup>-W<sup>800</sup> от каталитического центра. Кислая последовательность G<sup>953</sup>-E<sup>966</sup> составляет основной миозин-связывающий участок в KRP-домене КЛЦМ. Подробности в тексте.

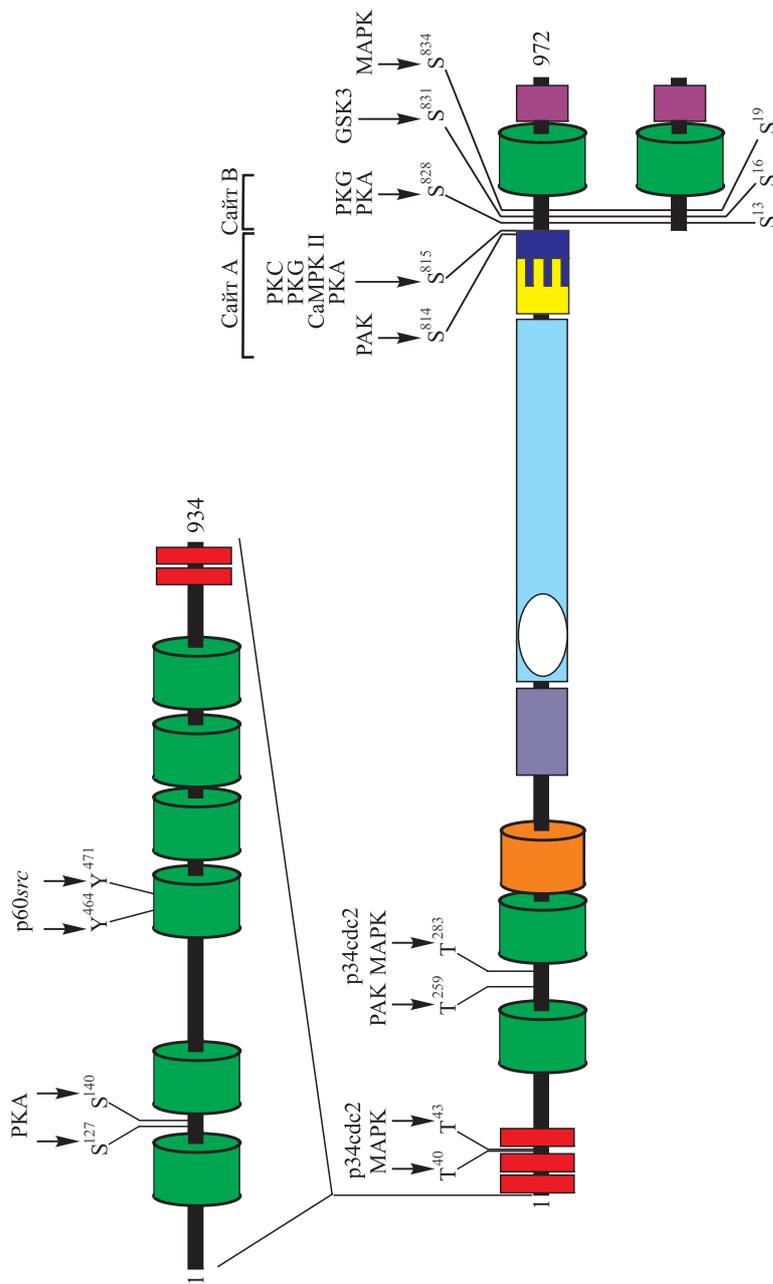


Рис. 4. Распределение фосфорилируемых остатков в КЛЦМ. Пояснения см. в тексте. GSK3, киназа гликогенсинтазы 3 типа; MARK, MAP-киназа.

тельности 2–7, 30–35 и 58–63 представляют собой три мотива Asp-Phe-Arg-X-X-Leu, формирующих контакты с актином (рис. 3). Как и для актин-связывающих участков некоторых других белков, например, кальдесмона, для этой последовательности характерно наличие ароматического остатка, в данном случае, фенилаланина. Направленная замена любого из этих мотивов на остатки Ala существенно понижает, а замена двух мотивов полностью подавляет связывание *I*-КЛЦМ с актином [190, 191]. Анализ кругового дихроизма показал линейную ориентацию актин-связывающего домена *I*-КЛЦМ и расчетное расстояние между Asp-Phe-Arg-X-X-Leu мотивами составило 12 нм, что сопоставимо со средним радиусом мономера актина (9, 0–9,5 нм). На основании этих данных была предложена гипотеза, согласно которой N-концевой участок *I*-КЛЦМ взаимодействует с актиновым филаментом продольно и каждый Asp-Phe-Arg-X-X-Leu мотив связывается с отдельным мономером актина [190]. Возможно, именно такое связывание обеспечивает более прочное взаимодействие КЛЦМ с нативными миофиламентами по сравнению с реконструированным F-актином [136].

Если *I*-КЛЦМ связывается с несколькими мономерами актина одновременно, то возникает вопрос о стерических возможностях этого взаимодействия, если тонкий филамент декорирован другими актин-связывающими белками. Ответ на этот вопрос был получен с помощью трехмерной реконструкции электронномикроскопических изображений комплекса 147-членного N-концевого фрагмента *I*-КЛЦМ с филаментами актина [74]. Оказалось, что этот фрагмент связывается в области актина, определенно отличной от областей связывания тропомиозина, кальдесмона, кальпонины и головок миозина. Более того, карты электронной плотности показывают, что во взаимодействие вовлечены два соседних мономера актина. Поскольку этот метод не позволяет определить отрезок филамента актина, перекрываемый одной молекулой фрагмента, то эти данные не только не противоречат, но и отчасти подтверждают гипотезу о продольном связывании *I*-КЛЦМ с актином [136]. Еще одним подтверждением такой гипотезы является способность *I*-КЛЦМ сшивать актиновые филаменты и собирать их в толстые пучки *in vitro* [76, 239]. Вероятно, это является результатом взаимодействия актин-связывающих центров *I*-КЛЦМ с мономерами актина, расположенными в разных филаментах.

Взаимодействие *I*-КЛЦМ с миозином не ограничивается только связыванием РЛЦ как субстрата в процессе катализа. Было обнаружено, что препараты гладкомышечного миозина содержат прочно связанную *I*-КЛЦМ, диссоциация которой достигается при переходе

миозина в сложенную 10S-конформацию. Кроме того связывание *I*-КЛЦМ ослабляется при фосфорилировании миозина [36].

Если РЛЦ-связывающий участок локализован в каталитическом центре фермента, то участок некаталитического взаимодействия расположен в С-концевом КРР-домене КЛЦМ [185, 187], который экспрессируется в гладкой мускулатуре и сердце как индивидуальный белок. Поскольку константы связывания как *I*-КЛЦМ [184], так и КРР [187] с миозином составляют около 5  $\mu$ М, КРР можно использовать для характеристики этого взаимодействия *in vitro*. Делеция различных по длине N- и С-концевых последовательностей КРР приводит к градуальному уменьшению сродства КРР к миозину, но наиболее существенными являются 20 С-концевых, преимущественно, отрицательно заряженных остатков, удаление которых приводит к снижению сродства почти на порядок [187]. Таким образом, хотя весь Ig-домен КРР вовлечен в связывание миозина, высокое сродство этого взаимодействия обеспечивает его уникальная С-концевая последовательность, гомологичная Gly<sup>953</sup>-Asp<sup>966</sup> *I*-КЛЦМ птиц (рис. 2 и 3).

Отличительной особенностью связывания КРР и, по всей вероятности, *I*-КЛЦМ с миозином является их взаимодействие только с нефосфорилированными гладкомышечным и немышечным миозинами [185]. Ни фосфорилированный по Ser<sup>19</sup> миозин, ни миозин поперечнополосатых мышц не способны связывать КРР или С-концевой домен *I*-КЛЦМ. Стехиометрия взаимодействия составляет 1:1 [185], а участок связывания КРР расположен в области шейки миозина, т.е. в зоне раздвоения тяжелых цепей и в непосредственной близости от участка связывания РЛЦ [142, 152, 187]. Скорее всего, именно этим объясняется негативный эффект фосфорилирования РЛЦ на связывание КРР и *I*-КЛЦМ.

С-концевой домен, скорее всего, выполняет функцию координации активного центра *I*-КЛЦМ по отношению к одной из РЛЦ, с чем связана вышеупомянутая организованность процесса фосфорилирования миозина. Интересна организация миозин-связывающей последовательности КРР-домена: она преимущественно образована чередующимися остатками Gly и Glu. Принимая во внимание взаимное отталкивание боковых групп остатков Glu и то, что присутствие остатка Gly значительно повышает свободу вращения вокруг пептидной связи, можно предположить, что этот участок молекулы *I*-КЛЦМ имеет вытянутую структуру. Возможно, взаимодействие этой структуры с положительно заряженным кластером на тяжелой цепи вблизи участка связывания РЛЦ и обеспечивает удержание *I*-КЛЦМ на миозине.

Другой функцией KRP-домена *l*-КЛЦМ может быть выполнение роли мостика, соединяющего филаменты актина и дефосфорилированного миозина. Так, *l*-КЛЦМ может «сшивать» актин с миозином и тормозить АТФ-зависимое движение актиновых филаментов по фиксированному на стекле гладкомышечному миозину в системе искусственных нитей (*in vitro* motility assay) [122, 154, 239]. Важную роль в этом ингибировании играл именно актин-связывающий участок *l*-КЛЦМ [122, 239], тогда как взаимодействие с фосфорилированным миозином опосредовал каталитический домен *l*-КЛЦМ [154]. Таким образом, если KRP-домен связывает *l*-КЛЦМ с нефосфорилированным миозином, то в случае фосфорилированного миозина главную роль играет взаимодействие РЛЦ-связывающего участка *l*-КЛЦМ.

Отмечено, что  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  ингибирует связывание *l*-КЛЦМ с актином и миозином [184], а также ослабляет ингибиторный эффект *l*-КЛЦМ на движение актина вдоль миозина [239]. Аналогичное действие оказывает  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  и на способность *l*-КЛЦМ пучковать актин [76]. Однако вероятнее всего, эти эффекты характерны для условий *in vitro*, поскольку  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  не вызывает диссоциации *l*-КЛЦМ от филаментов в клетках [136]. Таким образом, *l*-КЛЦМ может взаимодействовать с филаментами актина независимо от других актин-связывающих белков и ее диссоциация не является необходимой для фосфорилирования миозина *in vivo*.

#### ПОВТОРЯЮЩИЕСЯ СТРУКТУРНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ

Анализ структуры *l*-КЛЦМ разных видов показывает их крайне сходную доменную организацию и высокую гомологию (рис. 2). В то же время, КЛЦМ существенно различаются по молекулярной массе. Это обусловлено наличием или отсутствием двух типов tandemных повторов, разных по длине и расположенных в N-концевой части молекул КЛЦМ. Под термином «tandемный повтор» принято понимать последовательность, которая содержит два четко выделяемых консервативных элемента (tandем) и повторяется некоторое количество раз. Непосредственно в N-конце *l*-КЛЦМ располагаются три 28-членных tandemных повтора, включающих актин-связывающие участки. Сразу вслед за ними начинаются tandemные KRV/A-повторы, состоящие из 12 остатков. Tandемные повторы этого типа пока найдены только у КЛЦМ млекопитающих и отсутствуют в КЛЦМ птиц. Различия в величине молекул *l*-КЛЦМ разных видов объясняются наличием разного числа именно этих повторов.

В первичной структуре N-концевых повторов действительно консервативны только остатки Asp-Phe-Arg-X-X-Leu, вовлеченные в связывание актина [191]. Что касается остальной части тандема, то ее консервативность выражена довольно слабо. В то же время, необходимо отметить наличие трех областей, богатых остатками Pro, Arg/Lys и Thr (последовательности приведены по структуре *l*-КЛЦМ кролика):

- (1) Val-Lys-Pro-Lys-Thr-Val<sup>16</sup>
- (2) Thr-Pro-Lys-Thr-Pro-Val-Pro<sup>46</sup>
- (3) Pro-Pro-Pro-Lys-Pro-Ala-Thr-Pro<sup>57</sup>

В настоящее время функция этих последовательностей неясна, однако, можно сделать интересные наблюдения и предположения. Во-первых, остатки Pro как правило определяют специфические особенности вторичной структуры полипептидов. Они часто входят в состав консенсусных последовательностей, узнаваемых молекулами сигнальных белков, содержащих модульные домены SH<sub>3</sub>, WW, EVH1 и др. В их числе недавно описаны несколько типов WW-доменов, связывание которых очень чувствительно к положению и/или ориентации остатка Pro [103, 201]. Так, структура (3) полностью отвечает консенсусным требованиям для связывания с WW-доменами III типа. Возможно, существуют и другие модульные структуры, способные взаимодействовать с этими последовательностями, модулировать связывание КЛЦМ с актином и переопределять внутриклеточное расположение КЛЦМ. С этой точки зрения интересно первое сообщение о возможной роли этих последовательностей во взаимодействии *l*-КЛЦМ и *h*-КЛЦМ с актин-связывающим белком кортактином, которое еще более усиливается при фосфорилировании кортактина по остаткам Туг [44]. Поскольку кортактин локализуется в ламеллоподиях и вовлечен в процессы перестройки кортикального цитоскелета [227], он может служить для приведения КЛЦМ в примембранную область для участия, например, в регуляции динамики стресс-фибрилл при адгезии и миграции клеток.

Во-вторых, последовательности (2) и (3) содержат остатки Thr, потенциально узнаваемые пролин-направленными киназами (т.е., MAP-киназами, p34<sup>cdc2</sup> циклин-зависимой киназой и др.). Более того, MAP-киназа действительно фосфорилирует Thr<sup>43</sup> и, возможно, Thr<sup>40</sup> *l*-КЛЦМ<sup>2</sup>. В 1996 году были впервые описаны белки, содержащие WW-домены IV типа, которые специфически связывают остатки, фосфорилированные пролин-направленными киназами [137]. Возможно, фосфорилирование КЛЦМ в пределах последовательности (2) может выполнять сходную функцию и обеспечивать ее внутри-

<sup>2</sup> Хапчаев А.Ю., Воротников А.В., неопубликованные данные.

клеточную локализацию или регуляцию в процессе клеточного цикла (см. раздел «Фосфорилирование»).

В-третьих, в связи со множеством выполняемых КЛЦМ внутриклеточных функций, сама идея о наличии модульных структур в этом белке приобретает большое значение. Недавно было показано, что одна из изоформ *h*-КЛЦМ способна фосфорилироваться *in vitro* *Src*-киназой по остатку тирозина и высказано предположение, что такое фосфорилирование может играть роль в компарментализованной внутриклеточной активации *h*-КЛЦМ [23]. Анализ первичной структуры *l*-КЛЦМ также позволяет выявить дополнительные участки потенциального взаимодействия с модульными доменами других белков. К ним относятся последовательности Pro-Lys-Thr-Pro, гомологичные представленной выше в структуре (2) и расположенные с N-конца от второго и третьего иммуноглобулин-подобных повторов *l*-КЛЦМ (см. ниже). Эти участки фосфорилируются пролин-направленными протеинкиназами [1, 146] и, следовательно, могут быть мишенями белков, содержащих WW домены IV типа. Кроме того, в *l*-КЛЦМ птиц, в отличие от белка млекопитающих, присутствуют другие участки потенциального узнавания модульными доменами. Они расположены в короткой области, заменяющей тандемные KPV/A-повторы в КЛЦМ млекопитающих, и представлены участками RAKKPV<sup>103</sup> и KRTPPP<sup>144</sup>, тогда как гомологичными последовательностями в КЛЦМ млекопитающих являются NEKPP и ETLKPV, соответственно.

Таким образом, с нашей точки зрения, повторяющиеся N-концевые последовательности КЛЦМ вряд ли можно рассматривать как тандемные. Скорее всего, они содержат гомологичные участки связывания актина, между которыми, как мы предполагаем, расположены области связывания модульных доменов сигнальных или скаффолдинговых белков (т.е., составляющих каркас для сборки белковых комплексов). Однако эта гипотеза нуждается в экспериментальном подтверждении.

**KPV/A-повторы** содержат 12-аминокислотный модуль TLKPVGNIKPAE, последовательно повторяющийся несколько раз. Так, *l*-КЛЦМ кролика содержит 18 таких повторов [59], человека – 5 [173], а быка – 20 [121]. Интересно, что этот модуль и его субповтор (KPV/A) также обнаруживаются и в других белках, некоторые из которых взаимодействуют с хроматиновыми структурами [59].

Функции KPV/A-повторов до сих пор неизвестны. В их структуре выявляется некоторое сходство (но не гомология) с недавно описанными PPAK участками саркомерного белка титина, консенсусной особенностью которых является наличие нескольких KVP и KPV

повторов. РРАК последовательности входят кластерами в состав так называемого РЕVK домена титина (т.е., богатого остатками Pro, Glu, Val и Lys), где они, по-видимому, разделены спирализованными поли-Glu сегментами [68]. Ни вторичная, ни пространственная структуры РЕVK доменов в настоящее время не установлены, но известно, что эти домены являются пружинными элементами саркомеров и обеспечивают их пассивный тонус [69, 215]. Так, гигантская молекула титина (длиной до 1  $\mu\text{m}$  и весом около 3000 кДа) располагается вдоль саркомера, закрепляясь одним концом к Z-дису, а другим концом к середине миозиновых филаментов. Две молекулы титина перекрывают саркомер, направляясь друг к другу с противоположных сторон и встречаясь в М-линии. При растяжении саркомера, молекулы титина пружинообразно растягиваются за счет расплетания РЕVK домена, примыкающего к Z-линии, не допуская неравномерного натяжения полусаркомеров. Именно наличие большого количества остатков Pro и обеспечивает, по-видимому, такое обратимое расплетание.

Можно предполагать, что подобным свойством обладают и тандемные KPV/A-повторы в *l*-КЛЦМ. В пользу такой гипотезы свидетельствует поразительное сходство этих двух функционально различных белков. И титин, и КЛЦМ взаимодействуют с актином и миозином различными концами молекул, обладают протеинкиназной активностью, а также несут и другие общие структурные элементы. Таковыми являются иммуноглобулин-подобные (Ig-) и фибронектин-подобные (FN-) домены, гомологичные СН2-домену иммуноглобулинов и домену III типа фибронектина, соответственно. Более того, одной из функций Ig-доменов титина также является обратимое расплетание при удлинении саркомера свыше нормы и/или при длительной силовой нагрузке [145].

FN- и Ig-домены расположены вокруг каталитического и регуляторного сегментов *l*-КЛЦМ и *h*-КЛЦМ (рис. 2). Другими используемыми для них названиями они обязаны структурной гомологии с твитчином, продуктом гена *unc-22 Caenorhabditis elegans*, и прожектином из *Drosophila*, которые также являются гомологами титина. В связи с этим, FN- и Ig-домены получили название *uncI* и *uncII*, соответственно [156]. Именно С-концевой Ig-домен *l*-КЛЦМ, а соответственно и *h*-КЛЦМ, независимо экспрессируется с генетического локуса КЛЦМ как белок KRP [33, 58].

FN- и Ig-домены обнаружены также во внеклеточной части ряда мембранных рецепторов и белков, взаимодействующих с компонентами внеклеточного матрикса [186], где их роль недостаточно выяснена. Учитывая обратимость рефолдинга Ig-доменов, можно предположить, что они выполняют сходную внеклеточную функцию. Так,

физически изменяя длину связи с матриксом, эти домены могут позволять клетке удерживать адгезивные контакты при незначительных перемещениях и флуктуациях мембран, разрывая контакт только при возникновении значительной силовой нагрузки.

Весьма заманчиво предположить, что Ig-домены, также как и тандемные KPV/A-повторы, играют аналогичную роль и в КЛЦМ. Если КЛЦМ одновременно взаимодействует с филаментами актина и миозина противоположными концами молекулы, то перемещение этих филаментов относительно друг друга при сокращении или движении клетки должно неизбежно приводить к напряжению сдвига и отрыву одного из концов КЛЦМ, если ее молекула ригидна и не обладает способностью к растяжению. Аналогично титину и внеклеточным Ig-доменам, тандемные KPV/A-повторы и Ig-домены могли бы обеспечивать возможность дискретного растяжения КЛЦМ в зависимости от приложенной нагрузки при перемещении филаментов актина и миозина вдоль друг друга.

Интересно, что *sk*КЛЦМ не содержит ни тандемных повторов, ни Ig- и FN-доменов (рис. 2). Возможно, это как раз связано с отсутствием актин- и миозин-связывающих участков в этой форме КЛЦМ. По всей видимости, *sk*КЛЦМ фосфорилирует РЛЦ миозина из раствора, что снижает эффективность этого процесса. Действительно, фосфорилирование РЛЦ миозина не является ключевым для сокращения поперечнополосатой мускулатуры и происходит только в условиях гиперстимуляции, выполняя модуляторную функцию [203].

Альтернативно, способность Ig-доменов к рефолдингу может не играть существенной роли в *l*-КЛЦМ/*h*-КЛЦМ и их наличие может быть эволюционно рудиментарным или предназначенным для других, пока неизвестных целей. Так, С-концевой KRP-домен этих белков практически целиком состоит из Ig-домена и отвечает за связывание с миозином гладких мышц [185]. В то же время, миозин-связывающая активность может быть обусловлена уникальной С-концевой последовательностью KRP-домена [187], поскольку для внутренних Ig-доменов КЛЦМ она пока не показана. В то же время, необходимо отметить, что в титине и С-белке из поперечнополосатых мышц функцией Ig-доменов также может быть взаимодействие с миозином и/или ассоциированными с ним белками, важное для структурной организации миозиновых филаментов [69].

#### МОДЕЛЬ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ КЛЦМ В КЛЕТКЕ

Содержание *l*-КЛЦМ варьирует в фазных и тонических гладких мышцах и составляет от 1,6 до 4,6  $\mu\text{M}$  [10]. Поскольку содержание миозина составляет до 80  $\mu\text{M}$ , то на одну молекулу *l*-КЛЦМ прихо-

дится более 20 молекул миозина. Очевидно, что при активации сокращения одна молекула *l*-КЛЦМ должна фосфорилировать несколько головок миозина для достижения физиологически значимого уровня фосфорилирования миозина. Так как КЛЦМ закреплена N-концом на филаменте актина, а ее субстрат также иммобилизован в филаментных структурах, можно предположить, что фосфорилирование миозина происходит по механизму циклического твердофазного катализа. В отсутствие  $Ca^{2+}/CaM$ , молекула *l*-КЛЦМ находится в неактивной «сложенной» конформации так, что ее C-концевая часть обращена к N-концу, обеспечивая связывание автоингибиторной последовательности с каталитическим центром и внутримолекулярное ингибирование КЛЦМ. Связывание  $Ca^{2+}/CaM$  разворачивает и активирует КЛЦМ. Молекула *l*-КЛЦМ может перекрывать расстояние между филаментами актина и миозина, которое составляет *in vivo* около 15 нм [158], и взаимодействовать с противоположащей ей молекулой миозина своим KRP-доменом. Такое взаимодействие увеличивает эффективность фосфорилирования РЛЦ, однако, после этого каталитический и KRP-домены диссоциируют от фосфорилированного миозина [185]. Продвижение миозинового филамента относительно актинового приводит головку следующей молекулы миозина к КЛЦМ для фосфорилирования, и цикл повторяется. Такой механизм мог бы объяснить относительно быстрое и прогрессивное увеличение степени фосфорилирования миозина при активации сокращения гладких мышц. Таким образом, диссоциация киназы от уже фосфорилированного миозина и модификация следующей головки не менее важна, чем активация КЛЦМ комплексом  $Ca^{2+}/CaM$ . Процессы диссоциации-ассоциации КЛЦМ, скорее всего, регулируются дополнительно, и наличие KRP или фосфорилирование КЛЦМ другими протеинкиназами может вносить существенный вклад.

В немышечных клетках только часть актина и миозина II типа образуют актомиозин, тогда как до 50% миозина может находиться в мономерной (растворимой) форме, а существенная часть актина формирует кортикальный цитоскелет, не содержащий миозина. Поэтому предложенный выше механизм функционирования КЛЦМ реализуется, скорее всего, в структурированном актомиозине, а активация мономерного миозина осуществляется КЛЦМ из раствора или другими киназами (см. раздел VIII). В силу небольших размеров и внутриклеточной дисперсии, актомиозин обычно не генерирует тотального поляризованного сокращения в немышечных клетках, но участвует в их локомоции и обеспечивает локальные формы подвижности, такие как цитокинез, эндоцитоз, экпирование рецепторов и др.

## V. *h*-КЛЦМ

*h*-КЛЦМ включает всю последовательность *l*-КЛЦМ и содержит дополнительную N-концевую часть, составляющую около половины массы этого белка (рис. 2). Как следствие такой структурной организации, *h*-КЛЦМ должна обладать всеми свойствами *l*-КЛЦМ и иметь новые свойства, отсутствующие у последней.

В библиотеке кДНК эндотелия человека обнаружены четыре вида кДНК *h*-КЛЦМ, кодирующих изоформы КЛЦМ2, 3а, 3b и 4, которые являются результатом альтернативного сплайсинга пре-мРНК. В КЛЦМ3а отсутствует экзон 28, в КЛЦМ3b – экзоны 9 и 28, а КЛЦМ4 не содержит экзона 25. Однако в тканях и клетках человека обнаружены лишь два белковых продукта: полноразмерная *h*-КЛЦМ1 и доминирующая изоформа *h*-КЛЦМ2 с делецией экзона 9. Этот экзон кодирует 69-членную последовательность, содержащую консенсусные участки фосфорилирования тирозинкиназой p60<sup>src</sup> [133].

В структуре уникальной N-концевой последовательности *h*-КЛЦМ идентифицировано шесть Ig-подобных доменов СН2 типа, разделенных короткими и, вероятно, гибкими звеньями [133, 225]. Роль этих доменов в *h*-КЛЦМ окончательно не выяснена, однако, возможно, они формируют структурную основу функциональных доменов *h*-КЛЦМ. В С-конце уникальной последовательности *h*-КЛЦМ расположены два актин-связывающих мотива Asp-Phe/Val-Arg-X-X-Leu, которые вместе с тремя подобными мотивами в N-конце *l*-КЛЦМ формируют единый актин-связывающий домен с выраженной периодической структурой [131, 172].

Как белок, *h*-КЛЦМ крайне склонна к протеолитической дегградации, что долгое время затрудняло ее биохимическую характеристику. Был разработан метод аффинной очистки *h*-КЛЦМ, что позволило исследовать кинетические параметры *h*-КЛЦМ и ее взаимодействие с компонентами цитоскелета *in vitro* [4, 131]. Как и ожидалось, удельная активность *h*-КЛЦМ и ее зависимость от Ca<sup>2+</sup>/CaM оказались сопоставимыми с соответствующими параметрами *l*-КЛЦМ. Ферментативная активность *h*-КЛЦМ, экспрессированной в бакуловирусной системе, оказалась сходной с активностью фермента, выделенного из ткани аорты [23]. Так же как и *l*-КЛЦМ, *h*-КЛЦМ взаимодействует с филаментами актина и миозина, при этом уникальная часть *h*-КЛЦМ вносит дополнительный вклад в связывание с актином. Это определяется наличием в ее составе вышеупомянутых актин-связывающих мотивов и других актин-связывающих участков, структура которых окончательно не установлена ([131, 172, 189], <sup>3</sup>).

<sup>3</sup> Кудряшов Д.С., Ширинский В.П., неопубликованные данные.

Трансфекция кДНК уникального N-концевого домена *h*-КЛЦМ в культивируемые клетки выявила его колокализацию с микрофиламентами [4, 131], а дифференциальная экстракция изоформ КЛЦМ из клеток свидетельствует в пользу возможного взаимодействия *h*-КЛЦМ и с другими компонентами цитоскелета [131, 189].

Таким образом, можно предположить, что в дополнение к известным для *l*-КЛЦМ функциям, главной из которых является активация АТРаза миозина, *h*-КЛЦМ может играть в клетках роль молекулярного интегратора цитоскелета, координируя взаимодействие его основных компонентов в процессе клеточной подвижности. С другой стороны, *h*-КЛЦМ может выполнять роль фиксатора актиновых филаментов в местах их перекреста, стабилизируя цитоскелет.

Экспрессия *h*-КЛЦМ изменяется в онтогенезе. Так, экспрессия *h*-КЛЦМ максимальна во время раннего развития и снижается после рождения. Интересно, что экспрессия *l*-КЛЦМ, напротив, относительно низка в эмбриональном, однако повышается в постнатальном периоде, и *l*-КЛЦМ становится доминирующей изоформой в гладких мышцах и немышечных тканях [24, 51, 57]. *h*-КЛЦМ также экспрессируется в миоблестах – предшественниках скелетных мышц, но замещается на *l*-КЛЦМ и *sk*-КЛЦМ при последующей дифференцировке клеток [79]. Вероятно, стабилизирующая функция *h*-КЛЦМ особенно важна в эмбриональном периоде при созревании различных клеточных структур, например, саркомеров, что и обуславливает высокий уровень экспрессии *h*-КЛЦМ в эмбриональных тканях.

Вместе с тем, *h*-КЛЦМ продолжает экспрессироваться в эпителии, эндотелии, аортальных гладкомышечных клетках и, возможно, в других клетках взрослых животных и человека [4, 24]. В эндотелии и многих культивируемых клетках *h*-КЛЦМ является основной, если не единственной изоформой КЛЦМ [219, 220, Ширинский В.П., неопубл. данные], что свидетельствует о ее самодостаточности в поддержании актомиозин-зависимой клеточной подвижности.

Следует отметить, что полное структурное сходство *l*-КЛЦМ с С-концевой частью *h*-КЛЦМ, как на уровне гена, так и на уровне белка, делает нетривиальным исследование коэкспрессии изоформ КЛЦМ в клетках организма, не позволяя селективно выявлять *l*-КЛЦМ стандартными иммуногистохимическими методами или гибридизацией *in situ*. В этой связи нельзя исключить, что преобладание *l*-КЛЦМ в тканях взрослых животных, измеряемое методом иммуноблоттинга, отражает не только изменение характера экспрессии КЛЦМ в клетках паренхимы, но и степень развития сосудов в ткани, которые могут являться источником низкомолекулярной изоформы.

Чтобы разрешить эту проблему, требуется разработка надежных методов количественной детекции изоформ КЛЦМ на срезах тканей.

## VI. KRP

Как независимый продукт генетического локуса КЛЦМ, KRP был впервые получен и идентифицирован стандартными биохимическими методами [104]. KRP был выделен из мускульного желудка курицы и охарактеризован как кислый (pI 4,5) 17 кДа белок, реагирующий с поликлональными антителами против *l*-КЛЦМ. Секвенирование нескольких пептидов и определение блокирующей N-концевой группы этого белка позволили предположить, что он является независимо экспрессирующимся C-концевым доменом *l*-КЛЦМ. В то же время, в этой ткани была обнаружена новая мРНК, соответствующая 520 парам оснований 3'-конца кДНК *l*-КЛЦМ и являющаяся результатом транскрипции с независимого промотора, расположенного в интроне гена *l*-КЛЦМ [33, 58] (рис. 1).

Было показано, что возможны два варианта сплайсирования в самом начале второго экзона KRP, что приводит к вставке одного остатка Glu в положение 29 [226]. Однако изоморфизм KRP не ограничивается альтернативным сплайсингом. При анализе продуктов протеолиза очищенного KRP были обнаружены три ацетилированных по N-концу пептида, соответствующих началу трансляции KRP с Met<sup>1</sup>, Met<sup>3</sup> или Met<sup>8</sup> и представленных в соотношении 1:1:3, соответственно [178]. Кроме того, масс-спектрометрический анализ очищенного KRP выявил разное количество C-концевых остатков Glu (от 0 до 5), хотя мРНК KRP кодирует шесть последовательно расположенных остатков [178].

С помощью рентгеновской дифракции кристалла KRP определено пространственное положение 103 центральных (Val<sup>33</sup>-Met<sup>135</sup>) из 154 остатков KRP [87]. Образующая ими структура может быть охарактеризована как бочонок, формируемый семью антипараллельными β-листами, расположенными двумя пластинами одна против другой (см. рис. 4 в обзоре [2]). Один пласт содержит четыре β-листа, другой — три. Подобную структуру имеют CH2-домены иммуноглобулинов. Однако, в отличие от CH2-домена, KRP не содержит внутримолекулярной дисульфидной связи, хотя два остатка Cys<sup>63</sup> и Cys<sup>115</sup> расположены в структурно идентичных позициях. Молекулярные размеры KRP составляют 47×24×31 Å и радиус Стокса равен 28,7 Å [12, 87].

KRP содержит основной миозин-связывающий участок КЛЦМ [185] и является конкурентным ингибитором фосфорилирования

миозина под действием *l*-КЛЦМ *in vitro* [187]. Скорее всего, это является следствием нарушения взаимодействия КЛЦМ с субстратом, в результате чего *l*-КЛЦМ фосфорилирует миозин из раствора. Об этом свидетельствует увеличение  $K_m$  для миозина реакции фосфорилирования без изменения  $V_{max}$  в присутствии КРР [187].

С помощью электронной микроскопии [142] и использования делеционных мутантов миозина [187] КРР-связывающая область миозина была локализована в месте контакта РЛЦ с тяжелыми цепями миозина, т.е. там, где головка соединяется со стержневой частью миозина. КРР стехиометрически взаимодействует только с нефосфорилированным миозином, причем для прочного связывания необходима С-концевая последовательность Gly<sup>138</sup>-Asp<sup>151</sup> КРР [187]. В АТФ-содержащих физиологических растворах такое взаимодействие препятствует конформационному переходу молекулы миозина из развернутого (6S) в свернутое (10S) состояние, аналогично эффекту фосфорилирования РЛЦ [185]. Поскольку только 6S миозин способен формировать филаменты, была высказана гипотеза о том, что в покоящейся клетке КРР стабилизирует филаменты нефосфорилированного миозина и поддерживает структуру сократительного аппарата [185, 221]. Интересно, что КРР не взаимодействует с миозинами поперечнополосатых мышц, молекулы которых не способны к АТФ-зависимому изменению конформации. Возможно, что избирательность КРР в связывании и регуляции определенных миозинов может находить отражение в тканеспецифичной экспрессии этого белка.

КРР экспрессируется преимущественно в гладкой мускулатуре. При этом, количество этого белка значительно меньше в тонических мышцах, чем в фазных [1, 58, 84, 231], где оно сопоставимо с концентрацией миозина [185] и где уровень фосфорилирования РЛЦ может быть недостаточен для поддержания филаментной структуры миозина. На всем протяжении онтогенеза КРР экспрессируется на высоком уровне только в гладких мышцах и мышцах сердца [24, 58, 84] и в небольших количествах в легких и соединительной ткани [240].

В полном согласии со способностью КРР связываться с миозином *in vitro*, методами иммунофлуоресценции трансфицированных клеток и окраской цитоскелетов Су3-меченным КРР была показана колокализация КРР с миозином II типа [132]. Более того, трансгенные клетки HeLa, постоянно экспрессирующие КРР, проявляют повышенную адгезивную и миграционную активность по сравнению с клетками, не содержащими КРР (Дуднакова Т.В., Ширинский В.П., неопубл. данные). Предполагается, что этот эффект КРР обусловлен тем, что в немышечных клетках до 50% миозина II может находиться в мономерной форме и не участвовать в образовании филаментов.

Сдвигая равновесие между мономерным и филаментарным миозином в пользу последнего, KRP увеличивает количество готовых к силогенерации филаментов миозина, способствуя более быстрому и выраженному двигательному ответу клетки. Вместе с тем предложена альтернативная гипотеза, согласно которой KRP участвует в расслаблении гладких мышц и этот эффект усиливается при фосфорилировании KRP [223, 231]. К сожалению, полученные к настоящему времени экспериментальные данные пока не позволяют отдать предпочтение какой-либо из этих гипотез и идентифицировать механизм действия KRP *in vivo*.

## VII. ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ ПРОДУКТОВ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ЛОКУСА КЛЦМ

В настоящее время стало очевидным, что фосфорилирование может быть важным для регуляции функций КЛЦМ и KRP. Эти белки являются субстратами различных протеинкиназ *in vitro*, а также фосфобелками *in vivo*. Очищенная из гладких мышц *l*-КЛЦМ разделяется на три фракции высокоэффективной жидкостной хроматографией, а преобработка фосфатазой приводит к изменению профиля элюции и соотношения белковых пиков, указывая на наличие *in vivo* по крайней мере трех форм *l*-КЛЦМ, характеризующихся различным содержанием фосфата [39, 48]. Аналогично, в гладких мышцах KRP является мажорным фосфобелком, содержащим несколько фосфорилированных остатков [1, 130]. В уникальной N-концевой последовательности *h*-КЛЦМ также обнаружены участки фосфорилирования различными протеинкиназами [23, 3].

Согласно изложенной выше гипотезе о структурно-функциональной взаимосвязи белковых продуктов генетического локуса КЛЦМ, можно предположить, что распределение фосфорилируемых остатков в этих белках соответствует необходимости регуляции основной функции каждого из них. Так, фосфорилирование KRP может быть в основном связано с модуляцией его белковых взаимодействий, например, с миозином, фосфорилирование *l*-КЛЦМ – с регуляцией ферментативной активности, а фосфорилирование *h*-КЛЦМ – с изменением взаимодействия с различными компонентами цитоскелета.

Действительно, многочисленные данные показывают, что фосфорилирование *l*-КЛЦМ протекает, в основном, по остаткам, кластеризованным в двух последовательностях, а именно, в уникальном для КЛЦМ CaM-связывающем участке и примыкающей к нему с C-конца N-концевой области KRP-домена (рис. 4, см. цветную

вкладку, стр. 388). Уже первые эксперименты позволили установить Ser<sup>815</sup> и Ser<sup>828</sup> как участки фосфорилирования сАМР-зависимой протеинкиназой (РКА) [98], которые были названы сайтами А и В, соответственно [200]. Дальнейшие исследования не только подтвердили фосфорилирование Ser<sup>815</sup> и Ser<sup>828</sup> *in vitro* и *in vivo*, но и показали, что расположенные в непосредственной близости остатки также могут быть субстратами других протеинкиназ. Таким образом, в настоящее время правильнее говорить о сайтах А и В как о коротких последовательностях, несущих основные участки фосфорилирования *l*-КЛЦМ и *h*-КЛЦМ, тогда как КРР содержит только сайт В. Пока трудно судить насколько фосфорилируемые остатки кластеризованы в уникальной области *h*-КЛЦМ ввиду недостаточности экспериментальных данных по этому белку.

#### ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ *l*-КЛЦМ

Фосфорилирование *l*-КЛЦМ по сайтам А и В было впервые исследовано *in vitro* с использованием каталитической субъединицы РКА [8]. Было обнаружено, что в отсутствие Ca<sup>2+</sup>/СаМ фосфорилируются как Ser<sup>815</sup>, так и Ser<sup>828</sup>, однако, только сайт В фосфорилируется в присутствии Ca<sup>2+</sup>/СаМ, связывание которого блокирует сайт А [7, 8]. Как можно было ожидать, фосфорилирование сайта А снижало сродство *l*-КЛЦМ к Ca<sup>2+</sup>/СаМ в 3,5 раза [34], а дефосфорилирование обращало этот эффект [159]. В то же время, избирательное фосфорилирование только Ser<sup>828</sup> не влияло на активацию *l*-КЛЦМ Ca<sup>2+</sup>/СаМ [34], однако, еще более усиливало эффект фосфорилирования сайта А на связывание Ca<sup>2+</sup>/СаМ [151]. Наконец, было показано, что сGMP-зависимая протеинкиназа (РКГ) также может фосфорилировать сайт А [150].

Результаты, полученные *in vitro*, легли в основу гипотезы о механизме расслабления гладких мышц при внеклеточной стимуляции сАМР и сGMP-мобилизующих систем клетки. Известно, что рецептор-зависимая и независимая активация аденилатциклазы (изопротеренол, карбахол, форсколин) или гуанилатциклазы (за счет оксида азота) приводят к быстрому и эффективному расслаблению гладких мышц (см. обзоры [86, 176]). Поскольку молекулярный механизм не был подробно описан, то обнаруженное в ткани форсколин-зависимое увеличение фосфорилирования сайта А *l*-КЛЦМ позволило предположить прямое участие РКА в фосфорилировании и ингибировании *l*-КЛЦМ с последующим дефосфорилированием РЛЦ миозина за счет Ca<sup>2+</sup>-независимой фосфатазы, и расслаблением [43].

Таким образом, фосфорилирование сайта А, но не общего для *l*-КЛЦМ и КРР сайта В, является регуляторным по отношению к

ферментативной активности *l*-КЛЦМ. Скорее всего, фосфорилирование сайта В связано с регуляцией других функций, главных для КРР, но может сохраняться, а может оказаться рудиментарным для *l*-КЛЦМ. При этом интересно отметить крайнюю гомологию сайтов А (...GRLSS<sup>815</sup>...) и В (...GRKSS<sup>828</sup>...) в белке млекопитающих, что распространяется и на их способность к фосфорилированию. Если РКА фосфорилирует *l*-КЛЦМ по Ser<sup>815</sup> и Ser<sup>828</sup>, то протеинкиназа РАК, активируемая низкомолекулярным G-белком p21, фосфорилирует Ser<sup>814</sup> и Ser<sup>827</sup> [66, 2]. Однако, только фосфорилирование внутри сайта А приводит к инактивации *l*-КЛЦМ.

Хотя в настоящее время механизм ингибирования *l*-КЛЦМ путем фосфорилирования сайта А не вызывает сомнений, последующие эксперименты выявили достаточно сложный характер этой регуляции. Оказалось, что сайт А является мишенью нескольких протеинкиназ, контролируемых различными внутриклеточными сигнальными каскадами. Помимо РКА и РКГ, сайт А может быть фосфорилирован протеинкиназой С [151], Ca<sup>2+</sup>/CaM-зависимой протеинкиназой II типа (CaMK-II) [73, 98] и РАК [66]. По-видимому, фосфорилирование КЛЦМ в ответ на активацию определенного сигнального каскада зависит от природы клетки, организации и взаимодействия протеинкиназных каскадов, а также от доступности КЛЦМ в контексте данной клетки. Кроме того, выполнение клеткой специфических функций, таких как миграция или прохождение клеточного цикла, также может определять способ и степень фосфорилирования КЛЦМ. Так, РАК фосфорилирует сайт А *l*-КЛЦМ при миграции клеток, тогда как в гладкой мускулатуре за это фосфорилирование ответственна, главным образом, CaMK-II ([199, 200, 209], см. также [2]).

Вместе с тем, каждая из протеинкиназ фосфорилирует более одного остатка в *l*-КЛЦМ *in vivo* и *in vitro* (рис. 4). Было показано, что доступность фосфорилируемых остатков и эффект их фосфорилирования могут различаться для *l*-КЛЦМ из разных источников, а также зависеть от изоформы фосфорилирующего фермента. Так, отмеченная выше способность РКА фосфорилировать сайты А и В в отсутствие Ca<sup>2+</sup>/CaM и только сайт В, когда Ca<sup>2+</sup>/CaM связан, характерна для *l*-КЛЦМ птиц [34]. Однако, РКА фосфорилирует те же остатки в *l*-КЛЦМ миометрия овцы независимо от присутствия Ca<sup>2+</sup>/CaM, но также ингибирует последующее связывание Ca<sup>2+</sup>/CaM [160]. РКС из мозга кролика фосфорилирует *l*-КЛЦМ птиц по регуляторному сайту А и Ca<sup>2+</sup>/CaM-независимо по остатку, отличному от сайта В [151]. Однако РКС из тромбоцитов человека также фосфорилирует два остатка в *l*-КЛЦМ из той же ткани, расположенные вне сайтов А и В [95]. Фосфорилирование обоих ингибируется Ca<sup>2+</sup>/CaM

и примерно в 10 раз снижает сродство к  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ . Аналогично, в *l*-КЛЦМ миометрия овцы РКС фосфорилирует два участка, отличные от сайтов А и В, но не влияет на активность КЛЦМ [160]. Возможно, РАК1 и РАК2 также фосфорилируют разные остатки, но общий из них расположен в сайте А [66, 180]. Наконец, СаМК II фосфорилирует два [98] или три [73] остатка КЛЦМ, только один из которых расположен в сайте А.

Если фосфорилирование сайта А является основным путем ингибирования КЛЦМ, то дополнительное фосфорилирование других остатков может, в свою очередь, влиять на доступность сайта А и/или модулировать эффект его фосфорилирования. Было отмечено, что фосфорилирование сайта В само по себе не влияет на взаимодействие *l*-КЛЦМ с  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ , но усиливает ингибирующий эффект при фосфорилировании сайта А [151]. Аналогично, если фосфорилирование внутри или поблизости от сайта В не изменяет связывания КРР с миозином (см. ниже), то в контексте КЛЦМ оно может усиливать это взаимодействие [179].

Скорее всего, тонкая регуляция активности КЛЦМ достигается мозаичным фосфорилированием разных остатков КЛЦМ, но главным является фосфорилирование сайта А. Об этом также свидетельствует факт внутримолекулярного автофосфорилирования КЛЦМ, протекающего по нескольким остаткам [56], но преимущественно внутри или рядом с сайтом А. Так, если автофосфорилирование по  $\text{Ser}^{815}$  [194, 212] очевидно связано с ингибированием *l*-КЛЦМ, то аналогичная модификация  $\text{Thr}^{803}$  приводит к повышению СаМ-независимой активности фермента [212]. Описано автофосфорилирование по остаткам  $\text{Ser}^{823}$  [212], а также  $\text{Thr}^{863}$  или  $\text{Thr}^{865}$  [194] и остатку  $\text{Thr}$  вблизи N-концевого актин-связывающего участка [6], без существенных функциональных последствий. Возможно, что автофосфорилирование этих остатков имеет эффект только когда оно дополняет фосфорилирование внутри сайта А. Само по себе, автофосфорилирование вероятно играет незначительную роль в регуляции активности *l*-КЛЦМ, поскольку требует очень высокой концентрации  $\text{Mg}^{2+}$  и протекает со скоростью более чем на два порядка ниже, чем фосфорилирование миозина — основного субстрата *l*-КЛЦМ.

В последнее время появились интересные данные о возможной активации *l*-КЛЦМ после ее фосфорилирования пролин-направленными протеинкиназами. Так, конститутивная активация каскада  $\text{p42/44}^{\text{erk1,2}}$  MAP-киназ повышала уровень фосфорилирования *l*-КЛЦМ и миграционную активность трансформированных клеток [119], а ингибирование этого каскада тормозило подвижность различных клеток [119, 140, 148]. Механизм такой активации *l*-КЛЦМ до сих

пор неясен. По одним данным, он связан с повышением чувствительности *l*-КЛЦМ к  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  [119], по другим – с увеличением самой каталитической активности без изменения сродства к  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  [146]. Также неясной остается область *l*-КЛЦМ и конкретный остаток, фосфорилирование которых способно активировать фермент.

Вполне вероятно, что как и в случае ингибиторного сайта А, *l*-КЛЦМ содержит последовательность, предназначенную для регуляторной активации, и включающую кластер или всего лишь один принципиальный участок фосфорилирования. Установлено, что MAP-киназой преимущественно фосфорилируется Ser<sup>834</sup> *l*-КЛЦМ [1, 130], расположенный к С-концу от сайта В (см. рис. 4). Более того, как показано с использованием KRP в качестве модельного субстрата, другие протеинкиназы могут фосфорилировать и соседние остатки [1, 130]. Выяснение возможности активации *l*-КЛЦМ путем избирательного фосфорилирования С-концевых остатков от сайта В является предметом ближайших исследований.

Как отмечено выше, фосфорилирование внутри KRP-домена может быть связано с регуляцией свойств, специфичных для KRP, но не с активацией *l*-КЛЦМ. Действительно, есть данные об активации *l*-КЛЦМ фосфорилированием Thr<sup>283</sup> и, возможно, N-концевых остатков Thr<sup>40</sup>/Thr<sup>43</sup> пролин-направленными p34<sup>cdc2</sup> и MAP-киназами [146]. Интересно, что вблизи первого из них расположен Thr<sup>259</sup>, фосфорилируемый PAK2 в клетках эндотелия [66].

Thr<sup>283</sup> фосфорилируется под действием p34<sup>cdc2</sup>, которая активируется при митозе. Это позволяет предположить роль фосфорилирования Thr<sup>283</sup> в регуляции *l*-КЛЦМ в процессе клеточного деления. Действительно, в клетках, остановленных нокадазолом в телофазе митоза, наблюдается повышенный уровень фосфорилирования *l*-КЛЦМ по остатку Thr, расположение которого соответствует Thr<sup>283</sup>, но точно не установлено [89]. Интересно, что подобные митоз-зависимые изменения фосфорилирования были показаны и для других белков, ассоциированных с актомиозином, например, кальдесмона [236] и фосфатазы РЛЦ миозина [213]. Недавние исследования показали, что фосфорилирование некоторых белков p34<sup>cdc2</sup> и другими пролин-направленными киназами перед митозом необходимо для создания условий их специфического связывания с WW-доменом IV типа ядерной пептидил-пролил-*cis/trans* изомеразы PIN1 [137]. При разрушении ядерной мембраны в процессе митоза PIN1 переходит в цитоплазму, связывается с такими белками и изменяет их активность на время деления клетки [137]. Можно предположить, что подобная регуляция активности белков, участвующих в регуляции актинового цитоскелета и актомиозина, необходима для осуществления глобаль-

ной, но быстрой по времени разборки и ориентированной сборки цитоскелета с последующей активацией актомиозина, необходимой для цитотомии. Проверка этой гипотезы также является предметом ближайших исследований.

В отличие от p34<sup>cdc2</sup>, MAP-киназа преимущественно фосфорилирует *l*-КЛЦМ по остаткам Ser<sup>834</sup> и, в меньшей степени, Thr<sup>40</sup>/Thr<sup>43</sup> [146]. При этом Thr<sup>40</sup>/Thr<sup>43</sup> локализованы в актин-связывающем домене *l*-КЛЦМ и, возможно, в непосредственной близости от участка связывания с кортактином [44]. Вопрос о том, влияет ли фосфорилирование MAP-киназой на связывание *l*-КЛЦМ с филаментами актина и/или кортактином и регулирует ли оно внутриклеточную локализацию *l*-КЛЦМ остается важным, но совершенно неисследованным.

#### ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ *h*-КЛЦМ

*h*-КЛЦМ полностью включает последовательность *l*-КЛЦМ и все ее участки фосфорилирования, включая сайты А и В (рис. 4). Однако уникальная N-концевая часть *h*-КЛЦМ содержит также и другие фосфорилируемые остатки. РКА фосфорилирует *in vitro* несколько сериновых остатков уникальной области, что нарушает взаимодействие *h*-КЛЦМ с основными компонентами цитоскелета<sup>3</sup>. Наиболее вероятно, что фосфорилированию подвергаются Ser<sup>127</sup> и Ser<sup>140</sup>. Эти результаты являются первыми данными о том, что предполагаемая функция *h*-КЛЦМ по обеспечению интеграции цитоскелета может находиться под внутриклеточным регуляторным контролем. Более того, взаимная близость фосфорилируемых остатков также позволяет предположить наличие короткой последовательности, специально предназначенной для такой регуляции *h*-КЛЦМ, аналогично ранее описанным сайтам А и В в *l*-КЛЦМ.

Как отмечено выше, в клетках эндотелия человека *h*-КЛЦМ экспрессируется в виде двух основных изоформ, КЛЦМ1 и КЛЦМ2, благодаря альтернативному сплайсингу экзона 9, кодирующего 69 аминокислотных остатков [133]. Фосфорилирование большей изоформы КЛЦМ1 киназой p60<sup>Src</sup> по остаткам Tyr<sup>464</sup> и Tyr<sup>471</sup> происходит внутри этой вставки и приводит к 2–3 кратному повышению энзиматической активности фермента *in vitro* [23]. Хотя механизм такой активации остается неясным, отмечено, что тирозиновое фосфорилирование *h*-КЛЦМ может иметь функциональное значение и играть роль в регуляции барьерной функции эндотелия [64]. Кроме того, фосфорилирование внутри кластера Tyr<sup>464</sup>–Tyr<sup>471</sup> может стимулировать взаимодействие *h*-КЛЦМ с другими внутриклеточными белками, например, с кортактином [44]. Таким образом, в ближайшее время можно ожидать появления новых интересных данных о фосфорили-

ровании уникального фрагмента *h*-КЛЦМ и его роли в регуляции функций, специфических для *h*-КЛЦМ.

#### ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ KRP

Сравнительный анализ спектра белкового фосфорилирования показывает, что KRP является мажорным фосфобелком в гомогенатах гладких мышц, метаболически меченных  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ортофосфатом [1, 130]. При этом практически весь связанный фосфат ассоциирован как минимум с тремя остатками, расположенными в короткой N-концевой последовательности белка Lys<sup>11</sup>-Ser<sup>19</sup> [130] (рис. 4). В эту область входят Ser<sup>13</sup> и Ser<sup>19</sup>, соответствующие Ser<sup>828</sup> (сайту В) и Ser<sup>834</sup> *l*-КЛЦМ, и фосфорилируемые PKA/PKG и MAP-киназой, соответственно [130, 139]. Невозможность разделения этих остатков из-за их взаимной близости не позволяет точно определить другие участки фосфорилирования, однако, эксперименты *in vitro* показывают, что ими могут быть Ser<sup>15</sup>/Ser<sup>16</sup> [130] и/или Ser<sup>12</sup> (рис. 4), который есть только в KRP млекопитающих и является субстратом PAK1<sup>2</sup>.

Фосфорилирование KRP возрастает при стимуляции гладких мышц, но, скорее всего, не связано с сокращением [130]. Напротив, KRP участвует в расслаблении и, по мнению Сомлио и соавторов, фосфорилирование по Ser<sup>13</sup> усиливает его действие [231]. Эксперименты с мутированным по Ser<sup>13</sup> KRP лишь отчасти подтвердили такую возможность [223], но прямое фосфорилирование KRP не изменяло его релаксирующего действия на сокращенные скинированные волокна [139]. Более того, в экспериментах с интактной тканью выяснилось, что степень фосфорилирования KRP существенно возрастает только при развитии сокращения, но мало изменяется в ходе дальнейшего расслабления [130], как этого требует гипотеза Сомлио. Последующий анализ степени фосфорилирования отдельных остатков KRP с помощью фосфо- и сайт-специфических антител подтвердил, что фосфорилирование Ser<sup>13</sup> возрастает с 20 до 100% при стимуляции сокращения мышцы, тогда как фосфорилирование Ser<sup>19</sup>, составляющее в покое 25%, изменяется слабо в процессе сокращения-расслабления (Krymsky M.A., Kharchaev A.Yu., Sidorova M.A., Bessalova Zh.D., Shirinsky V.P., Vorotnikov A.V., рукопись в подготовке). Таким образом, физиологический смысл фосфорилирования KRP остается неясным и является предметом дальнейших исследований.

Тем не менее, KRP подвергается массивному фосфорилированию по нескольким остаткам *in vivo* и *in vitro*. Поскольку основной известной в настоящее время функцией KRP является взаимодействие с миозином, можно предположить, что именно оно регули-

руется фосфорилированием. Однако эксперименты *in vitro* достаточно убедительно показывают, что ни фосфорилирование Ser<sup>13</sup>, ни Ser<sup>13</sup> вместе с Ser<sup>19</sup> не изменяют взаимодействия KRP с миозином [125, 222]. Такие результаты согласуются с расположением основной миозин-связывающей последовательности в С-конце KRP [187] и позволяют предположить наличие у KRP других функций, регуляция которых осуществляется фосфорилированием N-концевой области KRP. Аналогичный вывод был сделан в результате физиологических экспериментов, где именно N-концевая область была необходима для релаксирующей активности KRP в модели скинированных гладкомышечных волокон [223, 231]. В настоящее время ведутся активные поиски мишени KRP, отличной от миозина. В этой связи, большое значение приобретают последние данные о том, что фосфорилирование остатков Ser<sup>13</sup> или Ser<sup>19</sup> ослабляет взаимодействие KRP с неидентифицированными пока клеточными структурами<sup>2</sup>. В цитоплазме трансфицированных гладкомышечных клеток KRP дикого типа распределяется диффузно, тогда как фосфорилированный KRP, а также мутанты, имитирующие фосфорилирование, локализованы в примембранной области клетки [125]. Эти результаты могут отражать возможную сигнальную функцию KRP в клетке, не связанную со взаимодействием с миозином. Можно предположить, что фосфорилирование KRP приводит к его связыванию с фосфоспецифичными модульными доменами (например, WW-доменами). Такое взаимодействие может играть роль в направленном транспорте KRP в определенные клеточные компартменты, где KRP способствует сборке миофиламентов или ингибирует I-КЛЦМ, способствуя инактивации миозина.

## VIII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время становится очевидно, что белковые продукты генетического локуса КЛЦМ играют важнейшую роль в жизнедеятельности клеток, обеспечивая выполнение двигательных функций, таких как мышечное сокращение и различные формы клеточной подвижности. Вместе с тем, несмотря на более чем 25-летние исследования со времени открытия их первого представителя – I-КЛЦМ, остается много невыясненных вопросов как относительно организации локуса КЛЦМ в геноме и регуляции экспрессии его продуктов, так и их структурно-функциональных взаимосвязей, способов контроля их активности и их участия в других внутриклеточных процессах.

Роль I-КЛЦМ наиболее существенна при активации миозина, сокращении гладких мышц и двигательной активности немышечных клеток. Нарушение этих процессов, вероятно, должно иметь катаст-

рофические последствия в контексте организма. Скорее всего, мышцы с конститутивным селективным нокаутом *l*-КЛЦМ (если их в принципе возможно создать) будут погибать на ранних стадиях эмбриогенеза. В то же время, ряд функций КЛЦМ можно исследовать в моделях культивируемых клеток, где избирательный нокаут *l*-КЛЦМ не является летальным, но блокирует их миграционную [118] и сократительную [19] активность. Создание и использование высокоселективных ингибиторов является другим подходом к изучению функций КЛЦМ. В частности, такие работы позволили выявить вероятное участие КЛЦМ в интегрин-зависимом формировании цитоскелета [30, 50]. Однако в этом случае сложно дискриминировать индивидуальный вклад изоформ КЛЦМ.

Можно предполагать, что для обеспечения быстрой моторной реакции клеток различной природы функционирование *l*-КЛЦМ является принципиальным. Однако для более медленных процессов участие КЛЦМ не всегда обязательно. Полученные в последние годы данные показывают, что и другие киназы могут фосфорилировать и активировать миозин в клетках. Такое фосфорилирование является, главным образом, рецептор- или интегрин-зависимым и не зависит от изменения  $[Ca^{2+}]_i$  (см. обзор [2]). При этом дальнейшая регуляция степени фосфорилирования РЛЦ миозина осуществляется путем модуляции активности миозин-специфичной фосфатазы [196, 197]. Аналогичные рецептор-зависимые механизмы реализуются и в гладкой мускулатуре, что обуславливает более длительные сократительные реакции по сравнению с  $Ca^{2+}/CaM$ -зависимой активацией *l*-КЛЦМ.

Важное значение имеет тонкая регуляция внутриклеточной активности *l*-КЛЦМ путем фосфорилирования. Если в гладкой мускулатуре в условиях массивной  $Ca^{2+}$ -зависимой активации фермента фосфорилирование *l*-КЛЦМ выполняет лишь модулирующую роль, то в других типах клеток, регулируемых, главным образом, путем активации поверхностных рецепторов и множественных внутриклеточных сигнальных систем, значение этого пути может возрастать. В таких случаях фосфорилирование, например, MAP-киназами, может активировать *l*-КЛЦМ и стимулировать локомоцию [119, 140, 148], вносить вклад в формирование адгезивных контактов [50] или способствовать изменению внутриклеточной локализации КЛЦМ. Напротив, фосфорилирование под действием PKA/PKG и PAK при активации рецепторов, сопряженных с определенными G-белками, будет приводить к ингибированию *l*-КЛЦМ и клеточной подвижности. Наконец, фосфорилирование КЛЦМ под действием p34<sup>cdc2</sup> киназы в процессе митоза [89] может иметь значение для правильного прохождения клеточного цикла.

Роль *h*-КЛЦМ в клетках продолжает оставаться недостаточно раскрытой. С одной стороны, эта изоформа обладает всеми свойствами *l*-КЛЦМ в плане фосфорилирования миозина и, следовательно, стимуляции его филаментообразующей и моторной функций [23, 131]. С другой стороны, во многих клетках, например, в пассированных гладкомышечных клетках [4, 131] присутствуют обе изоформы КЛЦМ, и создается впечатление, что в таких клетках *l*-КЛЦМ играет роль основного регулятора АТФазы миозина. Так, ингибирование ее экспрессии с помощью антисенс-олионуклеотидов или аденовирусной трансдукции антисенс-КЛЦМ конструкций подавляет сократительный ответ клеток, несмотря на то, что при таких воздействиях экспрессия *h*-КЛЦМ нарушается в меньшей степени [19, 118]. Последующее ингибирование *h*-КЛЦМ путем увеличения степени инфицирования клеток антисенс-КЛЦМ не приводило к дальнейшему падению сократимости клеток и, что не менее интересно, не изменяло степени фосфорилирования регуляторных легких цепей миозина под действием агонистов и  $Ca^{2+}$ -ионофора А23187 [19]. Эти и другие подобные данные по различной активности изоформ КЛЦМ могут быть объяснены на основе их структурных различий. Анализируя результаты дифференциальной экстракции изоформ КЛЦМ из клеток и тканей, а также опытов *in vitro*, можно утверждать, что уникальная N-концевая последовательность *h*-КЛЦМ опосредует ее более прочное взаимодействие с компонентами цитоскелета [131, 172, 189]. *l*-КЛЦМ значительно слабее заякорена на цитоскелетных структурах и, вероятно, имеет большую свободу к перемещению в цитоплазме. Поэтому эффективный ареал *l*-КЛЦМ для фосфорилирования молекул мономерного миозина в цитоплазме будет больше, чем у *h*-КЛЦМ, которая значительно менее подвижна и способна фосфорилировать миозин только непосредственно вокруг себя. Дополнительная регуляция *h*-КЛЦМ за счет фосфорилирования ее N-концевой части также может влиять как на ассоциацию с цитоскелетом, так и на ее ферментативную активность. В результате, при сравнимой экспрессии обеих изоформ КЛЦМ в клетках их активность, измеренная по конечному параметру (сократительному ответу клеток или общему фосфорилированию РЛЦ миозина) будет казаться различной.

Возможно, функциональное назначение уникальной последовательности *h*-КЛЦМ состоит именно в том, чтобы локализовать фермент в местах цитоплазмы, где необходимо осуществление определенных и строго ограниченных двигательных актов. Например, в клетках эндотелиального или эпителиального пласта *h*-КЛЦМ может находиться в субкортикальном актине и регулировать локальную

плотность межклеточных контактов и, следовательно, барьерную функцию клеточного слоя. Возможно, в норме этим клеткам не требуется осуществлять полное сокращение тела и поэтому они не экспрессируют *l*-КЛЦМ [219, 220]. Противоположная ситуация характерна для клеток с активной локомоцией, таких как эмбриональные фибробласты. Они преимущественно экспрессируют *l*-КЛЦМ, однако при длительном пассировании и снижении миграционной активности ее уровень падает и повышается относительное содержание *h*-КЛЦМ [25, 57, 79].

Экспериментально доказано, что удаление *h*-КЛЦМ из организма животного методом генетического нокаута не приводит к катастрофическим последствиям. Мыши с отсутствующей *h*-КЛЦМ, но с сохраненной экспрессией *l*-КЛЦМ и KRP практически не отличаются от мышей дикого типа и, даже наоборот, становятся менее подвержены действию токсических агентов, введенных в кровоток (D.M. Watterson, персональное сообщение). Эти данные хорошо соответствуют предполагаемой важной роли *h*-КЛЦМ в барьерной функции эндотелия, однако, возможны и другие объяснения. Наличие *h*-КЛЦМ<sup>-/-</sup> животных дает возможность создать клеточные модели, не содержащие *h*-КЛЦМ, что позволит ответить на многие вопросы о функциях изоформ КЛЦМ *in vivo*, которые подняты в данном обзоре.

Несмотря на малые размеры и известные физико-химические и биохимические свойства KRP, функциональная значимость этого белка в клетке продолжает оставаться предметом дискуссий. В целом, не возникает сомнений, что он вовлечен в регуляцию структурно-функциональных свойств миозина и расслабление гладкой мускулатуры [221, 231]. Однако остается необходимой детализация механизма действия KRP. Дифференциальная экспрессия KRP в фазной (висцеральной) и тонической (сосудистой) мускулатуре позволяет предположить его прямое участие в поддержании определенного уровня фосфорилирования РЛЦ миозина в покоящейся мышце. Для тканей с повышенной экспрессией KRP характерен низкий уровень фосфорилирования миозина и их глубокая релаксация, тогда как крайне низкое содержание KRP в тонической мускулатуре может, в частности, определять наличие остаточного сократительного компонента (тонуса). Учитывая такую зависимость, нельзя исключить, что с помощью искусственной модуляции уровня экспрессии KRP в сосудах станет возможным регулировать локальный сосудистый тонус (например, коронарных и церебральных артерий) и/или системное давление (при гипертензии). Однако прежде необходимо разрешить вопрос о причинно-следственной связи между уровнем экспрессии KRP и степенью тонуса сосудов. Решение этой задачи с использованием

трансгенных животных, дефицитных по гену KRP, вряд ли возможно, поэтому потребуются разработка животных моделей с избирательной гиперэкспрессией этого белка в сосудистой ткани. Одним из создаваемых в нашей лаборатории подходов является локальная аденовирусная трансдукция кДНК KRP в сосуды животных и изучение ее функциональных последствий.

Крайне важным с точки зрения дальнейших исследований является вопрос о физиологической значимости экспрессии KRP в миокарде и его потенциальной роли в кардиомиогенезе [45]. Установление функций KRP в этой ткани может стать важным для понимания механизмов дифференцировки, гипертрофии и регенерации миокарда.

Наконец, в связи с обнаружением четвертого класса мРНК, гибридизирующегося с зондами к КЛЦМ/KRP в некоторых тканях человека [226], остается открытым вопрос о существовании новых продуктов генетического локуса КЛЦМ. Наличие множественных вариантов сплайсинга всех известных мРНК локуса КЛЦМ позволяет допустить, что неизвестный продукт будет обладать комбинацией свойств известных белков, и тогда его функциональные свойства можно будет предсказать на основе первичной структуры. В то же время, нельзя исключить, что новый белок может считываться в альтернативной рамке и, соответственно, иметь функции совершенно отличные от таковых для КЛЦМ и KRP.

Каковы бы ни были варианты развития событий, несомненно, что прогресс в изучении функциональной геномики локуса КЛЦМ у позвоночных и человека будет способствовать более глубокому пониманию фундаментальных основ эукариотической подвижности и разработке методов лечения широкого спектра заболеваний, при которых нарушается сократительная или двигательная активность клеток.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Воротников, А.В., Крымский, М.А., Чибалина, М.А., Кудряшов, Д.С., Ширинский, В.П. (2000) Цитология, **42**, 378–391.
2. Воротников, А.В., Крымский, М.А., Ширинский, В.П. (2002) Биохимия, **67**, 1587–1610.
3. Левицкий, Д.И. (1986) Усп. Биол. Химии, **27**, 74–101.
4. Чибалина, М.В., Кудряшов, Д.С., Шехонин, Б.В., Ширинский, В.П. (2000) Цитология, **42**, 248–255.
5. Ширинский, В.П. (1999) Российский Физиол. Журнал, **85**, 798–812.
6. Abe, M., Hasegawa, K., Hosoya, H. (1996) Cell Struct. Funct., **21**, 183–188.
7. Adelstein, R.S., Conti, M.A., Hathaway, D.R., Klee, C.B. (1978) J. Biol. Chem., **253**, 8347–8350.
8. Adelstein, R.S., Conti, M.A., Pato, M.D. (1980) Ann. NY Acad. Sci., **356**, 142–150.
9. Adelstein, R.S., Klee, C.B. (1981) J. Biol. Chem., **256**, 7501–7509.

10. *Adelstein, R.S., Klee, C.B.* (1982) *Meth. Enzymol.*, **85** Pt B, 298–308.
11. *Araki, Y., Ikebe, M.* (1991) *Biochem. J.*, **275**, 679–684.
12. *Ausio, J., Malencik, D.A., Anderson, S.R.* (1992) *Biophys. J.*, **61**, 1656–1663.
13. *Babij, P., Periasamy, M.* (1989) *J. Mol. Biol.*, **210**, 673–679.
14. *Babiychuk, E.B., Babiychuk, V.S., Sobieszek, A.* (1995) *Biochemistry*, **34**, 6366–6372.
15. *Bagby, R.M.* (1983) In: *Biochemistry of smooth muscle* (Stephens, N. L., ed.), CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 4–84.
16. *Bagchi, I.C., Huang, Q.H., Means, A.R.* (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, **3024–3029**.????
17. *Bagchi, I.C., Kemp, B.E., Means, A.R.* (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 15843–15849.
18. *Bagchi, I.C., Kemp, B.E., Means, A.R.* (1992) *Mol. Endocrinol.*, **6**, 621–626.
19. *Bao, J., Oishi, K., Yamada, T., Liu, L., Nakamura, A., Uchida, M.K., Kohama, K.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 9556–9561.
20. *Barden, J.A., Sehgal, P., Kemp, B.E.* (1996) *Biochim. Biophys. Acta*, **1292**, 106–112.
21. *Bartelt, D.C., Moroney, S., Wolff, D.J.* (1987) *Biochem. J.*, **247**, 747–56.
22. *Bayer, K.U., Lohler, J., Harbers, K.* (1996) *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 29–36.
23. *Birukov, K.G., Csontos, C., Marzilli, L., Dudek, S., Ma, S.F., Bresnick, A.R., Verin, A.D., Cotter, R.J., Garcia, J.G.* (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 8567–8573.
24. *Birukov, K.G., Schavocky, J.P., Shirinsky, V.P., Chibalina, M.V., Van Eldik, L.J., Watterson, D.M.* (1998) *J. Cell. Biochem.*, **70**, 402–413.
25. *Blue, E.K., Goeckeler, Z.M., Jin, Y., Hou, L., Dixon, S.A., Herring, B.P., Wysolmerski, R.B., Gallagher, P.J.* (2002) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **282**, C451–C460.
26. *Blumenthal, D.K., Takio, K., Edelman, A.M., Charbonneau, H., Titani, K., Walsh, K.A., Krebs, E.G.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 3187–3191.
27. *Blumenthal, D.K., Stull, J.T.* (1980) *Biochemistry*, **19**, 5608–5614.
28. *Brand-Arpon, V., Rouquier, S., Massa, H., de Jong, P.J., Ferraz, C., Ioannou, P.A., Demaille, J.G., Trask, B.J., Giorgi, D.* (1999) *Genomics*, **56**, 98–110.
29. *Cavadore, J.C., Molla, A., Harricane, M.C., Gabrion, J., Benyamin, Y., Demaille, J.G.* (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3475–3479.
30. *Chen, B.-H., Tzen, J.T.C., Bresnick, A.R., Chen, H.-C.* (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 33857–33863.
31. *Chin, D., Schreiber, J.L., Means, A.R.* (1999) *Biochemistry*, **38**, 15061–15069.
32. *Choi, O.H., Adelstein, R.S., Beaven, M.A.* (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 536–541.
33. *Collinge, M., Matrisian, P.E., Zimmer, W.E., Shattuck, R.L., Lukas, T.J., Van Eldik, L.J., Watterson, D.M.* (1992) *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 2359–2371.
34. *Conti, M.A., Adelstein, R.S.* (1981) *J. Biol. Chem.*, **256**, 3178–3181.
35. *Craig, R., Smith, R., Kendrick-Jones, J.* (1983) *Nature*, **302**, 436–439.
36. *Cross, R.A., Sobieszek, A.* (1985) *FEBS Lett.*, **188**, 367–374.
37. *Dabrowska, R., Aromatorio, D., Sherry, J.M., Hartshorne, D.J.* (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **78**, 1263–1272.
38. *Dabrowska, R., Sherry, J.M., Aromatorio, D.K., Hartshorne, D.J.* (1978) *Biochemistry*, **17**, 253–258.
39. *Dalla Libera, L., Mastroianni, M., Sobieszek, A.* (1994) *FEBS Lett.*, **346**, 213–216.
40. *Daniel, J.L., Adelstein, R.S.* (1976) *Biochemistry*, **15**, 2370–2377.
41. *De Bondt, H.L., Rosenblatt, J., Janca-rik, J., Jones, H.D., Morgan, D.O., Kim, S.H.* (1993) *Nature*, **363**, 595–602.

42. De Lanerolle, P., Adelstein, R.S., Fera-misco, J.R., Burridge, K. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78**, 4738–4742.
43. De Lanerolle, P., Nishikawa, M., Yost, D.A., Adelstein, R.S. (1984) Science, **223**, 1415–1417.
44. Dudek, S.M., Birukov, K.G., Zhan, X., Garcia, J.G.N. (2002) Biochem. Biophys. Res. Commun., **298**, 511–519.
45. Dudnakova, T.V., Lakomkin, V.L., Tsyplenkova, V.G., Shekhonin, B.V., Shirinsky, V.P., Kapelko, V.I. (2002) J. Cardiovasc. Pharmacol., in press.
46. Edelman, A.M., Takio, K., Blumenthal, D.K., Hansen, R.S., Walsh, K.A., Titani, K., Krebs, E.G. (1985) J. Biol. Chem., **260**, 11275–11285.
47. Edwards, R.A., Walsh, M.P., Sutherland, C., Vogel, H.J. (1998) Biochem. J., **331**, 149–152.
48. Fasolo, M., Cavallini, P., Dalla Libera, L. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun., **175**, 277–284.
49. Filenko, A.M., Danilova, V.M., Sobieszek, A. (1997) Biophys. J., **73**, 1593–1606.
50. Fincham, V.J., James, M., Frame, M.C., Winder, S.J. (2000) EMBO J., **19**, 2911–2923.
51. Fisher, S.A., Ikebe, M. (1995) Biochem. Biophys. Res. Commun., **217**, 696–703.
52. Fitzsimons, D.P., Herring, B.P., Stull, J.T., Gallagher, P.J. (1992) J. Biol. Chem., **267**, 23903–23909.
53. Foster, C.J., Johnston, S.A., Sunday, B., Gaeta, F.C. (1990) Arch. Biochem. Biophys., **280**, 397–404.
54. Foster, C., Van Fleet, M., Marshak, A. (1986) Arch. Biochem. Biophys., **251**, 616–623.
55. Foyt, H.L., Guerriero, V.Jr., Means, A.R. (1985) J. Biol. Chem., **260**, 7765–7774.
56. Foyt, H.L., Means, A.R. (1985) J. Cyclic. Nucleotide Protein Phosphorylation Res., **260**, 8978–8983.
57. Gallagher, P.J., Garcia, J.G., Herring, B.P. (1995) J. Biol. Chem., **270**, 29090–29095.
58. Gallagher, P.J., Herring, B.P. (1991) J. Biol. Chem., **266**, 23945–23952.
59. Gallagher, P.J., Herring, B.P., Griffin, S.A., Stull, J.T. (1991) J. Biol. Chem., **266**, 23936–23944.
60. Gallagher, P.J., Herring, B.P., Trafny, A., Sowadski, J., Stull, J.T. (1993) J. Biol. Chem., **268**, 26578–26582.
61. Gallagher, P.J., Stull, J.T. (1997) Mol. Cell. Biochem., **173**, 51–57.
62. Garcia, J.G., Davis, H.W., Patterson, C.E. (1995) J. Cell. Physiol. **163**, 510–522.
63. Geuss, U., Mayr, G.W., Heilmeyer, L.M. Jr. (1985) Eur. J. Biochem., **153**, 327–334.
64. Gilbert-McClain, L.I., Verin, A.D., Shi, S., Irwin, R.P., Garcia, J.G. (1998) J. Cell. Biochem., **70**, 141–155.
65. Gillis, J.M., Cao, M.L., Godfraind-De Becker, A. (1988) J. Muscle. Res. Cell Motil., **9**, 18–29.
66. Goeckeler, Z.M., Masaracchia, R.A., Zeng, Q., Chew, T.L., Gallagher, P.J., Wyszolmerski, R.B. (2000) J. Biol. Chem., **275**, 18366–18374.
67. Goldberg, J., Nairn, A.C., Kuriyan, J. (1996) Cell, **84**, 875–887.
68. Greaser, M. (2001) Proteins, **43**, 145–149.
69. Gregorio, C.C., Granzier, H., Sori-machi, H., Labeit, S. (1999) Curr. Opin. Cell Biol., **11**, 18–25.
70. Guerriero, V. Jr., Rowley, D.R., Means, A.R. (1981) Cell, **27**, 449–458.
71. Guerriero, V. Jr., Russo, M.A., Olson, N.J., Putkey, J.A., Means, A.R. (1986) Biochemistry, **25**, 8372–8381.
72. Hashimoto, Y., Sasaki, H., Togo, M., Tsukamoto, K., Horie, Y., Fukata, H., Watanabe, T., Kurokawa, K. (1994) Biochim. Biophys. Acta, **1223**, 163–169.
73. Hashimoto, Y., Soderling, T.R. (1990) Arch. Biochem. Biophys., **278**, 41–45.
74. Hatch, V., Zhi, G., Smith, L., Stull, J.T., Craig, R., Lehman, W. (2001) J. Cell. Biol., **154**, 611–617.

75. Hathaway, D.R., Adelstein, R.S. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**, 1653–1657.
76. Hayakawa, K., Okagaki, T., Higashi-Fujime, S., Kohama, K. (1994) Biochem. Biophys. Res. Commun., **199**, 786–791.
77. Heidorn, D.B., Seeger, P.A., Rokop, S.E., Blumenthal, D.K., Means, A.R., Crespi, H., Trewthella, J. (1989) Biochemistry, **28**, 6757–6764.
78. Herring, B.P. (1991) J. Biol. Chem., **266**, 11838–11841.
79. Herring, B.P., Dixon, S., Gallagher, P.J. (2000) Am. J. Physiol., **279**, C1656–C1664.
80. Herring, B.P., Fitzsimons, D.P., Stull, J.T., Gallagher, P.J. (1990) J. Biol. Chem., **265**, 16588–16591.
81. Herring, B.P., Gallagher, P.J., Stull, J.T. (1992) J. Biol. Chem., **267**, 25945–25950.
82. Herring, B.P., Lyons, G.E., Hoggatt, A.M., Gallagher, P.J. (2001) Am. J. Physiol., **280**, C12–C21.
83. Herring, B.P., Nunnally, M.H., Gallagher, P.J., Stull, J.T. (1989) Am. J. Physiol., **256**, C399–404.
84. Herring, B.P., Smith, A.F. (1996) Am. J. Physiol., **270**, C1656–1665.
85. Herring, B.P., Stull, J.T., Gallagher, P.J. (1990) J. Biol. Chem., **265**, 1724–1730.
86. Hofmann, F., Ludwig, A., Pfeifer, A. (1994) In: Airway Smooth Muscle Biochemical Control of Contraction and Relaxation (Raeburn, D., Giembycz, M.A., eds), Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland, pp. 253–269.
87. Holden, H.M., Ito, M., Hartshorne, D.J., Rayment, I. (1992) J. Mol. Biol., **227**, 840–851.
88. Horowitz, A., Menice, C.B., Laporte, R., Morgan, K.G. (1996) Physiol. Rev., **76**, 967–1003.
89. Hosoya, H., Yamashiro, S., Matsuura, F. (1991) J. Biol. Chem., **266**, 22173–22178.
90. Hu, S.H., Parker, M.W., Lei, J.Y., Wilce, M.C., Benian, G.M., Kemp, B.E. (1994) Nature, **369**, 581–584.
91. Ikebe, M., Hartshorne, D.J. (1985) J. Biol. Chem., **260**, 10027–10031.
92. Ikebe, M., Hartshorne, D.J. (1986) J. Biol. Chem., **261**, 8249–8253.
93. Ikebe, M., Hartshorne, D.J., Elzinga, M. (1986) J. Biol. Chem., **261**, 36–39.
94. Ikebe, M., Hinkins, S., Hartshorne, D.J. (1983) Biochemistry, **22**, 4580–4587.
95. Ikebe, M., Inagaki, M., Kanamaru, K., Hidaka, H. (1985) J. Biol. Chem., **260**, 4547–4550.
96. Ikebe, M., Maruta, S., Reardon, S. (1989) J. Biol. Chem., **264**, 6967–6971.
97. Ikebe, M., Morita, J. (1991) J. Biol. Chem., **266**, 21339–21342.
98. Ikebe, M., Reardon, S. (1990) J. Biol. Chem., **265**, 8975–8978.
99. Ikebe, M., Reardon, S., Fay, F.S. (1992) FEBS Lett., **312**, 245–248.
100. Ikebe, M., Reardon, S., Schwonek, J.P., Sanders, C.R., Ikebe, R. (1994) J. Biol. Chem., **269**, 28165–28172.
101. Ikebe, M., Stepinska, M., Kemp, B.E., Means, A.R., Hartshorne, D.J. (1987) J. Biol. Chem., **262**, 13828–13834.
102. Ikura, M., Clore, G.M., Gronenborn, A.M., Zhu, G., Klee, C.B., Bax, A. (1992) Science, **256**, 632–638.
103. Ilsley, J.L., Sudol, M., Winder, S.J. (2002) Cell. Signalling, **14**, 183–189.
104. Ito, M., Dabrowska, R., Guerriero, V.Jr., Hartshorne, D.J. (1989) J. Biol. Chem., **264**, 13971–13974.
105. Ito, M., Guerriero, V.Jr., Chen, X.M., Hartshorne, D.J. (1991) Biochemistry, **30**, 3498–3503.
106. Johnson, J.D., Holroyde, M.J., Crouch, T.H., Solaro, R.J., Potter, J.D. (1981) J. Biol. Chem., **256**, 12194–12198.
107. Johnson, J.D., Snyder, C., Walsh, M., Flynn, M. (1996) J. Biol. Chem., **271**, 761–767.

108. *Kamisoyama, H., Araki, Y., Ikebe, M.* (1994) *Biochemistry*, **33**, 840–847.
109. *Kamm, K.E., Grange, R.W.* (1996) In: *Biochemistry of Smooth Muscle Contraction* (Barany, M., ed.), Academic Press, New York, pp. 119–129.
110. *Kanoh, S., Ito, M., Niwa, E., Kawano, Y., Hartshorne, D.J.* (1993) *Biochemistry*, **32**, 8902–8907.
111. *Kasturi, R., Vasulka, C., Johnson, J.D.* (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 7958–7964.
112. *Kelley, C.A., Takahashi, M., Yu, J.H., Adelstein, R.S.* (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 12848–12854.
113. *Kemp, B.E., Pearson, R.B.* (1985) *J. Biol. Chem.*, **260**, 3355–3359.
114. *Kemp, B.E., Pearson, R.B., Guerriero, V.Jr., Bagchi, I.C., Means, A.R.* (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 2542–2548.
115. *Kemp, B.E., Pearson, R.B., House, C.* (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 7471–7475.
116. *Kennelly, P.J., Leng, J., Marchand, P.* (1992) *Biochemistry*, **31**, 5394–5399.
117. *Kerrick, W.G., Bourguignon, L.Y.* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 165–169.
118. *Kishi, H., Mikawa, T., Seto, M., Sasaki, Y., Kanayasu-Toyoda, T., Yamaguchi, T., Imamura, M., Ito, M., Karaki, H., Bao, J., Nakamura, A., Ishikawa, R., Kohama, K.* (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 1414–1420.
119. *Klemke, R.L., Cai, S., Giannini, A.L., Gallagher, P.J., de Lanerolle, P., Cheresh, D.A.* (1997) *J. Cell. Biol.*, **137**, 481–492.
120. *Knighton, D.R., Zheng, J.H., Ten Eyck, L.F., Ashford, V.A., Xuong, N.H., Taylor, S.S., Sowański, J.M.* (1991) *Science*, **253**, 407–414.
121. *Kobayashi, H., Inoue, A., Mikawa, T., Kuwayama, H., Hotta, Y., Masaki, T., Ebashi, S.* (1992) *J. Biochem.*, **112**, 786–791.
122. *Kohama, K., Okagaki, T., Hayakawa, K., Lin, Y., Ishikawa, R., Shimmen, T., Inoue, A.* (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **184**, 1204–1211.
123. *Kolodney, M.S., Elson, E.L.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 10252–10256.
124. *Komatsu, H., Ikebe, M.* (1993) *Biochem. J.*, **296**, 53–58.
125. *Komatsu, S., Miyazaki, K., Tuft, R.A., Ikebe, M.* (2002) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **283**, C752–761.
126. *Krueger, J.K., Gallagher, S.C., Zhi, G., Geguchadze, R., Persechini, A., Stull, J.T., Trehwella, J.* (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 4535–4538.
127. *Krueger, J.K., Olah, G.A., Rokop, S.E., Zhi, G., Stull, J.T., Trehwella, J.* (1997) *Biochemistry*, **36**, 6017–6023.
128. *Krueger, J.K., Padre, R.C., Stull, J.T.* (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 16848–16853.
129. *Krueger, J.K., Zhi, G., Stull, J.T., Trehwella, J.* (1998) *Biochemistry*, **37**, 13997–14004.
130. *Krymsky, M.A., Kudryashov, D.S., Shirinsky, V.P., Lukas, T.J., Watterson, D.M., Vorotnikov, A.V.* (2001) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **22**, 425–437.
131. *Kudryashov, D.S., Chibalina, M.V., Birukov, K.G., Lukas, T.J., Sellers, J.R., Van Eldik, L.J., Watterson, D.M., Shirinsky, V.P.* (1999) *FEBS Lett.*, **463**, 67–71.
132. *Kudryashov, D.S., Vorotnikov, A.V., Dudnakova, T.V., Stepanova, O.V., Lukas, T.J., Sellers, J.R., Watterson, D.M., Shirinsky, V.P.* (2002) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **23**, 341–351.
133. *Lazar, V., Garcia, J.G.* (1999) *Genomics*, **572**, 56–67.
134. *Lazarides, E., Burridge, K.* (1975) *Cell*, **6**, 289–298.
135. *Leachman, S.A., Gallagher, P.J., Herring, B.P., McPhaul, M.J., Stull, J.T.* (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 4930–4938.
136. *Lin, P., Luby-Phelps, K., Stull, J.T.* (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 5987–5994.
137. *Lu, K.P., Liou, Y.-C., Zhou, X.Z.* (2002) *Trends Cell Biol.*, **12**, 164–172.

138. *Lukas, T.J., Redelfs, A., Burgess, W.H., Watterson, D.M.* (1985) *Arch. Biochem. Biophys.*, **238**, 664–669.
139. *MacDonald, J.A., Walker, L.A., Nakamoto, R.K., Gorenne, I., Somlyo, A.V., Somlyo, A.P.* (2000) *FEBS Lett.*, **479**, 83–88.
140. *Mansfield, P.J., Shayman, J.A., Boxer, L.A.* (2000) *Blood*, **95**, 2407–2412.
141. *Marston, S.B., Redwood, C.S.* (1991) *Biochem. J.*, **279**, 1–16.
142. *Masato, T., Numata, T., Katoh, T., Morita, F., Yazawa, M.* (1997) *J. Biochem. (Tokyo)*, **121**, 225–230.
143. *Matsushima, S., Huang, Y.P., Dudas, C.V., Guerriero, V.Jr., Hartshorne, D.J.* (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **202**, 1329–1336.
144. *Meador, W.E., Means, A.R., Quiocho, F.A.* (1992) *Science*, **257**, 1251–1255.
145. *Minajeva, A., Neagoe, C., Kulke, M., Linke, W.A.* (2002) *J. Physiol.*, **540**, 177–188.
146. *Morrison, D.L., Sanghera, J.S., Stewart, J., Sutherland, C., Walsh, M.P., Pelech, S.L.* (1996) *Biochem. Cell Biol.*, **74**, 549–557.
147. *Mrwa, U., Hartshorne, D.J.* (1980) *Fed. Proc.*, **39**, 1564–1568.
148. *Nguyen, D.H., Catling, A.D., Webb, D.J., Sankovic, M., Walker, L.A., Somlyo, A.V., Weber, M.J., Gonias, S.L.* (1999). *J. Cell Biol.*, **146**, 149–164.
149. *Nieznanski, K., Sobieszek, A.* (1997) *Biochem. J.*, **322**, 65–71.
150. *Nishikawa, M., de Lanerolle, P., Lincoln, T.M., Adelstein, R.S.* (1984) *J. Biol. Chem.*, **259**, 8429–8436.
151. *Nishikawa, M., Shirakawa, S., Adelstein, R.S.* (1985) *J. Biol. Chem.*, **260**, 8978–8983.
152. *Numata, T., Katoh, T., Yazawa, M.* (2001) *J. Biochem. (Tokyo)*, **129**, 437–444.
153. *Nunnally, M.H., Stull, J.T.* (1984) *J. Biol. Chem.*, **259**, 1776–1780.
154. *Okagaki, T., Hayakawa, K., Samizo, K., Kohama, K.* (1999) *J. Biochem. (Tokyo)*, **125**, 619–626.
155. *Okagaki, T., Nakamura, A., Suzuki, T., Ohmi, K., Kohama, K.* (2000) *J. Cell Biol.*, **148**, 653–663.
156. *Olson, N.J., Pearson, R.B., Needleman, D.S., Hurwitz, M.Y., Kemp, B.E., Means, A.R.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 2284–2288.
157. *Olwin, B.B., Edelman, A.M., Krebs, E.G., Storm, D.R.* (1984) *J. Biol. Chem.*, **259**, 10949–10955.
158. *Padre, R.C., Stull, J.T.* (2000) *FEBS Lett.*, **472**, 148–152.
159. *Pato, M.D., Adelstein, R.S.* (1980) *J. Biol. Chem.*, **255**, 6535–6538.
160. *Pato, M.D., Kerc, E., Lye, S.J.* (1995) *Mol. Cell. Biochem.*, **149/150**, 59–69.
161. *Pearson, R.B., Ito, M., Morrice, N.A., Smith, A.J., Condron, R., Wettenhall, R.E., Kemp, B.E., Hartshorne, D.J.* (1991) *Eur. J. Biochem.*, **200**, 723–730.
162. *Pearson, R.B., Misconi, L.Y., Kemp, B.E.* (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 25–27.
163. *Pearson, R.B., Wettenhall, R.E., Means, A.R., Hartshorne, D.J., Kemp, B.E.* (1988) *Science*, **241**, 970–973.
164. *Persechini, A., Gansz, K.J., Paresi, R.J.* (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 19279–19282.
165. *Persechini, A., Hartshorne, D.J.* (1981) *Science*, **213**, 1383–1385.
166. *Persechini, A., Hartshorne, D.J.* (1983) *Biochemistry*, **22**, 470–476.
167. *Persechini, A., Stull, J.T.* (1984) *Biochemistry*, **23**, 4144–41450.
168. *Persechini, A., McMillan, K., Leakey, P.* (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 16148–16154.
169. *Pfützer, G.* (2001) *J. Appl. Physiol.*, **91**, 497–503.
170. *Pires, E., Perry, S.V., Thomas, M.A.* (1974) *FEBS Lett.*, **41**, 292–296.

171. Pires, E.M., Perry, S.V. (1977) *Biochem. J.*, **167**, 137–146.
172. Poperechnaya, A., Varlamova, O., Lin, P.J., Stull, J.T., Bresnick, A.R. (2000) *J. Cell. Biol.*, **151**, 697–708.
173. Potier, M.C., Chelot, E., Pekarsky, Y., Gardiner, K., Rossier, J., Turnell, W.G. (1995) *Genomics*, **29**, 562–570.
174. Rayment, I., Rypniewski, W.R., Schmidt-Base, K., Smith, R., Tomchick, D.R., Benning, M.M., Winkelmann, D.A., Wesenberg, G., Holden, H.M. (1993) *Science*, **261**, 50–58.
175. Reddy, Y.S., Wyborny, L.E. (1979) *Tex. Rep. Biol. Med.*, **39**, 79–90.
176. Rembold, C.M. (1992) *Hypertension*, **20**, 129–137.
177. Roush, C.L., Kennelly, P.J., Glaccum, M.B., Helfman, D.M., Scott, J.D., Krebs, E.G. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 10510–10516.
178. Rusconi, F., Potier, M.C., Le Caer, J.P., Schmitter, J.M., Rossier, J. (1997) *Biochemistry*, **36**, 11021–11026.
179. Samizo, K., Okagaki, T., Kohama, K. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **261**, 95–99.
180. Sanders, L.C., Matsumura, F., Bokoch, G.M., de Lanerolle, P. (1999) *Science*, **283**, 2083–2085.
181. Schaller, M.D., Borgman, C.A., Parsons, J.T. (1993) *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 785–791.
182. Sellers, J.R., Adelstein, R.S. (1987) In: *The Enzymes* (Boyer, P.D., ed), Academic Press, Orlando, vol. XVIII, pp. 381–418.
183. Sellers, J.R., Harvey, E.V. (1984) *Biochemistry*, **23**, 5821–5826.
184. Sellers, J.R., Pato, M.D. (1984) *J. Biol. Chem.*, **259**, 7740–7746.
185. Shirinsky, V.P., Vorotnikov, A.V., Birukov, K.G., Nanaev, A.K., Collinge, M., Lukas, T.J., Sellers, J.R., Watterson, D.M. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 16578–16583.
186. Shoemaker, M.O., Lau, W., Shattuck, R.L., Kwiatkowski, A.P., Matrisian, P.E., Guerra-Santos, L., Wilson, E., Lukas, T.J., Van Eldik, L.J., Watterson, D.M. (1990) *J. Cell. Biol.*, **111**, 1107–1125.
187. Silver, D.L., Vorotnikov, A.V., Watterson, D.M., Shirinsky, V.P., Sellers, J.R. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 25353–25359.
188. Smith, J.L., Silveira, L.A., Spudich, J.A. (1996) *EMBO J.*, **15**, 6075–6083.
189. Smith, L., Parizi-Robinson, M., Zhu, M.S., Zhi, G., Fukui, R., Kamm, K.E., Stull, J.T. (2002) *J. Biol. Chem.*, *in press*.
190. Smith, L., Stull, J.T. (2000) *FEBS Lett.*, **480**, 298–300.
191. Smith, L., Su, X., Lin, P., Zhi, G., Stull, J.T. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 29433–29438.
192. Sobieszek, A. (1977) *CaEur. J. Biochem.*, **73**, 477–483.
193. Sobieszek, A. (1991) *Eur. J. Biochem.*, **199**, 735–743.
194. Sobieszek, A. (1995) *Biochemistry*, **34**, 11855–11863.
195. Somlyo, A.V., Butler, T.M., Bond, M., Somlyo, A.P. (1981) *Nature*, **294**, 567–569.
196. Somlyo, A.P., Somlyo, A.V. (1994) *Nature*, **372**, 231–236.
197. Somlyo, A.P., Somlyo, A.V. (2000) *J. Physiol.*, **522**, 177–185.
198. Squire, J. (1981) *The structural basis of muscular contraction*, Plenum Press, New York.
199. Stull, J.T., Hsu, L.C., Tansey, M.G., Kamm, K.E. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 16683–16690.
200. Stull, J.T., Tansey, M.G., Tang, D.-C., Word, R.A., Kamm, K.E., and Tang, D.C. (1993) *Mol. Cell. Biochem.*, **127/128**, 229–237.
201. Sudol, M., Hunter, T. (2000) *Cell*, **103**, 1001–1004.
202. Suzuki, H., Onishi, H., Takahashi, K., Watanabe, S. (1978) *J. Biochem.*, (Tokyo), **84**, 1529–1542.
203. Sweeney, H.L., Bowman, B.F., Stull, J.T. (1993) *Am. J. Physiol.*, **264**, C1085–1095.

204. Takahashi, M., Kawamoto, S., Adelstein, R.S. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 17864–17871.
205. Takio, K., Blumenthal, D.K., Edelman, A.M., Walsh, K.A., Krebs, E.G., Titani, K. (1985) *Biochemistry*, **24**, 6028–6037.
206. Tan, J.L., Spudich, J.A. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 16044–16049.
207. Tanaka, M., Ikebe, R., Matsuura, M., Ikebe, M. (1995) *EMBO J.*, **14**, 2839–2846.
208. Tanaka, T., Sobue, K., Owada, M.K., Hakura, A. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **131**, 987–993.
209. Tansley, M.G., Word, R.A., Hidaka, H., Singer, H.A., Schworer, C.M., Kamm, K.E., Stull, J.T. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 12511–12516.
210. Taylor, S.S., Radzio-Andzelm, E. (1994) *Structure*, **2**, 345–355.
211. Tohtong, R., Rodriguez, D., Maughan, D., Simcox, A. (1997) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **18**, 43–56.
212. Tokui, T., Ando, S., Ikebe, M. (1995) *Biochemistry*, **34**, 5173–5179.
213. Totsukawa, G., Yamakita, Y., Yamashiro, S., Hosoya, H., Hartshorne, D.J., Matsumura, F. (1999) *J. Cell Biol.*, **144**, 735–744.
214. Toyoshima, Y.Y., Kron, S.J., McNally, E.M., Niebling, K.R., Toyoshima, C., Spudich, J.A. (1987) *Nature*, **328**, 536–539.
215. Trinick, J., Tskhovrebova, L. (1999) *Trends Cell Biol.*, **9**, 377–380.
216. Trotter, J.A., Adelstein, R.S. (1979) *J. Biol. Chem.*, **254**, 8781–8785.
217. Trybus, K.M., Huiatt, T.W., Lowey, S. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6151–6155.
218. Tsvetkov, P.O., Protasevich, I.I., Gilli, R., Lafitte, D., Lobachov, V.M., Haiech, J., Briand, C., Makarov, A.A. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 18161–18164.
219. Turner, J.R., Angle, J.M., Black, E.D., Joyal, J.L., Sacks, D.B., Madara, J.L. (1999) *Am. J. Physiol.*, **277**, C554–C562.
220. Verin, A.D., Lazar, V., Torry, R.J., Labarrere, C.A., Patterson, C.E., Garcia, J.G. (1998) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **19**, 758–766.
221. Vorotnikov, A.V. (1997) *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **29**, 727–730.
222. Vorotnikov, A.V., Silver, D.L., Sellers, J.R., Watterson, D.M., Shirinsky, V.P. (1996) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **17**, 153a.
223. Walker, L.A., MacDonald, J.A., Liu, X., Nakamoto, R.K., Haystead, T.A., Somlyo, A.V., Somlyo, A.P. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 24519–24524.
224. Walsh, M.P., Dabrowska, R., Hinkins, S., Hartshorne, D.J. (1982) *Biochemistry*, **21**, 1919–1925.
225. Watterson, D.M., Collinge, M., Lukas, T.J., Van Eldik, L.J., Birukov, K.G., Stepanova, O.V., Shirinsky, V.P. (1995) *FEBS Lett.*, **373**, 217–220.
226. Watterson, D.M., Schavocky, J.P., Guo, L., Weiss, C., Chlenski, A., Shirinsky, V.P., Van Eldik, L.J., Haiech, J. (1999) *J. Cell. Biochem.*, **75**, 481–491.
227. Weed, S.A., Parsons, J.T. (2001) *Oncogene*, **20**, 6418–6434.
228. Wendt, T., Taylor, D., Messier, T., Trybus, K.M., Taylor, K.A. (1999) *J. Cell Biol.*, **147**, 1385–1390.
229. Wendt, T., Taylor, D., Trybus, K.M., Taylor, K. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 4361–4366.
230. Wilson, K.P., Fitzgibbon, M.J., Caron, P.R., Griffith, J.P., Chen, W., McCaffrey, P.G., Chambers, S.P., Su, M.S. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 27696–27700.
231. Wu, X., Haystead, T.A., Nakamoto, R.K., Somlyo, A.V., Somlyo, A.P. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 11362–11369.
232. Wysolmerski, R.B. and Lagunoff, D. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 16–20.
233. Xie, X., Harrison, D.H., Schlichting, I., Sweet, R.M., Kalabokis, V.N., Szent-Gyorgyi, A.G., Cohen, C. (1994) *Nature*, **368**, 306–312.

234. Xu, J.-Q., Gillis, J.-M., Craig, R. (1997) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **18**, 381–393.
235. Yamakita, Y., Yamashiro, S., Matsumura, F. (1994) *J. Cell. Biol.*, **124**, 129–137.
236. Yamashiro, S., Yamakita, Y., Hosoya, H., Matsumura, F. (1991) *Nature*, **349**, 169–172.
237. Yamazaki, K., Itoh, K., Sobue, K., Mori, T., Shibata, N. (1987) *J. Biochem. (Tokyo)*, **101**, 1–9.
238. Yazawa, M., Yagi, K. (1978) *J. Biochem. (Tokyo)*, **84**, 1259–1265.
239. Ye, L.H., Hayakawa, K., Kishi, H., Imamura, M., Nakamura, A., Okagaki, T., Takagi, T., Iwata, A., Tanaka, T., Kohama, K. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 32182–32189.
240. Yoshikay, S., Ikebe, M. (1992) *Arch. Biochem. Biophys.*, **299**, 242–247.
241. Zhang, Y., Niu, Z., Cohen, A.J., Nah, H.-D., Adams, S.L. (1997) *Nucleic Acid Res.*, **25**, 2470–2477.
242. Zhi, G., Herring, B.P., Stull, J.T. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 24723–24727.