

Ca-АТРаза САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА: МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ, МЕХАНИЗМ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ И ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ

© 2005 г.

А. М. РУБЦОВ

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Москва*

I. Введение. II. Мембранные препараты саркоплазматического ретикулума. III. Структура молекулы Ca-АТРаза. IV. Реакционный цикл Ca-АТРаза. V. Конформационная подвижность молекулы Ca-АТРаза. VI. Особенности кинетики Ca-АТРаза. VII. Олигомерная организация Ca-АТРаза. VIII. Регуляция активности Ca-АТРаза. IX. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Еще 15—20 лет назад можно было составить список клеток, основные функции которых регулируются изменением уровня свободного кальция в цитоплазме. В настоящее время можно сказать, что практически во всех типах клеток наблюдаются периодические изменения концентрации цитоплазматического Ca^{2+} — от 10^{-8} — 10^{-7} М до 10^{-6} — 10^{-5} М, которые индуцируются различными физиологически активными агентами и обеспечивают, регулируют или, по крайней мере, сопровождают проявление основных функций клеток данного типа. Обычно эти изменения кратковременны, и после прекращения действия сигнала клетка быстро возвращается в состояние функционального покоя. Совершенно очевидно, что подавляющее большинство

Принятые сокращения: а.о. — аминокислотный остаток; СР — саркоплазматический ретикулум; ФЛ — фосфолипиды; АМРРСП — β , γ - CH_2 -АТР; СаМ — кальмодулин; FГТС — флуоресцеинизотиоцианат; ТГ — тапсигаргин.

Адрес для корреспонденции: am_rubtsov@mail.ru

Работа поддержана грантом РФФИ 03-04-48661.

клеток имеет специальные системы, которые в покое поддерживают внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} на низком уровне и обеспечивают его быстрое удаление после прекращения действия внешнего сигнала (1), системы, которые в ответ на этот сигнал обеспечивают вход Ca^{2+} в клетку из окружающей среды или его освобождение из внутриклеточных источников (2), а также системы, которые отвечают на изменение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} изменением своей функциональной активности (3). Первые два типа систем представлены мембранными белками — Са-каналами и Са-насосами, тогда как последняя подразумевает существование в цитоплазме специальных белков, которые при связывании Ca^{2+} изменяют свою активность и регулируют различные внутриклеточные процессы. В настоящее время такие системы хорошо известны, причем, несмотря на огромное разнообразие клеток и выполняемых ими функций, они достаточно универсальны и имеют много общих свойств.

Поддержание низкой концентрации Ca^{2+} в цитоплазме большинства типов клеток обеспечивается работой специальных мембранных ферментов — Са-АТРаза или Са-насосов плазматической мембраны и сарко(эндо)плазматического ретикулума, которые способны переносить через мембрану 2 иона Ca^{2+} против градиента его концентрации за счет гидролиза 1 молекулы АТФ. Особенности организации, функционирования и регуляции Са-АТРаза саркоплазматического ретикулума и посвящен настоящий обзор.

Несмотря на то, что этот фермент был открыт в начале 60-х годов и интенсивно изучался в 70–90-е годы XX века, он продолжает привлекать внимание специалистов, так как Са-АТРаза, благодаря сравнительной простоте выделения, очистки и реконструкции, является очень удобным объектом для исследования молекулярных механизмов функционирования и регуляции мембранных машин, использующих освобождаемую при гидролизе АТФ химическую энергию для переноса ионов через биологические мембраны, а также потому, что разные изоформы Са-АТРаза играют ключевую роль в обмене Ca^{2+} в большинстве клеток и тканей.

II. МЕМБРАННЫЕ ПРЕПАРАТЫ САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА

Саркоплазматический ретикулум (СР) был обнаружен в мышечных клетках с помощью светового микроскопа и описан еще в XIX веке, а в конце 40-х годов XX века его фрагменты были впервые выделены Кейли и Мейергофом в процессе изучения АТРазной активности мышечной ткани [1]. Несколько позже было установлено, что

так называемый расслабляющий фактор Марша, способный разрушать актомиозиновый комплекс в экспериментах *in vitro*, удаляя из среды ионы Ca^{2+} , представляет собой не что иное, как фрагменты СР [2]. Предположение о присутствии в мембранах ретикулума кальциевого насоса, регулирующего концентрацию свободного кальция внутри мышечной клетки за счет энергии, выделяющейся в ходе гидролиза АТФ, вскоре получило экспериментальное подтверждение [3].

Саркоплазматический ретикулум представляет собой замкнутую систему сообщающихся друг с другом цистерн, пузырьков и трубочек, пронизывающих цитоплазму мышечной клетки в непосредственной близости от миофибрилл. В ответ на деполяризацию сарколеммы, возникающую при проведении нервного импульса, в цитоплазму через Са-каналы (рианодиновые рецепторы) СР выходит Ca^{2+} , инициирующий образование актомиозинового комплекса, что приводит к мышечному сокращению [4]. Увеличение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме, в свою очередь, активирует Са-АТРаза, которая обеспечивает аккумуляцию Ca^{2+} во внутренних полостях ретикулума, в результате чего происходит снижение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме, взаимодействие между актином и миозином блокируется и наступает расслабление мышцы [4, 5].

Морфологически и функционально СР можно разделить на 2 отдела: продольные трубочки, окружающие миофибриллы, и терминальные цистерны, находящиеся в тесном контакте с трубочками Т-системы, которые представляют собой впячивания сарколеммы (рис. 1). Терминальные цистерны СР и Т-трубочки сарколеммы соединены между собой гидрофильным доменом молекулы Са-канала (рианодинового рецептора) СР, который виден на электронных микрофотографиях и получил название белка «соединительных ножек» [6, 7].

Препараты СР получают из гомогенатов скелетных мышц методом дифференциального центрифугирования, проводя выделение в изотоническом растворе NaCl или сахарозы и собирая фракцию, осаждаемую между 20000 и 40000×g [8–10]. Полученные пре-

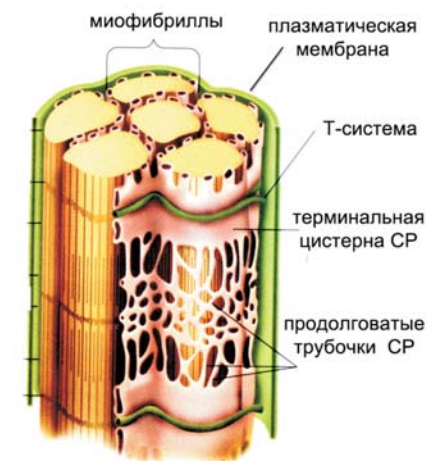


Рис. 1. Схема строения мышечного волокна, иллюстрирующая расположение в клетке разных отделов СР.

параты представляют собой замкнутые везикулы диаметром 80–150 мкм [11]. При дальнейшем центрифугировании в градиенте плотности сахарозы на основании их седиментационных свойств препарат СР можно разделить на 2 фракции — легкую и тяжелую. Легкая фракция состоит, в основном, из фрагментов продольных трубочек, а тяжелая — из фрагментов терминальных цистерн [6, 12]. Исследования белкового состава и процессов аккумуляции и выхода Ca^{2+} из СР показали, что разные отделы СР отвечают за разные этапы регуляции мышечного сокращения: терминальные цистерны обеспечивают выброс Ca^{2+} в ходе мышечного сокращения и обогащены Са-каналами СР (рианодинowymi рецепторами), а продольные трубочки осуществляют аккумуляцию Ca^{2+} на стадии расслабления и характеризуются высоким содержанием Са-АТРаза [4, 13].

Получаемые методом дифференциального центрифугирования препараты СР содержат липиды в соотношении ~0,5 мг/мг белка СР [10, 12]. Около 80% липидной фракции представлено фосфолипидами (ФЛ), нейтральные липиды представлены преимущественно триглицеридами, а также холестерином. Из общего количества ФЛ 65–73% составляет фосфатидилхолин, 12–19% — фосфатидилэтанол-амин, ~4% — сфингомиелин и 0,1–0,3% — кардиолипид [10, 12]. Липиды мембран СР играют не только структурную, но и регуляторную роль. Удаление ФЛ приводит к полной инактивации Са-АТРаза, а для восстановления её активности необходимо, чтобы с одной молекулой фермента связалось около 30 молекул ФЛ [14]. Вместо фосфолипидов для реактивации фермента можно использовать и неионные детергенты, причем степень восстановления активности Са-АТРаза зависит от величины коэффициента НЛВ (гидрофильно-липофильного баланса) используемого детергента [15]. Изучение взаимодействия между белком Са-АТРаза и детергентами показало, что гидрофильные группы детергентов непосредственно контактируют с полярными аминокислотными остатками, которые находятся на границе между гидрофобными и гидрофильными доменами, что говорит о важной роли гидрофильных полярных групп липидов в поддержании нативной структуры и активности фермента [16]. Кроме того, отрицательно заряженные ФЛ (фосфатидилинозитол, фосфатидилсерин) активируют гидролиз АТФ и аккумуляцию ионов Ca^{2+} [17, 18].

Фосфолипиды мембран СР асимметрично локализованы в бислое. С использованием флуоресцентных меток было установлено, что 70–80% фосфатидилэтаноламина расположено на внешней стороне мембраны и лишь 20–30% этого фосфолипида находится во внутреннем монослое мембраны, а фосфатидилсерин, недоступный для флуоресцентных меток, локализован преимущественно на внутренней по-

верхности мембран СР. Количество фосфатидилхолина по обе стороны мембраны примерно одинаково, а сфингомиелин находится, главным образом, во внутреннем монослое мембран ретикулума [19].

III. СТРУКТУРА МОЛЕКУЛЫ Са-АТРаза

Са-АТРаза (АТФ-фосфогидролаза, ЕС 3.6.1.38) СР относится к обширному семейству ион-транспортующих АТРАЗ Р-типа (или Е1–Е2-типа), к которому принадлежат также Na,К- и Са-АТРаза плазматических мембран, Н,К-АТРаза слизистой желудка и ряд других АТРАЗ, играющих важную роль в жизни клеток [20]. Эти ферменты обеспечивают трансмембранный перенос катионов против их электрохимического градиента за счет энергии, освобождающейся при гидролизе АТФ. В ходе реакционного цикла образуется промежуточный фосфорилированный интермедиат фермента (отсюда название «АТРАЗ Р-типа») вследствие переноса терминального фосфорильного остатка АТФ на остаток аспарагиновой кислоты активного центра АТРаза [20, 21]. После фосфорилирования фермента его конформация изменяется из состояния Е1 в Е2 (отсюда название «АТРАЗ Е1–Е2-типа»), что сопровождается переносом ионов через мембрану.

Са-АТРаза сарко(эндо)плазматического ретикулума, или SERCA, представлена в разных тканях млекопитающих несколькими изоформами: SERCA1a (994 а.о.) и фетальная форма SERCA1b (1001 а.о.) — в быстрых скелетных мышцах, SERCA2a (997 а.о.) — в сердце, медленных скелетных и гладких мышцах, SERCA2b (1042 а.о.) — во многих типах клеток (так называемый «household» фермент) и SERCA3 (999 а.о.) — в клетках крови и различных эндотелиальных и эпителиальных тканях [20].

Молекула Са-АТРаза СР скелетных мышц расположена в мембране асимметрично: примерно 70% а.о. обращено в цитоплазму, 25% находится в мембране и 5% обращено внутрь полостей СР [22]. Согласно данным рентгеноструктурного анализа SERCA1 с разрешением в 2,6 Å [23], цитоплазматическая часть Са-АТРаза состоит из трех доменов: N-домена (нуклеотидсвязывающего), Р-домена (фосфорилируемого) и активаторного (или «заякоривающего») домена А (рис. 2). Центральную часть молекулы занимает Р-домен, который содержит фосфорилируемый в ходе реакционного цикла остаток Asp351. Этот домен состоит из двух частей: N-концевой (приблизительно между Asp330 и Asp359), которая соединена с трансмембранной спиралью М4, и С-концевой (между Lys605 и Asp737), соединенной с трансмембранной спиралью М5. Эти две части Р-домена, образованные семью слоями параллельных β-структур и восемью короткими спира-

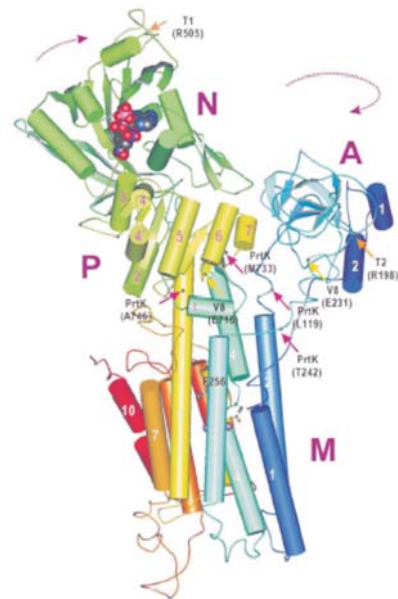


Рис. 2. Структура молекулы Са-АТРаза по данным рентгеноструктурного анализа [23].

α -Спирали показаны в виде цилиндров, β -складки — в виде плоских стрелок. Цвет молекулы фермента меняется от синего (N-конец) до красного (С-конец). Заглавными латинскими буквами А, N и Р обозначены гидрофильные домены (активаторный, нуклеотидсвязывающий и фосфорилируемый, соответственно), буквой М — гидрофобный трансмембранный домен. Пронумерованы α -спирали в доменах А, М и Р. В N-доме в виде атомной модели показана молекула связанного АТФ, а в гидрофобном домене — связанные ионы Ca^{2+} (в виде фиолетовых шариков за трансмембранной α -спиралью М3). Стрелками показаны аминокислотные остатки, атакуемые трипсином (Т, оранжевые стрелки), протеазой К (prtK, красные стрелки) и протеазой V8 (V8, желтые стрелки) [25]. Пунктирные стрелки показывают движение доменов N и А при конформационном переходе E1–E2 (объяснения в тексте).

лями, формируют Россмановскую складку. Фосфорилируемый остаток Asp351 находится в С-концевой части центральной β -структуры. Интересно отметить, что мутации Cys349, Lys352 и Thr353 не оказывают влияния на фосфорилирование фермента. Это говорит о том, что в непосредственном окружении фосфорилируемого остатка аспарагиновой кислоты допустимы определенные изменения [21, 24].

Нуклеотидсвязывающий домен (N-домен) — самый большой из трех цитоплазматических доменов, имеет молекулярную массу около 27 кДа. Этот домен сформирован остатками Gln360–Arg604, находящимися между двумя областями Р-домена. Он образован семью полосами антипараллельных β -структур и двумя спиральями, которые объединяют эти β -структуры в образование, напоминающее сэндвич. Домен А (также называемый β -доменом) — самый маленький из трех цитоплазматических доменов, его молекулярная масса около 16 кДа. Он состоит примерно из 110 а.о., которые формируют неупорядоченную структуру между трансмембранными спиральями М2 и М3, и 40 остатков N-концевой части фермента, которые формируют две короткие спирали. Этот домен связан с трансмембранной областью длинными петлями [23].

Участок фосфорилирования (Asp351) находится на расстоянии около 25 Å от нуклеотидсвязывающего центра. Это означает, что домены N и Р должны приблизиться друг к другу во время гидролиза АТФ. Действительно, ряд данных указывает на то, что N-домен в отсутствие Ca^{2+} находится в фиксированном состоянии, но становится подвижным в его присутствии и в результате конформационных изменений, которые индуцируются связыванием АТФ, N-домен приближается к Р-домону [25, 26].

Подробнее конформационные переходы Са-АТРаза будут рассмотрены ниже.

Трансмембранная часть фермента (М) состоит из 10 α -спиралей (М1–М10). Спирали М4, М5, М6 и М8 располагаются вокруг двух высокоплотных областей, которые были идентифицированы на основании данных рентгеноструктурного анализа как ионы кальция (рис. 2). Было установлено, что два участка связывания кальция находятся в мембране на одном уровне на расстоянии 5,7 Å друг от друга [23]. Первый участок связывания образуется за счет отрицательно заряженных боковых групп Asn768, Glu771 (М5), Thr799, Asp800 (М6) и Glu908 (М8). Второй участок связывания кальция сформирован осевыми карбонильными группами спирали М4: Val304, Ala305, Ile307 и боковыми кислородсодержащими группами: Asn796, Asp800 (М6) и Glu309 (М4). Таким образом, два участка связывания Ca^{2+} фермента в конформации E1– Ca^{2+} находятся в непосредственной близости друг от друга и образованы четырьмя спиральями (М4, М5, М6 и М8), две из которых находятся в частично деспирализованном состоянии для более эффективного связывания кальция [27, 28]. Данные рентгеноструктурного анализа о длине и расположении трансмембранных спиралей молекулы Са-АТРаза несколько расходятся с выводами, сделанными на основе анализа первичной структуры молекулы фермента [27]. Так, толщина гидрофобного домена молекулы Са-АТРаза меньше толщины фосфолипидного бислоя мембраны СР (примерно 30–32 Å) и составляет около 21 Å. Об этом говорит расстояние между остатками триптофана в спиральях М4, М7, М9, М10 и Lys262, локализованными на цитоплазматической поверхности мембраны СР, и остатком Lys972, который экспонирован во внутреннее пространство СР [27]. Таким образом, некоторые трансмембранные спирали Са-АТРаза выступают из мембраны над ее цитоплазматической поверхностью. В то же время, присутствие большого количества заряженных аминокислотных радикалов в трансмембранных спиральях Са-АТРаза на границе раздела липид/вода полностью подтверждает высказываемые ранее предположения о важной роли электростатических взаимодействий полярных групп ФЛ с молекулой фермента в стабилизации ее структуры [16–18].

IV. РЕАКЦИОННЫЙ ЦИКЛ Са-АТФазы

Механизм функционирования Са-АТФазы СР к настоящему времени довольно хорошо изучен и описан в ряде статей и обзоров [5, 21, 29–34]. Цикл работы Са-АТФазы начинается с того, что фермент, находящийся в конформационном состоянии E1, активируется за счет последовательного связывания двух ионов Ca^{2+} с цитоплазматической стороны мембраны и связывания АТФ в нуклеотидсвязывающем участке (рис. 3). Связывание двух ионов кальция происходит кооперативно с кажущейся $K_c 2,3 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$, а максимальное количество кальция, которое может связаться с мембранными препаратами фермента, составляет 8–10 нмоль Ca^{2+} на 1 мг белка СР, что хорошо согласуется с содержанием белка Са-АТФазы в мембранах ретикула [10, 12]. Связывание Ca^{2+} и АТФ с ферментом может происходить в любой последовательности, но только после оккупации обоими лигандами соответствующих центров связывания фермент фосфорилируется.

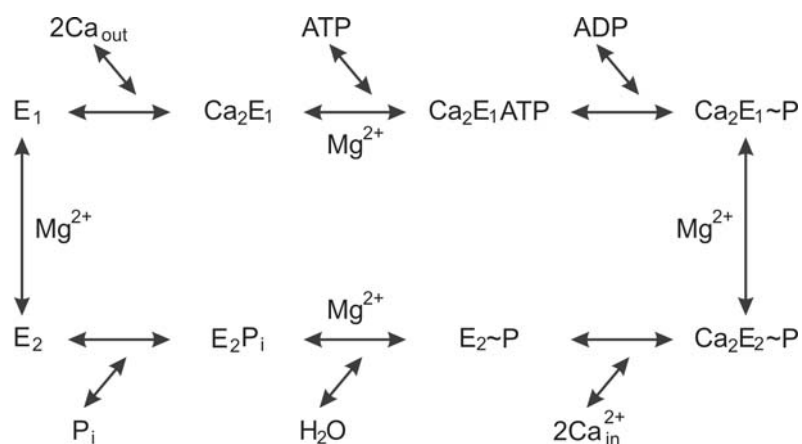


Рис. 3. Реакционный цикл Са-АТФазы СР.

Работа фермента начинается со связывания двух ионов Ca^{2+} и молекулы АТФ с цитоплазматической стороны мембраны СР в соответствующих центрах фермента, находящегося в конформации E1 (ионы Ca^{2+} и АТФ связываются независимо друг от друга в любой последовательности, см. подробные объяснения в тексте). После гидролиза АТФ, фосфорилирования Са-АТФазы и освобождения АДФ происходит основной конформационный переход фосфорилированного интермедиата фермента — из АДФ-чувствительной формы ($\text{Ca}_2\text{E1P}$) в АДФ-нечувствительную ($\text{Ca}_2\text{E2P}$). Ионы Ca^{2+} освобождаются внутрь полостей СР, после чего происходит Mg-зависимый гидролиз фосфоринтермедиата и конформационный переход фермента из состояния E2 в E1.

Гидролиз АТФ Са-АТФазой сопровождается переносом γ -фосфорильного остатка от АТФ на фермент с образованием кислотостабильной связи между фосфатом и остатком аспарагиновой кислоты [35]. Фосфорилированный интермедиат Са-АТФазы может находиться в двух разных энергетических состояниях — АДФ-чувствительном и АДФ-нечувствительном. Из кинетических данных следует, что после фосфорилирования Са-АТФазы АДФ освобождается из фермента, а фосфат и Mg^{2+} остаются связанными в его каталитическом центре [36]. Если к фосфоферменту в этих условиях добавить избыток АДФ, то происходит синтез АТФ. Такую форму фосфофермента называют АДФ-чувствительной. Фосфорилирование фермента в присутствии Ca^{2+} и АТФ индуцирует конформационные изменения Са-АТФазы, и фермент переходит в состояние E2.

Изомеризация фермента со связанным кальцием приводит сначала к окклюзии ионов кальция внутри молекулы фермента, то есть они становятся недоступными для Са-связывающих агентов или для обмена ни изнутри, ни снаружи везикул СР [37, 38], а затем к переносу кальция во внутренние полости ретикула [39–41]. При конформационном переходе E1–E2 происходит превращение АДФ-чувствительного фосфорилированного интермедиата в АДФ-нечувствительную форму. Добавление АДФ к такой форме фосфофермента уже не приводит к синтезу АТФ. Вследствие конформационного перехода фермента из состояния E1 в E2 резко снижается сродство Са-АТФазы к ионам Ca^{2+} , и они выходят во внутренние полости ретикула, при этом общая концентрация Ca^{2+} внутри везикул СР может достигать 60–75 мМ [4]. Так как большая часть кальция связывается локализованными внутри полостей ретикула Са-связывающими белками кальсеквестрином [42, 43], кальретикулином [44, 45], саркалюменином [46, 47] и богатым гистидином Са-связывающим белком [48], концентрация свободного Ca^{2+} внутри СР составляет несколько миллимолей/литр, то есть градиент концентрации ионов Ca^{2+} на мембране СР составляет около 10^3 [10, 21, 33]. Цикл завершается изомеризацией фермента из конформации E2 в E1 после Mg-зависимого гидролиза фосфофермента с освобождением P_i в цитоплазму. При E1-E2 переходе в качестве протониионов Са-АТФаза переносит через мембрану протоны, однако стехиометрия этого переноса окончательно не установлена [33].

Транспорт кальция является обратимым процессом. В присутствии в среде АДФ и P_i и при высокой внутривезикулярной и низкой наружной концентрации ионов кальция может происходить обратный перенос двух ионов кальция через мембрану СР, сопровождаемый синтезом 1 молекулы АТФ [49, 50]. Добавление P_i к Са-АТФазе в

присутствии Mg^{2+} позволяет получить ADP-нечувствительную форму фосфорилированного интермедиата E2-P [49].

Следует отметить, что до настоящего времени широко дискутируется вопрос о том, сколько участков связывания Ca^{2+} содержит молекула Са-АТРаза: два, сродство которых изменяется в ходе реакционного цикла, или четыре — два с высоким сродством к Ca^{2+} (доступны с цитоплазматической стороны мембраны) и два с низким сродством (доступны со стороны полостей ретикулума), при этом предполагается, что конформационный переход молекулы фермента из состояния E1 в E2 сопровождается перемещением ионов Ca^{2+} из одних участков в другие [31, 32, 51, 52]. Хотя данные рентгеноструктурного анализа указывают на присутствие в трансмембранном домене молекулы фермента только двух связанных ионов Ca^{2+} [23, 28], следует заметить, что в данном случае Са-АТРаза была зафиксирована в состоянии E1- Ca^{2+} , а точное расположение ионов металла в молекуле фермента, находящейся в конформационном состоянии E2- Ca^{2+} , пока не установлено. Детальный анализ освобождения Са-АТРазой окклюдированного Ca^{2+} в присутствии специфического ингибитора фермента тапсигаргина подтверждает модель, согласно которой при работе фермента ионы Ca^{2+} последовательно перемещаются из центров с высоким сродством в центры с низким сродством через окклюдированное состояние, т.е. трансмембранный домен Са-АТРаза формирует в мембране CP некое подобие ион-проводящего канала [52]. Кроме того, недавно было показано, что в мембранах CP фермент присутствует в разных формах, которые отличаются сродством к Ca^{2+} и скоростью его связывания, причем на эти параметры существенное влияние оказывает взаимодействие с Са-АТРазой АТР и других нуклеотидов [53, 54]. По всей видимости, эти формы Са-АТРаза представляют собой разные олигомерные комплексы фермента.

Как упоминалось выше, реакционный цикл Са-АТРаза полностью обратим. В ряде лабораторий были измерены константы скоростей прямых и обратных реакций для большинства промежуточных стадий этого цикла [14, 30, 31, 49]. С использованием этих констант построены кинетические модели, которые удовлетворительно описывают имеющиеся экспериментальные данные. Наиболее детально кинетические аспекты функционирования Са-АТРаза в разных условиях представлены в многочисленных публикациях, вышедших из лаборатории А. Ли [55–58]. Самыми «медленными» стадиями реакционного цикла являются конформационные переходы из состояния E1- Ca^{2+} в состояние E2- Ca^{2+} и/или из состояния E2 в состояние E1, которые, вероятно, и определяют общую скорость работы фермента.

У. КОНФОРМАЦИОННАЯ ПОДВИЖНОСТЬ МОЛЕКУЛЫ Са-АТРаза

Как было сказано выше, в ходе реакционного цикла Са-АТРаза CP, как и все остальные АТРаза Р-типа, может находиться в двух основных конформационных состояниях — E1 и E2. Главное различие между ними заключается в сродстве катионсвязывающих центров фермента к переносимым ионам и в доступности этих центров для ионов с цитоплазматической или внеклеточной стороны мембраны (в случае Са-АТРаза — люминальной стороны мембраны ретикулума) [20]. Однако уже в конце 70-х годов прошлого века стало ясно, что число возможных конформационных состояний молекулы Са-АТРаза не ограничивается этими двумя основными конформациями, т.к. молекула фермента обладает значительной конформационной лабильностью. Поскольку добавление субстратов фермента (или их аналогов) в разных сочетаниях, использование ингибиторов, в частности тапсигаргина, и варьирование значений рН среды позволяет зафиксировать фермент преимущественно в одном из промежуточных состояний, достаточно легко проанализировать конформацию его молекулы с помощью разных методов. Так, анализ модификации сульфгидрильных групп фермента тиоловым реагентом НБД-хлоридом позволил выявить значительные различия в количестве и кинетических характеристиках доступных для этого агента SH-групп в разных условиях: при фиксации Са-АТРаза в состоянии E1 (рН 7,0 в присутствии ЭГТА), E1- Ca^{2+} (в присутствии микромолярных концентраций Ca^{2+}), E1-АТР (в присутствии АТР, но в отсутствие двухвалентных катионов), E1-P (в присутствии АТР и миллимолярных концентраций Ca^{2+} , но в отсутствие Mg^{2+}), хотя во всех этих условиях фермент находился в основном конформационном состоянии E1 [59]. Поскольку такие различия в свойствах SH-групп Са-АТРаза были обнаружены при использовании как нативных препаратов CP [59], так и высокоочищенного фермента [60], можно было заключить, что наблюдаемые изменения кинетических характеристик SH-групп отражают изменения конформации молекулы Са-АТРаза, происходящие в ходе реакционного цикла.

С использованием Са-АТРаза, ковалентно модифицированной спин-меченым производным N-этилмалеимида, было обнаружено, что температурные зависимости сегментальной подвижности молекулы фермента, находящегося в конформационных состояниях E1- Ca^{2+} и E1-АТР, значительно различаются и практически не зависят от температурных перестроек липидов мембраны CP [61]. В то же время, сегментальная подвижность молекулы фермента в состоянии E1-P четко коррелирует с термоиндуцированными изменениями подвижности липидов в мембране ретикулума [61].

Более определенная информация о конформации ряда промежуточных интермедиатов Са-АТРаза была получена в опытах с ограниченным протеолизом молекулы фермента трипсином и протеазами К и V8 [25, 26]. Молекула фермента была зафиксирована в конформационном состоянии E1–Са (в присутствии Ca^{2+}), Са–E1–АТР (в присутствии негидролизующего аналога субстрата АМРРСП), Са–E1–P–ADP (в присутствии ADP и AlF_4^-), Са–E1–P (в присутствии AlF_4^- , при этом переход фермента в состояние E2–P блокировался высокими концентрациями Ca^{2+} или обработкой N-этилмалеимидом) и E2–P (в присутствии P_i или ванадата). Оказалось, что все эти конформации значительно отличаются друг от друга по доступности участков, расщепляемых разными протеазами, за исключением участка трипсинолиза T1 (Lys505), который экспонирован на поверхности N-домена и доступен для расщепления во всех условиях (рис. 2). Так, переход фермента из конформации E1–Са²⁺ в E1–АТР приводит к резкому замедлению его расщепления протеазами К и V8, а переход в конформации E1–P–ADP или E1–P – полностью блокирует действие этих протеаз [26]. Во всех случаях также уменьшается доступность участка трипсинолиза T2 (Arg198), расположенного в А-домене. В то же время, молекула Са-АТРаза в конформации E2–P устойчива к действию названных протеаз, за исключением участка трипсинолиза T1 [25]. На основе полученных данных было высказано предположение, что связывание лигандов с Са-АТРазой в конформации E1 и последующее фосфорилирование фермента приводит к значительной взаимной переориентации его гидрофильных доменов, а переход фермента в конформацию E2–P сопровождается их сближением и формированием очень компактной структуры (рис. 4). Конформация гидрофильного домена Са-АТРаза в состоянии E2 (зафиксирована с использованием тапсигаргина) менее компактна, чем в состоянии E2–P, а переход в состояние E1 сопровождается расхождением цитоплазматических доменов.

Это предположение было полностью подтверждено данными рентгеноструктурного анализа, проведенного с использованием кристаллов Са-АТРаза, зафиксированной в пяти разных конформационных состояниях: E1–Са, E2–TG, Са–E1–АМРРСП (аналог состояния Са–E1–АТР), Са–E1– AlF_4^- –ADP (аналог состояния фермента сразу после гидролиза АТР) и E2– MgF_4^{2-} (аналог состояния E2–P). К моменту написания настоящего обзора были получены данные только о структуре двух первых конформеров фермента [23, 62], однако авторы отмечают, что каждый из исследованных интермедиатов имеет свою, характерную структуру [28]. Так, при переходе фермента из конформации E1 в E2 А-домен Са-АТРаза поворачивается на 110° и

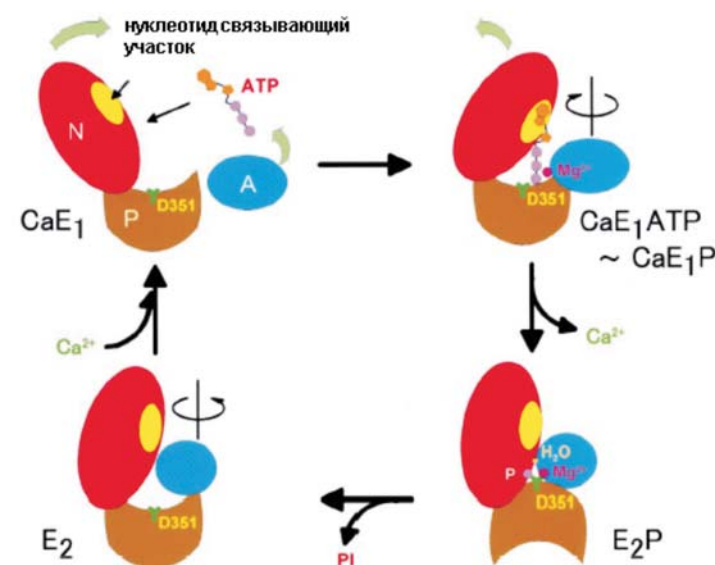


Рис. 4. Схематическая модель, иллюстрирующая взаимное движение гидрофильных доменов молекулы Са-АТРаза в процессе работы фермента [26].

После связывания АТР в соответствующем центре (желтый овал) N-домена (красный) происходит сближение доменов N и А (синий) в направлении, показанном зелеными стрелками. Кроме того, А-домен вращается вокруг оси, перпендикулярной плоскости мембраны СР (показано стрелкой). Такое сближение гидрофильных доменов приводит к Mg-зависимому фосфорилированию остатка аспарагиновой кислоты (D351) в Р-домене (коричневый). Далее фосфорилированный интермедиат переходит из состояния СаE1P в состояние E2P, что сопровождается освобождением Ca^{2+} внутрь полостей СР и изменением конформации всей гидрофильной части молекулы Са-АТРаза. После гидролиза фосфоинтермедиата фермент возвращается из состояния E2 в E1, что сопровождается движением гидрофильных доменов его молекулы в обратном направлении.

сближается с N-доменом (рис. 4). Изменяется и характер его связей с Р-доменом, что приводит к более компактной упаковке гидрофильной части молекулы Са-АТРаза (рис. 5). Благодаря этим перестройкам формируется плотное гидрофобное окружение фосфорилированного остатка Asp351, и только после этого ацилфосфат атакуется определенной молекулой воды в присутствии ионов Mg^{2+} .

Основной конформационный переход Са-АТРаза из состояния E1 в E2 сопровождается значительными перестройками не только гидрофильной части молекулы, но и ее трансмембранного домена,

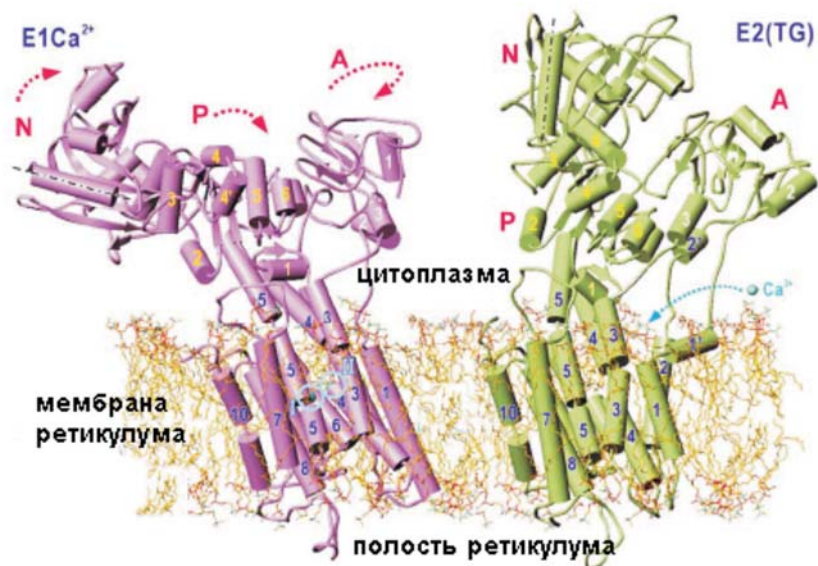


Рис. 5. Конформация молекулы Са-АТРаза в состояниях $E1Ca^{2+}$ (левая часть рисунка, фиолетовый цвет) и $E2(TG)$ (правая часть рисунка, зеленый цвет) в мембране СР [28].

α -Спирали показаны в виде цилиндров и пронумерованы в доменах А, Р и трансмембранном домене, β -складки показаны в виде плоских стрелок. Красные пунктирные стрелки показывают направление движения гидрофильных доменов N, Р и А при переходе фермента из конформации $E1$ в $E2$. Голубые окружности I и II в левой части рисунка показывают расположение Са-связывающих центров в гидрофобном домене фермента, а голубая пунктирная стрелка в правой части рисунка указывает на возможный путь, по которому ионы Ca^{2+} из цитоплазмы могут проникнуть в эти центры.

содержащего участки связывания Ca^{2+} [28]. Из четырех спиралей, формирующих Са-связывающие центры (M4, M5, M6 и M8), только спираль M8 практически не изменяет своего положения в мембране. Спираль M4 сдвигается на один виток внутрь полости СР, верхняя (цитоплазматическая) часть спирали M5, имеющей два излома, наклоняется в сторону спирали M4, а деспирализованная часть спирали M6 поворачивается на 90° (рис. 6). Такие изменения приводят к нарушению структуры Са-связывающих участков, причем движение спирали M4, вероятно, обеспечивает освобождение ионов Ca^{2+} внутрь ретикулума и их замещение протонами. Высокая подвижность и способность к излomu спирали M5 в области остатков Ile765–Asp768 была

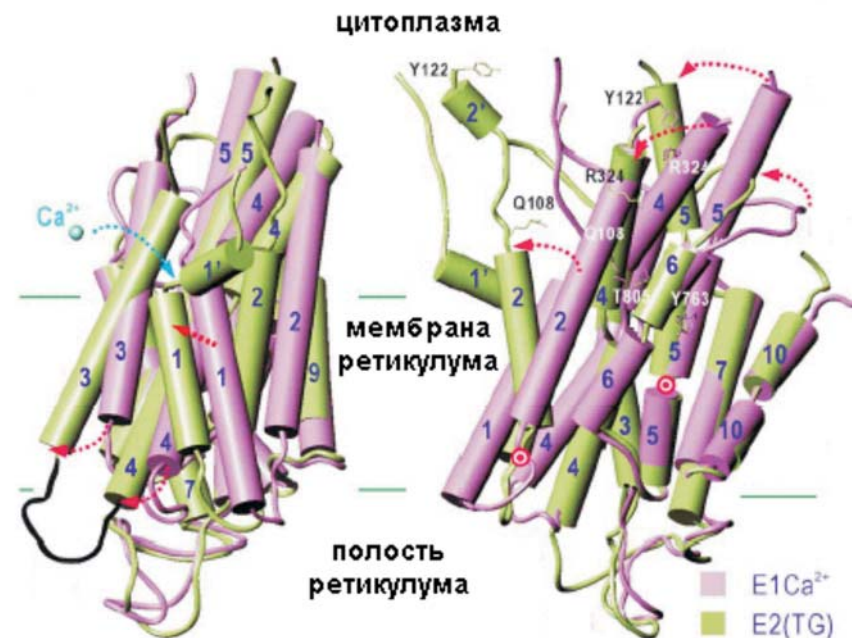


Рис. 6. Перестройки трансмембранных α -спиралей (вид в плоскости мембраны) в гидрофобном домене Са-АТРаза при переходе молекулы фермента из конформации $E1$ (фиолетовый цвет) в $E2$ (зеленый цвет) [28].

α -Спирали показаны в виде цилиндров и пронумерованы. В правой части рисунка изображение повернуто на 90° и не показаны спирали M8 и M9, чтобы более четко было видно изменение положения в мембране спиралей M5, M4 и M2. Некоторые аминокислотные остатки показаны в однобуквенном коде. Красные пунктирные стрелки показывают движение α -спиралей при конформационном переходе $E1$ – $E2$. Голубая пунктирная стрелка в левой части рисунка показывает возможный путь, по которому ионы Ca^{2+} могут проникать со стороны цитоплазмы в центры связывания. Красными точками в правой части рисунка показаны участки, в которых происходит вращение спиралей M2 и M5.

продемонстрирована в независимых экспериментах с помощью ЯМР-спектроскопии [63]. Было высказано предположение, что изменение структуры этой спирали и аналогичные перестройки в спирали M6 играют важную роль в связывании и окклюзии ионов Ca^{2+} в процессе работы Са-АТРаза.

При конформационном переходе $E1$ – $E2$ происходит сближение гидрофильных доменов Са-АТРаза А с Р и А с N и формирование между ними нескольких новых водородных связей. При этом N-кон-

цевая часть спирали М1, которая в конформационном состоянии фермента E1 глубоко погружена в мембрану CP, изгибается и «ложится» на цитоплазматическую поверхность мембраны [28]. По-видимому, эти перестройки закрывают доступ к Ca-связывающим участкам Ca-АТРазы со стороны цитоплазмы. Путь для выхода Ca^{2+} в люмен ретикулума открывается, главным образом, за счет изменения положения спирали М4 (рис. 6). Таким образом, данные рентгеноструктурного анализа позволили значительно продвинуться в понимании механизма функционирования Ca-АТРазы CP и других АТРаз Р-типа.

VI. ОСОБЕННОСТИ КИНЕТИКИ Ca-АТРазы

Интересной особенностью Ca-АТРазы CP является тот факт, что зависимость ее активности от концентрации АТР не описывается уравнением Михаэлиса-Ментен, так как в области высоких концентраций субстрата (0,5–1,0 мМ) наблюдается дополнительная активация фермента [64]. Было установлено, что график зависимости активности Ca-АТРазы от концентрации АТР в координатах Лайнуивера-Берка имеет вид двух пересекающихся прямых. Рассчитанные на основе этих экспериментов значения K_m для АТР составили 10 мкМ в области низких концентраций субстрата (до 100 мкМ) и 400 мкМ в области высоких концентраций нуклеотида (свыше 100 мкМ) [14, 64]. Негиперболическая зависимость активности от концентрации субстрата характерна и для других АТРаз Р-типа, например, для Na, K-АТРазы плазматических мембран [65] и H, K-АТРазы слизистой желудка [66].

Негиперболическая зависимость скорости гидролиза АТР Ca-АТРазой от концентрации субстрата получила название субстратной активации или аллостерического действия АТР. Для объяснения такого кинетического поведения фермента было выдвинуто несколько гипотез, однако пока ни одна из них не является окончательно доказанной.

Негиперболическая зависимость активности фермента от концентрации субстрата может наблюдаться при наличии в препаратах нескольких изоформ, которые обладают разными кинетическими характеристиками – сродством к субстрату и скоростью его гидролиза. Однако к настоящему времени накоплено много данных, позволяющих исключить эту гипотезу: в препаратах CP скелетных мышц кролика, на которых проводилось большинство экспериментов, не обнаружено различных изоформ Ca-АТРазы [20, 24, 67–69].

Многие исследователи считают, что ион-транспортирующие АТРазы Р-типа имеют один активный центр, меняющий свое сродство к АТР в ходе реакционного цикла [70, 71]. Предполагается, что

Ca-АТРаза в конформации E1 имеет высокое сродство к АТР, а после перехода фермента в состояние E2 и освобождения продуктов реакции активный центр приобретает низкое сродство к субстрату. Скорость гидролиза АТР Ca-АТРазой лимитируется скоростью конформационного перехода E2-E1, поэтому связывание АТР с гидролитическим центром E2-конформера Ca-АТРазы (имеющим низкое сродство к нуклеотиду) приводит к образованию фермент-субстратного комплекса и значительно ускоряет конформационный переход из состояния E2-АТР в состояние E1-АТР (реакция протекает по пути релаксационной кинетики) [72]. Релаксационная кинетика предполагает существование гетерогенных активных центров только в условиях гидролиза субстрата. Однако опыты по защите активности Ca-АТРазы нуклеотидами от инактивации тиоловыми агентами (в частности АТР и АDР) демонстрируют наличие нуклеотидсвязывающих центров с разным сродством к АТР и у неработающего фермента, зафиксированного в состоянии E1 [73, 74].

В ряде работ дополнительная активация фермента высокими концентрациями АТР объясняется наличием второго – регуляторного или аллостерического нуклеотидсвязывающего центра в молекуле Ca-АТРазы [75, 76]. Так, с использованием негидролизуемого аналога АТР – 3'-арилазида-АТР было показано наличие двух участков связывания субстрата на одной молекуле фермента [77]. Предполагается, что регуляторный центр имеет низкое сродство к нуклеотиду, но связывание с ним АТР активирует гидролиз субстрата в каталитическом центре, который имеет высокое сродство к субстрату [78]. В то же время опыты по фосфорилированию, связыванию АТР, АDР, а также их негидролизуемых аналогов с Ca-АТРазой CP показывают, что с одной молекулой фермента взаимодействует только одна молекула нуклеотида [14], последние данные рентгеноструктурного анализа также не подтверждают наличия второго нуклеотидсвязывающего центра [23, 62].

Еще одно объяснение дополнительной активации Ca-АТРазы высокими концентрациями АТР заключается в том, что такая активация может быть связана с присутствием в мембранах CP олигомерных комплексов фермента, взаимодействие мономеров в которых и приводит к нарушению нормальной Михаэлисовской кинетики. О присутствии в мембранах CP олигомерных комплексов Ca-АТРазы разного состава говорят многочисленные данные [79–81], причем в ряде случаев результаты экспериментов наиболее хорошо описываются моделями, предполагающими наличие кооперативных взаимодействий между нуклеотидсвязывающими центрами мономеров Ca-АТРазы в составе олигомерных комплексов [82, 83]. Более подробно воп-

рос об олигомерной организации Са-АТРаза в мембранах СР будет обсуждаться ниже.

Известно, что кроме АТР Са-АТРаза способна гидролизовать и другие нуклеозидтрифосфаты: СТР, ГТР, ИТР, УТР [84]. Если принять скорость гидролиза АТР за 100%, то скорость гидролиза ИТР составит 80%, ГТР – 70%, СТР – 55%, УТР – 25%. Кроме нуклеозидтрифосфатов Са-АТРаза гидролизует ацетилфосфат [85], *n*-нитрофенилфосфат [86–88], карбамаилфосфат [85], динитрофенилфосфат [89], сукцинилфосфат и бензоилфосфат [85]. Все эти соединения гидролизуются Са-АТРазой и обеспечивают перенос ионов кальция через мембрану СР [89, 90]. В отличие от АТР, гидролиз других нуклеозидтрифосфатов, *n*-нитрофенилфосфата, ацетилфосфата, ацилфосфатов и синтетических субстратов описывается кинетикой Михаэлиса [85, 88, 89], и для них приводится одно значение K_m . Таким образом, эти субстраты не обладают аллостерическим действием, характерным для АТР, который в высоких концентрациях обеспечивает дополнительную активацию фермента. Гидролиз этих соединений по ряду параметров значительно отличается от гидролиза АТР. Так, гидролиз УТР Са-АТРазой СР не ингибируется циклопиазониевой кислотой, стехиометрия транспорта Ca^{2+} составляет 0,7–0,8 на моль нуклеотида, а не 2, как в случае АТР, при гидролизе УТР не накапливается АДФ-чувствительная форма фосфорилированного интермедиата, а связанный с фосфорилированным ферментом Ca^{2+} легко освобождается в цитоплазму [91]. Кроме того, только связывание АТР с Са-АТРазой, но не других нуклеозидтрифосфатов, изменяет сродство Са-связывающих центров фермента и скорость связывания Ca^{2+} [53, 54].

Свойства нуклеотидсвязывающего центра Са-АТРаза изучались главным образом с помощью химической модификации входящих в его состав аминокислот с использованием аналогов АТР, способных ковалентно связываться с белком, а также с помощью направленного точечного мутагенеза. Обработка АТРаза FITC, который ковалентно связывается с остатком Lys515 [92, 93], приводит к тому, что фермент теряет способность связывать АТР, но при этом не изменяется его взаимодействие с небольшими по размеру молекулами субстратов, такими как ацетилфосфат и *n*-нитрофенилфосфат. Это говорит о том, что остаток Lys515 находится вблизи нуклеотидсвязывающего центра и связывание с ним достаточно крупной по размеру молекулы FITC стерически препятствует связыванию нуклеотида.

С помощью направленного мутагенеза входящих в состав N-домена высококонсервативных последовательностей, характерных для всех ион-транспортирующих АТРаза Р-типа (KGAPЕ-519 и RDAGIRVIMITGDNK-629), удалось выяснить, что только остатки

Gly626 и Asp627 важны для связывания АТР, нормального взаимодействия N- и Р-доменов и образования фосфофермента [94]. На сегодняшний день можно считать, что не существует аминокислотного остатка, модификация которого имеет решающее значение для АТР-связывающих свойств Са-АТРаза. АТР-связывающий центр формируется из нескольких последовательностей аминокислот, достаточно далеко «разнесенных» по первичной структуре фермента [69]. Результаты всех этих исследований, как и данные рентгеноструктурного анализа [23, 62], свидетельствуют о наличии в молекуле Са-АТРаза СР только одного нуклеотидсвязывающего участка.

Пока известны только два случая, когда не наблюдалась активация Са-АТРаза высокими концентрациями АТР. Так, у холодоустойчивой лягушки *Rana sylvatica* зависимость активности Са-АТРаза СР скелетных мышц (изоформа SERCA1) от концентрации АТР описывается кинетикой Михаэлиса-Ментен [95]. По сравнению с Са-АТРазой СР других лягушек первичная структура этого фермента содержит всего 7 аминокислотных замен, три из которых (Leu546Asn, Ser547Ala и Gly643Ser) находятся в АТР-связывающем домене. Поскольку аминокислоты, располагающиеся в этих участках, консервативны в Са-АТРаза большинства видов животных, предполагается, что их замена приводит к изменению белок-белковых взаимодействий в составе олигомерных комплексов Са-АТРаза *Rana sylvatica*, вследствие чего не наблюдается дополнительной активации этого фермента высокими концентрациями АТР, которая, по мнению авторов, объясняется именно наличием в мембранах ретикулула олигомерных комплексов молекул фермента [95].

Исследование активности Са-АТРаза СР скелетных мышц суслика *Spermophilus undulatus*, проведенные в нашей лаборатории, показали, что в летний период зависимость активности фермента от концентрации АТР характеризуется дополнительной активацией в области высоких концентраций субстрата (рис. 7). В то же время, активность фермента, полученного из скелетных мышц зимних спящих животных, снижена в 2 раза, причем это снижение связано с устранением активации Са-АТРаза высокими концентрациями АТР [96, 97]. Поскольку в зимний период в мембранах СР скелетных мышц сусликов значительно изменяются белковый состав и эндогенная протеинкиназная активность, предполагается, что активность Са-АТРаза в СР этих животных регулируется уровнем экспрессии и/или уровнем фосфорилирования пока неидентифицированных белков, взаимодействующих с Са-АТРазой [96–98].

Отсутствие дополнительной активации фермента высокими концентрациями АТР описано также еще для одного представителя АТРаза

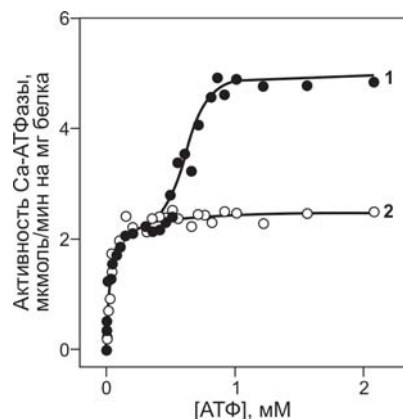


Рис. 7. Зависимость активности Са-АТФазы СР скелетных мышц летних активных (1) и зимних спящих (2) сусликов *S. undulatus* от концентрации АТФ в среде инкубации [97].

фосфорилирование фермента эндогенными протеинкиназами, активность которых в зимний период возрастает [99].

VII. ОЛИГОМЕРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ Са-АТФазы

В настоящее время в литературе активно обсуждается вопрос об особенностях олигомерной организации Са-АТФазы в мембранах СР: существует ли она в виде мономеров или образует функциональные олигомерные комплексы. Исследования в этом направлении проводятся во многих лабораториях, но до сих пор окончательного ответа на этот вопрос не получено.

Одним из основных подходов, используемых для исследования молекулярной организации интегральных мембранных белков, является электронная микроскопия. Электронномикроскопические исследования мембран СР показали наличие в них как димеров Са-АТФазы [100, 101], так и более высокомолекулярных комплексов фермента [102]. Внутримембранные участки молекулы Са-АТФазы хорошо видны на репликах, получаемых с гидрофобной поверхности внешней половины бислоя мембран СР с помощью метода замораживания-скальвания. Диаметр таких частиц составляет около 9,0 нм. Они расположены преимущественно в наружном монослое мембраны СР, который обращен в цитоплазму. Плотность распределения частиц на вогнутой поверхности скола составляет 5000/мкм², а на выпуклой, соответствующей внутреннему монослою мембраны, их

Р-типа — Na,К-АТФазы из скелетных мышц зимних гибернарующих сусликов *Spermophilus lateralis* [99]. Активность Na,К-АТФазы скелетных мышц этих сусликов была в 3 раза ниже, чем летних активных животных, причем снижение активности также было связано с устранением дополнительной активации фермента высокими концентрациями АТФ. Анализ влияния эндогенных и экзогенных протеинкиназ на активность фермента позволил авторам заключить, что причиной изменения кинетических параметров Na,К-АТФазы скелетных мышц гибернарующих сусликов является

примерно в 10 раз меньше [103]. Так как большая часть полипептидной цепи Са-АТФазы экспонирована в цитозоль, то она выявляется на внешней поверхности после негативного контрастирования или глубокого травления. При этом становятся заметны частицы диаметром около 4,5 нм, которые распределены в мембране с плотностью 17000–25000/мкм² [104]. В результате на одну внутримембранную частицу диаметром 9,0 нм приходится 3–4 поверхностных частицы диаметром 4,5 нм. Было высказано предположение о том, что Са-АТФаза в мембранах СР представляет собой олигомер, состоящий, скорее всего, из 4 субъединиц [105].

Для анализа олигомерного состояния Са-АТФазы широко используются различные сшивающие агенты. С использованием глутарового альдегида, *o*-фенантролина меди, диметилсуберимидата и ряда других агентов в мембранах СР были обнаружены как димеры Са-АТФазы [106, 107], так и тетрамеры фермента [107, 108]. Однако, после реконструкции Са-АТФазы в везикулы с избыточным количеством липидов, уровень образования сшивок сильно снижился. Это может объясняться тем, что в мембранах происходят случайные столкновения молекул Са-АТФазы за счет латеральной диффузии молекул фермента в мембранах СР [109]. Тем не менее, детальный анализ олигомерной организации разных изоформ Са-АТФазы в мембранах СР из различных источников показал, что этот фермент представлен в основном олигомерными комплексами, что, вероятно, является необходимым условием для его нормального функционирования и регуляции [79–81, 110], причем степень олигомеризации Са-АТФазы и ряда других белков, участвующих в регуляции мышечного сокращения, в СР скелетных мышц кролика возрастает в процессе постнатального развития [47].

В экспериментах по химической модификации функциональных групп фермента было показано, что полная инактивация Са-АТФазы дициклогексилкарбодиимидом наблюдается при связывании 1 моля ингибитора на 4 моля фермента [111]. Предполагается, что это связано с полной инактивацией олигомерного комплекса (тетрамера) при химической модификации только одной молекулы фермента в составе такого комплекса. Аналогичные данные были получены и при анализе ингибирования Са-АТФазы тиоловым агентом НБД-хлоридом [59, 60].

Еще одним способом определения олигомерного состояния мембранных белков является метод радиоинактивации. Этот метод основан на том, что при прохождении частиц высокой энергии через биологический образец происходит поглощение энергии молекулой фермента и ее ионизация. Это приводит к разрушению молекул и ингибированию ферментативной активности. Вероятность столкновения

частиц с молекулой фермента зависит от размеров последней, а величина остаточной ферментативной активности экспоненциально зависит от дозы облучения. Теория метода была экспериментально проверена на большом количестве ферментов с известной молекулярной массой [112]. С помощью такого подхода было установлено, что и в нативных, и в реконструированных везикулах Са-АТРаза присутствует в основном в виде димеров [113].

Методом ЭПР-спектроскопии с переносом насыщения показана сильная иммобилизация спиновой метки, ковалентно связанной с Са-АТРазой [114, 115]. По мнению авторов, величина иммобилизации свидетельствует об образовании в мембране олигомерных комплексов. В среде, содержащей кальций, происходит замедление вращения мембранной и солиобилизированной Тритоном X-100 Са-АТРаза. Такой же эффект наблюдается при обработке мембран СР глутаровым альдегидом, когда Са-АТРаза находится в высокоагрегированном состоянии. Таким образом, причиной замедления вращения могут быть белок-белковые взаимодействия [114, 115].

Для оценки олигомерного состояния мембранных белков используют методы флуоресцентной спектроскопии. При анализе миграции энергии флуоресценции часть молекул Са-АТРаза метится флуоресцентной меткой, являющейся донором энергии, спектр испускания флуоресценции которой перекрывается со спектром возбуждения флуоресценции метки, являющейся акцептором энергии, которой метится другая порция фермента. В качестве донора энергии часто используют N-(йодацетиламино)-1-нафталин-5-сульфоновую кислоту, а в качестве акцептора — йодацетамидофлуоресцеин. Расстояние, на которое возможен безизлучательный перенос энергии, составляет для этой пары флуорофоров около 60 Å, а расстояние между молекулами Са-АТРаза в реконструированных везикулах за счет разведения белка липидами составляет более 100 Å. При смешивании меченных везикул переноса энергии не происходит, но обработка везикул ультразвуком приводит к их слиянию и, как следствие, к образованию смешанных ассоциатов Са-АТРаза и переносу энергии между донором и акцептором. Предполагается, что в данной системе присутствуют стабильные олигомеры фермента [116].

Другой флуорометрический подход, использованный для анализа состояния Са-АТРаза в мембранах СР, заключался в ковалентном мечении SH-групп фермента N-3-пиренилмалеимидом. Принцип метода состоит в образовании эксимеров пиренилмалеимида при взаимодействии возбужденной и невозбужденной молекул, которые находятся на достаточно близком расстоянии. При этом спектр флуоресценции эксимера смещается в более длинноволновую область по отношению к спектру флуоресценции мономерной формы метки. В

мембранах СР, меченных пиренилмалеимидом, наблюдается значительная эксимеризация метки, а после введения детергента степень эксимеризации снижается, что говорит о диссоциации молекул фермента [117, 118].

Как упоминалось выше, в ходе каталитического цикла Са-АТРаза может находиться в разных конформационных состояниях. Были проведены работы, в которых Са-АТРаза была стабилизирована и кристаллизована в двух основных конформационных состояниях — E1 и E2, после чего полученные кристаллы исследовали с помощью электронномикроскопического анализа. Для этих целей использовали ванадат — аналог неорганического фосфата и катионы из группы лантаноидов. Было показано, что инкубация препаратов СР в среде, содержащей ванадат и ионы Mg^{2+} и не содержащей Ca^{2+} , позволяет зафиксировать фермент в конформационном состоянии E2—ванадат- Mg^{2+} (аналог состояния E2-P) и получить двумерные кристаллические решетки, состоящие из молекул Са-АТРаза, равномерно распределенные внутри мембран СР [119, 120]. Такие кристаллы были названы кристаллами P2-типа. Исходя из параметров образующейся решетки, структурной единицей, способной к дальнейшей полимеризации, является димер Са-АТРаза. При полимеризации димеров образуются длинные цепи, образующие при дальнейшей агрегации кристаллы, закрученные в правосторонние спирали [120]. Ионы Ca^{2+} ингибируют образование кристаллов Са-АТРаза под действием ванадата и разрушают ранее образованные кристаллы [121, 122]. Авторы процитированных работ считают, что это связано с переходом фермента в конформацию E1 в присутствии Ca^{2+} .

Под действием Ca^{2+} или лантаноидов в присутствии ионов Mg^{2+} при pH 8,0 и температуре 2 °C в мембранах СР образуется другая форма кристаллической решетки, единицей кристаллизации которой является мономер Са-АТРаза в E1-конформации. Такие кристаллы назвали кристаллами P1-типа [123, 124]. Высказывалось предположение, что в конформации E1 Са-АТРаза существует в виде мономеров, а переход в конформацию E2 сопровождается димеризацией фермента, т.е. олигомерное состояние Са-АТРаза изменяется в ходе реакционного цикла. С другой стороны, методом радиоинактивации было показано, что и в нативных мембранах СР, и в реконструированных везикулах Са-АТРаза существует в виде димеров, причем это характерно для фермента, находящегося как в E1-, так и в E2-конформации, то есть в ходе реакционного цикла олигомерное состояние Са-АТРаза не меняется [113, 125].

При солиобилизации Са-АТРаза СР детергентами можно подобрать условия, при которых фермент будет находиться полностью в мономерной форме. Впервые эта форма была получена при солиоби-

лизации фермента дезоксихолатом [126] и додецилоктаэтиленгликолем ($C_{12}E_8$) [127]. При этом оказалось, что активность белка, солюбилизованного в неионном детергенте, сохраняется дольше, чем фермента, солюбилизованного в ионном детергенте [124]. При сравнении свойств мономерной и олигомерной форм Са-АТРаза было установлено, что мономерная форма способна гидролизовать АТФ и связывать ионы Ca^{2+} с высоким сродством (около 9 нмоль Ca^{2+} /мг белка). Для мономерной формы Са-АТРаза характерны все частные реакции, осуществляемые мембранным ферментом: связывание лигандов, фосфорилирование, АТФ/АДФ-обмен, Са-индуцируемое изменение флуоресценции, синтез АТФ [109]. Однако нативный белок отличается от солюбилизованного наличием активации гидролиза АТФ высокими концентрациями субстрата [128, 129]. Это служит еще одним подтверждением того, что немихаэлисовская кинетика гидролиза АТФ Са-АТРаза СР связана с взаимодействием молекул фермента в составе олигомерных комплексов.

При гель-фильтрации солюбилизованного в неионном детергенте $C_{12}E_8$ фермента были обнаружены как мономеры, так и димеры Са-АТРаза, между которыми существует определенное равновесие. Также высказывалось предположение о том, что в процессе каталитического цикла происходят белок-белковые взаимодействия, которые важны для транспорта Ca^{2+} через мембрану [130, 131]. Выяснилось, что связывание АТФ и его негидролизованного аналога АМРРСП, а также фосфорилирование фермента сдвигают равновесие между мономерной и олигомерной формами солюбилизованной Са-АТРаза в сторону мономерной формы [109, 131].

Относительно функциональной роли олигомеров Са-АТРаза в мембранах СР в литературе существует несколько точек зрения. Первое высказанное предположение связывало олигомеризацию Са-АТРаза с возможностью стабилизации фермента в мембране за счет белок-белковых взаимодействий [128]. В работах с использованием различных детергентов было показано, что стабильность мономерной формы фермента намного ниже, чем олигомерной [132]. Однако оставался открытым вопрос, необходимы ли олигомеры фермента для нормального функционирования или регуляции активности Са-АТРаза. С другой стороны, профессором Д. Томасом и его коллегами активно проводились исследования, основанные на предположении, согласно которому олигомеризация Са-АТРаза является способом обратимого снижения ее функциональной активности [133, 134]. Об этом свидетельствовали многочисленные эксперименты с использованием методов ЭПР с переносом насыщения и исследования анизотропии фосфоресценции меченой Са-АТРаза, в которых анализировалось олигомерное состояние Са-АТРаза в мембранах СР

скелетных мышц и сердца в разных условиях. Так, было показано, что агрегацию фермента индуцируют известные ингибиторы Са-АТРаза — тапсигаргин и циклопиазониновая кислота [135, 136], некоторые органические растворители и локальные анестетики [137, 138], регуляторный белок мембран СР сердца фосфоламбан [134] и пептид из яда пчелы мелиттин [139, 140], причем во всех случаях агрегация фермента сопровождалась снижением его функциональной активности.

В то же время в наших экспериментах по исследованию вращательной подвижности Са-АТРаза в мембранах СР методом анизотропии фосфоресценции меченого эозинизотиоцианатом фермента было обнаружено, что в нативных мембранах ретикулула Са-АТРаза присутствует как в виде мономеров, так и в виде олигомерных комплексов [141], причем переход фермента из конформационного состояния E1 в E2 практически не влияет на степень его олигомеризации [142]. Солюбилизация мембран ретикулула неионным детергентом $C_{12}E_8$ разрушает олигомерные комплексы Са-АТРаза [143], однако значительная агрегация фермента, индуцируемая мелиттином, в определенных условиях не снижала его активности [144]. Таким образом, в настоящее время большая часть исследователей придерживается точки зрения, согласно которой Са-АТРаза СР находится в мембранах СР и функционирует именно в составе олигомерных комплексов, причем взаимодействие между мономерами в составе этих комплексов необходимо для нормальной работы и регуляции фермента [79–82, 97].

VIII. РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ Са-АТРаза

В настоящее время установлено, что активность Са-АТРаза СР в разных тканях может регулироваться посредством ряда механизмов, основными из которых являются белок-белковые взаимодействия в мембранах ретикулула и фосфорилирование фермента или регуляторных белков протеинкиназами. Так, основным регулятором Са-АТРаза сердца и медленных скелетных мышц (SERCA2a) является интегральный белок мембран СР фосфоламбан. Его ингибирующее действие на фермент заключается в уменьшении активности Са-АТРаза и снижении ее сродства к кальцию [145]. Фосфоламбан — 52-членный пептид (молекулярная масса мономера около 6 кДа), который в мембранах СР образует пентамеры. N-Концевая часть его молекулы экспонирована в цитоплазму и содержит положительно заряженные аминокислоты, в результате чего N-концевые домены мономеров фосфоламбана отталкиваются друг от друга. Кроме того, в цитоплазматической части этого белка находятся аминокислотные остатки Ser16 и Thr17, фосфорилируемые протеинкиназами. Предполагается,

что в дефосфорилированном состоянии мономеры фосфоламбана электростатически взаимодействуют с отрицательно заряженным цитоплазматическим доменом Са-АТРаза, что вызывает агрегацию Са-АТРаза. Фосфорилирование фосфоламбана сАМР-зависимой протеинкиназой по Ser16 и Са/СаМ-зависимой протеинкиназой по Thr17 вызывает образование агрегатов (пентамеров) фосфоламбана, которые диссоциируют от Са-АТРаза, а сама Са-АТРаза переходит в неагрегированное активное состояние [145]. С другой стороны, последние данные, полученные в экспериментах по иммунопреципитации, говорят о том, что фосфорилирование фосфоламбана не нарушает его «физического» взаимодействия с Са-АТРазой [146]. Диссоциация фосфоламбана и Са-АТРаза наблюдается в присутствии высоких концентраций Ca^{2+} , когда фермент находится в E1-конформации, а АТР, наоборот, усиливает взаимодействие этих двух белков. Таким образом, регуляция активности Са-АТРаза фосфоламбаном обеспечивается, скорее всего, не за счет ассоциации-диссоциации комплекса этих белков и не за счет изменения степени агрегации Са-АТРаза, а за счет изменения характера белок-белковых взаимодействий при изменении конформации как фосфоламбана, так и Са-АТРаза [146].

Несмотря на то, что фосфоламбан не экспрессируется в быстрых скелетных мышцах, в экспериментах *in vitro* по совместной экспрессии двух белков было показано, что SERCA1 регулируется фосфоламбаном так же, как и Са-АТРаза сердца и медленных скелетных мышц (SERCA2a), что объясняется высокой степенью гомологии этих изоформ фермента [20].

Показано также, что активность Са-АТРаза гладких мышц (SERCA2b) ингибируется Са-связывающим белком кальретикулином [44]. Механизм ингибирующего действия этого белка пока неизвестен, однако предполагается, что снижение транспортной функции фермента может происходить в результате его прямого взаимодействия с кальретикулином [147].

В быстрых скелетных мышцах обнаружен другой интегральный белок СР, сарколипин, регулирующий активность SERCA1 [148]. Сарколипин — это 31-членный пептид с молекулярной массой 6 кДа, который синтезируется в основном в быстрых скелетных мышцах. При помощи иммунохимического анализа была продемонстрирована совместная локализация сарколипина и Са-АТРаза в мембранах СР [148]. Сарколипин имеет сходное строение с фосфоламбаном, но эти белки взаимодействуют с разными участками Са-АТРаза и несколько по-разному влияют на ее кинетические параметры. Так, сарколипин при низких концентрациях кальция, как и фосфоламбан, уменьшает сродство Са-АТРаза к кальцию и ингибирует активность фермента. Однако, в отличие от фосфоламбана, при высоких концентрациях

кальция сарколипин увеличивает активность SERCA1. Кроме того, при использовании экзогенных протеинкиназ и стимуляции эндогенного фосфорилирования не выявлено фосфорилирования сарколипина. Также не было обнаружено в мембранах СР олигомерных форм сарколипина, хотя исследователи не исключают возможность их существования в физиологических условиях. Предполагается, что сарколипин за счет белок-белковых взаимодействий обеспечивает постоянную стимуляцию SERCA1 на фоне повышенных концентраций Ca^{2+} и ее активность модулируется уровнем его экспрессии [148]. Однако недавно с использованием очищенных и реконструированных в протеолипосомы сарколипина и Са-АТРаза выяснилось, что сарколипин практически не влияет на гидролитическую активность Са-АТРаза и на ее сродство к Ca^{2+} (при соотношении сарколипин : Са-АТРаза до 50 : 1), однако резко снижает накопление Ca^{2+} везикулами уже при соотношении 2 : 1, разобшая Са-насос или увеличивая опосредованную Са-АТРазой утечку Ca^{2+} [149].

Активность Са-АТРаза СР может модулироваться протеинкиназами и напрямую. Так, фосфорилирование Са-АТРаза сердца и медленных скелетных мышц (SERCA2a) Са/СаМ-зависимой протеинкиназой типа II почти в два раза увеличивает активность фермента [150]. Установлено, что фосфорилирование Са-АТРаза происходит по остатку Ser38 [151]. Интересно отметить, что фосфорилирование Са-АТРаза по этому остатку наблюдается не только в экспериментах *in vitro*, но имеет место и в нативном работающем сердце. Так, в опытах на перфузируемом сокращающемся сердце кролика было показано, что около 20% белка Са-АТРаза СР находится в фосфорилированном состоянии [152]. Предполагается, что фосфорилирование Са-АТРаза СР сердца является важным физиологическим механизмом регуляции функциональной активности этого фермента.

В препаратах СР скелетных мышц крысы недавно был идентифицирован α -Кар белок (молекулярная масса 25 кДа), который заякоривает Са/СаМ-зависимую протеинкиназу на мембране СР. Этот белок является альтернативным некиназным продуктом гена мозговой α -СаМ-зависимой протеинкиназы [153]. В быстрых скелетных мышцах кролика найден белок (молекулярная масса 23 кДа), который является специфическим субстратом эндогенной СаМ-зависимой протеинкиназы. Предполагается, что этот белок является гомологом α -Кар белка из скелетных мышц крысы и участвует в заякоривании Са/СаМ-зависимой протеинкиназы на мембране СР кролика [154]. Поскольку данная протеинкиназа связана с мембранами именно легкой фракции ретикулула, обогащенной Са-АТРазой [155], предполагается, что она участвует в регуляции функциональной активности Са-АТРаза и в скелетной мускулатуре, хотя этот вопрос требует более детального изучения.

Проведенные в нашей лаборатории эксперименты по влиянию стимуляции эндогенных протеинкиназ на активность Са-АТФазы СР скелетных мышц сусликов *S. undulatus* показали, что фосфорилирование белков ретикулума протеинкиназами практически не влияет на активность фермента в препаратах, полученных из мышц летних активных животных [97]. В то же время активность Са-АТФазы в препаратах СР зимних спящих животных после фосфорилирования белков ретикулума увеличивается в 2–3 раза. Необходимо отметить, что фосфорилирование самой Са-АТФазы при этом не происходит, т.е. активность фермента регулируется уровнем фосфорилирования пока неидентифицированных белков ретикулума и/или уровнем их экспрессии, так как в зимний период значительно изменяется как белковый состав препаратов ретикулума, так и степень фосфорилирования ряда белков эндогенными протеинкиназами [96, 97].

В последние годы внимание исследователей привлекает вопрос о влиянии разных режимов работы скелетной мускулатуры на функционирование Са-АТФазы в мембранах СР. Оказалось, что хроническая низкочастотная стимуляция скелетных мышц крысы приводит к значительному снижению активности Са-АТФазы ретикулума (на 30% за 12–24 часа) [156]. При этом в молекуле Са-АТФазы увеличивается количество доступных для модификации карбонильных групп, а содержание фермента в мембранах ретикулума снижается, по-видимому, за счет деградации молекул модифицированной неактивной Са-АТФазы. Восстановление активности Са-АТФазы происходит в течение 48–72 часов, что указывает на необходимость стимуляции синтеза новых молекул фермента [156].

Сходная картина наблюдается в скелетных мышцах и после интенсивной работы [157, 158]. При этом также происходит окисление функциональных групп боковых аминокислотных радикалов молекулы Са-АТФазы и ингибирование ее гидролитической и транспортной активности. В то же время в диафрагме при интенсивных нагрузках активность Са-АТФазы, наоборот, увеличивается, что свидетельствует о разных механизмах регуляции активности этого фермента в разных типах мышц [158].

Известны и хронические наследственные заболевания, связанные с нарушением нормальной работы разных изоформ Са-АТФазы [159, 160]. Так, примерно у одного из 10 миллионов человек встречается болезнь Броди, заключающаяся в нарушении нормального расслабления скелетных мышц даже при минимальных нагрузках. Установлено, что при этом заболевании активность Са-АТФазы СР в быстрых мышечных волокнах колеблется от 0 до 50% от нормы, а гистохимические исследования в ряде случаев указывают на снижение содержания белка Са-АТФазы в мембранах СР [159].

Анализ характера наследования болезни Броди показал, что она связана с рецессивными аутосомными мутациями и число носителей таких мутаций достаточно велико (1 на 1600). В большинстве случаев болезнь Броди связана с мутацией в гене, кодирующем SERCA1 изоформу Са-АТФазы, однако у многих пациентов мутаций в этом гене не обнаружено. Тем не менее, активность Са-АТФазы у таких больных также снижена, и фермент не может обеспечить удаление Ca^{2+} из цитоплазмы со скоростью, необходимой для нормального процесса расслабления. Поскольку активность SERCA1 регулируется сарколипном, предпринимались многочисленные попытки обнаружить мутации в гене, кодирующем этот белок, однако они не увенчались успехом [159]. Это подтверждает предположения о том, что в регуляции активности Са-АТФазы СР скелетных мышц принимают участие и другие, пока неидентифицированные белки.

С мутациями изоформы Са-АТФазы SERCA2b связаны два доминантных аутосомных кожных заболевания — болезнь Хайле-Хайле [160, 161] и болезнь Дарнье [162, 163], при которых нарушается кератинизация кожи, разрушаются десмосомы и, как следствие, становятся непрочными контакты между клетками эпидермиса. У пациентов с болезнью Дарнье обнаружена делеция в гене, кодирующем Са-АТФазу SERCA2, причем эта делеция затрагивает только 21-й экзон, кодирующий С-концевой участок изоформы SERCA2b, которая является основной изоформой Са-АТФазы, экспрессируемой в клетках кожи [163]. Синтез изоформы Са-АТФазы SERCA2a при этом не нарушается, и хотя эта изоформа также присутствует в клетках эпидермиса, ее одной недостаточно для обеспечения нормального обмена Ca^{2+} . Это говорит о том, что именно изоформа Са-АТФазы SERCA2b играет ключевую роль в поддержании гомеостаза Ca^{2+} в клетках эпидермиса, однако молекулярные механизмы, приводящие к развитию патологических состояний при нарушении ее работы, пока не выяснены.

IX. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, даже краткий, далеко не полный обзор накопленных к настоящему времени данных позволяет видеть, что многочисленные изоформы Са-АТФазы, локализованные в мембранах эндоплазматического ретикулума, играют главную роль в поддержании низкой концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме клеток разных тканей [20]. Содержание Са-АТФазы в мембранах ретикулума разных типов мышечной ткани очень велико, поэтому неудивительно, что этот фермент интенсивно исследовался в течение последних десятилетий. К настоящему моменту Са-АТФаза СР скелетных мышц является един-

ственным представителем АТРаза Р-типа, для которого известна третичная структура [23]. Более того, уже удалось проследить за изменениями конформации молекулы фермента, которые обеспечивают перенос ионов Ca^{2+} через мембрану [27, 28]. Эти исследования позволили лучше понять, как работает не только Са-АТРаза, но и Na,К-АТРаза, Н,К-АТРаза и другие представители этого обширного семейства ионных насосов [20].

К сожалению, за рамками настоящего обзора остались многие аспекты, касающиеся функционирования Са-АТРаза ретикулума, в частности, вопрос о регуляции экспрессии этого фермента [164], его роли в термогенезе [165], возможной взаимосвязи и координации работы Са-АТРаза и Са-каналов (рианодиновых рецепторов) и участия других белков мембран ретикулума в обеспечении этой связи [166], а также о возможности использования фармакологических агентов для модуляции активности Са-АТРаза при патологических состояниях [167, 168]. Остался не затронутым вопрос о Са-АТРазах эндоплазматического ретикулума клеток растений [169] и многие другие. Все эти проблемы в настоящее время интенсивно исследуются во многих лабораториях и можно не сомневаться, что в данной области нас ожидает немало интересных открытий.

ЛИТЕРАТУРА

- Kielley, W.W., Meyerhof, O. (1948) J. Biol. Chem., **176**, 591–601.
- Marsh, B.B. (1952) Biochim. Biophys. Acta, **9**, 247–260.
- Hasselbach, W., Makinose, M. (1962) Biochem. Biophys. Res. Commun., **7**, 132–136.
- Martonosi, A. (1984) Physiol. Rev., **64**, 1240–1320.
- Inesi, G. (1985) Ann. Rev. Physiol., **47**, 573–601.
- Saito, A., Seiler, S., Chu, A., Fleischer, S. (1984) J. Biol. Chem., **259**, 13363–13369.
- Imagawa, T., Smith, J., Coronado, R., Campbell, K. (1987) J. Biol. Chem., **262**, 16636–16643.
- Ebashi, S. (1958) Arch. Biochem. Biophys., **76**, 410–423.
- Ритов В.Б., Мельгунов В.И., Комаров П.Г., Алексеева О.Н., Акимова Е.И. (1977) Докл. АН СССР, **233**, 727–733.
- Tada, M., Yamamoto, T., Tonomura, Y. (1978) Physiol. Rev., **59**, 1–79.
- Ebashi, S., Lipmann, F. (1962) J. Cell. Biol., **14**, 389–400.
- Meissner, G. (1975) Biochim. Biophys. Acta, **389**, 51–68.
- Roseblatt, M.S., Scales, D.J. (1989) Mol. Cell. Biochem., **87**, 57–69.
- De Meis, L., Inesi, G. (1982) In *Membrane Transport of Calcium* (Carafoli, E., ed.), Academic Press, London, pp. 22–226.
- Melgunov, V.I., Akimova, E.I. (1980) FEBS Lett., **121**, 235–238.
- Lund, S., Orlowski, S., De Foresta, B., Champeli, P., Le Maire, M., Moller, J.V. (1989) J. Biol. Chem., **264**, 4907–4915.
- Szymanska, G., Kim, H.W., Kranias, E.G. (1991) Biochim. Biophys. Acta, **1091**, 127–134.
- Lee, A.G. (1998) Biochim. Biophys. Acta, **1376**, 381–390.
- Vale, M.G., Carvalho, A.P. (1980) Biochem. J., **186**, 461–467.
- Moller, J.V., Juul, B., Le Maire, M. (1996) Biochim. Biophys. Acta, **1286**, 1–51.
- Mintz E., Guillain F. (1997) Biochim. Biophys. Acta, **1318**, 52–70.
- Toyoshima, C., Sasabe, H., Stokes, D.L. (1993) Nature, **362**, 467–471.
- Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H., Ogawa, H. (2000) Nature, **405**, 647–655.
- Allen, G., Trinnaman, B.J., Green, N.M. (1980) Biochem. J., **187**, 591–616.
- Danko, S., Daiho, T., Yamasaki, K., Kamidochi, M., Suzuki, H., Toyoshima, C. (2001) FEBS Lett., **489**, 277–282.
- Danko, S., Yamasaki, K., Daiho, T., Suzuki, H., Toyoshima, C. (2001) FEBS Lett., **505**, 129–135.
- Lee, A.G. (2002) Biochim. Biophys. Acta, **1565**, 246–266.
- Toyoshima, C., Nomura, H., Sugita, Y. (2003) FEBS Lett., **555**, 106–110.
- De Meis, L., Vianna, A.L. (1979) Ann. Rev. Biochem., **48**, 272–292.
- Jenks, W.P. (1989) J. Biol. Chem., **264**, 18855–18858.
- Jenks, W.P. (1995) Biosci. Rep., **15**, 283–287.
- Martonosi, A. (1996) Biochim. Biophys. Acta, **1275**, 111–117.
- MacLennan, D.H., Rice, W.J., Green, N.M. (1997) J. Biol. Chem., **246**, 2702–2710.
- Stokes, D.L., Wagenknecht, T. (2000) Eur. J. Biochem., **267**, 5274–5279.
- Degani, C., Boyer, P.D. (1973) J. Biol. Chem., **248**, 8222–8226.
- Sakamoto, J., Tonomura, Y. (1980) J. Biochem., **87**, 1721–1727.
- Takisawa, H., Makinose, M. (1981) Nature, **290**, 271–273.
- Beeler, T., Keffer, J. (1984) Biochim. Biophys. Acta, **773**, 99–105.
- Dupont, Y., Le Maire, M. (1980) FEBS Lett., **115**, 247–252.
- Tanford, C. (1984) FEBS Lett., **166**, 1–7.
- De Foresta, B., Chapeil, P., Le Maire, M. (1990) Eur. J. Biochem., **194**, 383–288.
- MacLennan, D.H., Campbell, K.P., Reithmeier, R.A.F. (1983) Calcium Cell Function, **4**, 151–173.
- Yano, K., Zorain-Herzberg, A. (1994) Mol. Cell. Biochem., **135**, 61–70.
- Krause, K., Michalak, M. (1997) Cell, **88**, 439–443.
- Coppolino, M.G., Dedhar, S. (1998) Int. J. Biochem. Cell Biol., **30**, 553–558.
- Leberer, E., Timms, B.G., Campbell, K.P., MacLennan, D.H. (1990) J. Biol. Chem., **265**, 10118–10124.
- Froemming, G.R., Ohlendieck, K. (1998) Biochim. Biophys. Acta, **1387**, 226–238.
- Suk, J.Y., Kim, Y.S., Park, W.J. (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun., **263**, 667–671.
- Hasselbach, W. (1978) Biochim. Biophys. Acta, **515**, 23–53.
- Mintz, E., Lacapere, J.J., Guillain, F. (1990) J. Biol. Chem., **265**, 18762–18768.
- Jenks, W.P., Yang, T., Peisach, D., Myung, J. (1993) Biochemistry, **32**, 7030–7034.
- Berman, M.C. (2000) Biochim. Biophys. Acta, **1509**, 42–54.
- Nakamura, J., Tajima, G., Sato, C., Furukohri, T., Konishi, K. (2002) J. Biol. Chem., **277**, 24180–24190.
- Nakamura, J., Tajima, G., Sato, C. (2002) J. Biol. Chem., **277**, 24191–24196.
- McWhirter, J.F., Gould, G.W., East, J.M., Lee, A.G. (1987) Biochem. J., **245**, 713–722.
- Stefanova, H.I., Napier, R.M., East, J.M., Lee, A.G. (1987) Biochem. J., **245**, 723–730.
- McWhirter, J.F., Gould, G.W., East, J.M., Lee, A.G. (1987) Biochem. J., **245**, 731–738.
- Henderson, I.M.J., Starling, A.P., Wic-tome, M., East, J.M., Lee, A.G. (1994) Biochem. J., **297**, 625–636.
- Лопуна О.Д., Рубцов А.М., Болдырев А.А. (1979) Биохимия, **44**, 306–316.

60. Rubtsov A.M., Lopina O.D., Boldyrev A.A. (1982) *Gen. Physiol. Biophys.*, **1**, 161–173.
61. Rubtsov A.M., Sentjurs M., Schara M. (1986) *Gen. Physiol. Biophys.*, **5**, 551–562.
62. Toyoshima, S., Nomura, H. (2002) *Nature*, **418**, 605–611.
63. Nielsen, G., Malmendal, A., Meissner, A., Moller, J.V., Nielsen, N.C. (2003) *FEBS Lett.*, **544**, 50–56.
64. Yamamoto, T., Tonomura, Y. (1967) *Biochem. J.*, **62**, 558–575.
65. Post, R.L., Hegyvary, C., Kume, S. (1972) *J Biol Chem.*, **247**, 6530–6540.
66. Wallmark, B., Stewart, H.B., Rabon, E., Saccomani, G., Sachs, G. (1980) *J. Biol. Chem.*, **255**, 5313–5319.
67. Meissner, G., Conner, G.E., Fleischer, S. (1973) *Biochim. Biophys. Acta*, **298**, 246–269.
68. Melgunov, V.I., Akimova, E.I. (1980) *FEBS Lett.*, **111**, 197–200.
69. MacLennan, D.H., Brandt, C.J., Korczak, B., Green, N.M. (1985) *Nature*, **316**, 696–700.
70. Moczydlowski, F.G., Fortes, P.A.G. (1981) *J. Biol. Chem.*, **256**, 2357–2366.
71. White, T.E., Dewey, T.G. (1987) *Membr. Biochem.*, **7**, 67–72.
72. Champeil, P., Riollot, S., Orlowski, S., Guillain, F., Seebregts, C.J., McIntosh, D.B. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 12288–12294.
73. Рубцов А.М. (1982) *Биохимия*, **47**, 1045–1054.
74. Луцак В.И., Рубцов А.М., Болдырев А.А. (1983) *Укр. биохим. журнал*, **55**, 507–512.
75. Coll, R.J., Murphy, A.J. (1985) *FEBS Lett.*, **187**, 131–134.
76. Coll, R.J., Murphy, A.J. (1991) *Biochemistry*, **30**, 1456–1461.
77. Carvalho-Alves, P.C., Oliveira, C.R., Verjovskij-Almeida, S. (1985) *J. Biol. Chem.*, **260**, 4282–4287.
78. Dupont, Y., Pougeois, R., Ronjat, M., Verjovsky-Almeida, S. (1985) *J. Biol. Chem.*, **260**, 7241–7249.
79. Maguire, P.B., Ohlendieck K. (1996) *FEBS Lett.*, **396**, 115–118.
80. Lennon, N.J., Harmon, S., Mackey, A., Ohlendieck, K. (1999) *Molec. Cell Biol. Res. Commun.*, **1**, 182–187.
81. Harmon, S., Froemmig, G.R., Leisner, E., Pette, D., Ohlendieck, K. (2001) *J. Appl. Physiol.*, **90**, 371–379.
82. Merino, J.M., Gutierrez-Merino, C., Henafo, F. (1999) *Arch. Biochem. Biophys.*, **368**, 298–302.
83. Муртазина Д.А., Мясн Н.В., Рубцов А.М., Лопина О.Д. (1997) *Биохимия*, **62**, 66–74.
84. Martonosi, A.N., Feretos, R. (1964) *J. Biol. Chem.*, **239**, 659–668.
85. Ligari, G., Stefani, M., Berti, A., Nassi, P., Ramponi, G. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.*, **200**, 357–363.
86. Inesi, G. (1971) *Science*, **171**, 901–903.
87. Nakamura, Y., Tonomura, Y. (1978) *J. Biochem.*, **83**, 571–583.
88. Ribeiro, J.M., Aragao, E.S., Vianna, A.L. (1980) *An. Acad. Bras. Cienc.*, **52**, 403–409.
89. Rossi, B., Leone, F., Gache, C., Lazdunski, M. (1979) *J. Biol. Chem.*, **254**, 2302–2307.
90. Caswell, A.H., Brandt, N.R. (1981) *J. Membr. Biol.*, **58**, 21–33.
91. Fortea, M.-I., Soler, F., Fernandes-Belda, F. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 12521–12529.
92. Brandt, C.J., Green, N.M., Korczak, B., MacLennan, D.H. (1986) *Cell*, **44**, 597–607.
93. Murphy, A.J. (1988) *Biochim. Biophys. Acta*, **946**, 57–65.
94. Maruyama, K., Clarke, D.M., Fujii, J., Inesi, G., Loo, T.W., MacLennan D.H. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 13038–13042.
95. Dode, L., Van Baelen, K., Wuytack, F., Dean, W.L. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 3911–3919.
96. Malysheva, A.N., Storey, K.B., Lopina, O.D., Rubtsov, A.M. (2001) *Biosci. Rep.*, **6**, 831–838.
97. Rubtsov A.M. (2001) In *Cell and Molecular Responses to Stress. Vol. 2. Protein Adaptations and Signal Transduction* (Storey, K.B., Storey, J.M., eds.), Elsevier Science, Amsterdam, pp. 57–71.
98. Мальшева А.Н., Стору К.Б., Зиганшин Р.Х., Лопина О.Д., Рубцов А.М. (2001) *Биохимия*, **66**, 1128–1136.
99. MacDonald, J.A., Storey, K.B. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **254**, 424–429.
100. Castellani, L., Hardwicke, P.M.D., Vibert, P. (1985) *J. Mol. Biol.*, **185**, 579–594.
101. Taylor, K.A., Mullner, N., Pikula, S., Dux, L., Peracchia, C., Varga, S., Martonosi, A. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 5287–5294.
102. Franzini-Armstrong, C., Ferguson, D. G. (1985) *Biophys. J.*, **48**, 607–615.
103. Baskin, R.J., Kawamoto, R. (1984) *Biochim. Biophys. Acta*, **771**, 109–118.
104. Scales, D., Inesi, G. (1976) *Biophys. J.*, **16**, 735–751.
105. Jilka, R.L., Martonosi, A.N., Tillack, T.W. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 7511–7524.
106. Baskin, R.J., Hanna, S. (1979) *Biochim. Biophys. Acta*, **576**, 61–70.
107. Napier, R.M., East, J.M., Lee, A.G. (1987) *Biochim. Biophys. Acta*, **903**, 374–380.
108. Murphy, A.J. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **70**, 160–166.
109. Andersen, J.P. (1989) *Biochim. Biophys. Acta*, **988**, 1–72.
110. Geimonen E., Batrukova M.A., Rubtsov A.M. (1994) *Eur. J. Biochem.*, **225**, 347–354.
111. Pick, U., Racker, E. (1979) *Biochemistry*, **18**, 108–113.
112. Kempner, E.S., Fleisher, S. (1989) *Methods Enzymol.*, **172**, 410–439.
113. Hymel, L., Maurer, A., Berenski, C., Jung, C.Y., Fleischer, S. (1984) *J. Biol. Chem.*, **259**, 4890–4895.
114. Hidalgo, C., Thomas, D.D., Ikemoto, N. (1978) *J. Biol. Chem.*, **253**, 6879–6887.
115. Mahaney, J.E., Thomas, D.D. (1991) *Biochemistry*, **30**, 7171–7180.
116. Vanderkooi, J.M., Ierokomas, A., Nakamura, H., Martonosi, A. (1977) *Biochemistry*, **16**, 1262–1267.
117. Ludi, H., Hasselbach, W. (1982) *Z. Naturforsch.*, **37**, 1170–1179.
118. Kracke, G.R., Martonosi, A. (1984) *Biophys. J.*, **45**, 190a.
119. Dux, L., Martonosi, A. (1983) *J. Biol. Chem.*, **258**, 2599–2603.
120. Taylor, K., Dux, L., Martonosi, A. (1984) *J. Mol. Biol.*, **174**, 193–204.
121. Andersen, J.P., Moller, J.V. (1985) *Biochim. Biophys. Acta*, **815**, 9–15.
122. Highsmith, S., Barker, D., Scales, D.J. (1985) *Biochim. Biophys. Acta*, **817**, 123–133.
123. Dux, L., Taylor, K.A., Ting-Beal, H.P., Martonosi, A. (1985) *J. Biol. Chem.*, **260**, 11730–11743.
124. Pikula, S., Mullner, N., Dux, L., Martonosi, A. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 5277–5286.
125. Chamberlain, B.K., Berenski, C.J., Jung, C.Y., Fleischer, S. (1983) *J. Biol. Chem.*, **258**, 11997–2001.
126. Le Maire, M., Jorgensen, K.E., Roigaard-Petersen, H., Moller, J.V. (1976) *Biochemistry*, **15**, 5805–5812.
127. Dean, W.L., Tanford, C. (1978) *Biochemistry*, **17**, 1683–1690.
128. Moller, J.V., Lind, K.E., Andersen, J.P. (1980) *J. Biol. Chem.*, **255**, 1912–1920.
129. Ikemoto, N., Nelson, R.W. (1984) *J. Biol. Chem.*, **259**, 11790–11797.
130. Kijima, Y., Takagi, T., Shigekawa, M., Tada M. (1990) *Biochim. Biophys. Acta*, **1041**, 1–8.
131. Andersen, J.P., Vilsen, B. (1985) *FEBS Lett.*, **189**, 13–17.
132. Moller, J.V., Andersen, J.P., Le Maire, M. (1982) *Mol. Cell. Biochem.*, **42**, 83–107.
133. Birmachu, W., Thomas, D. (1990) *Biochemistry*, **29**, 3904–3914.
134. Voss, J., Jones, L.R., Thomas, D.D. (1994) *Biophys. J.*, **67**, 190–196.
135. Karon, B.S., Mahaney, J.E., Thomas, D.D. (1994) *Biochemistry*, **33**, 13928–13937.
136. Mersol, J.V., Kutchai, H., Mahaney, J.E., Thomas, D.D. (1995) *Biophys. J.*, **68**, 208–215.
137. Kutchai, H., Mahaney, J.E., Geddis, L.M., Thomas, D.D. (1994) *Biochemistry*, **33**, 13208–13222.
138. Karon, B.S., Geddis, L.M., Kutchai, H., Thomas, D.D. (1995) *Biophys. J.*, **68**, 936–945.
139. Voss, J., Birmachu, W., Hussey, D.M., Thomas, D.D. (1991) *Biochemistry*, **30**, 7498–7506.
140. Voss, J.C., Mahaney, J.E., Thomas, D.D. (1995) *Biochemistry*, **34**, 930–939.
141. Рубцов А.М., Болдырев А.А., Личунь Янг, Макстей Д., Куини П.Дж. (1994) *Биохимия*, **59**, 1698–1706.

142. Quinn P.J., Yang L., McStay D., Lopina O.D., Rubtsov A.M., Boldyrev A.A. (1994) *Biochem. Soc. Trans.*, **22**, 383S.
143. Rubtsov, A.M., Lopina, O.D., Yang, L., McStay, D., Boldyrev, A.A., Quinn, P.J. (1994) In *The Sodium Pump. Structure, Mechanism, Hormonal Control and its Role in Disease* (Bamberg, E., Schoner, W., eds.), Steinkopff, Darmstadt, pp. 637–644.
144. Shorina E.A., Mast N.V., Lopina O.D., Rubtsov A.M. (1997) *Biochemistry*, **36**, 13455–13460.
145. Simmerman, H.K., Jones, L.R. (1998) *Physiol. Rev.*, **78**, 921–947.
146. Asahi, M., McKenna, E., Kurzydowski, K., Tada, M., MacLennan, D.H. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 15034–15038.
147. John, L.M., Lechleiter, J.D., Camacho, P. (1998) *J. Cell Biol.*, **142**, 963–973.
148. Odermatt, A., Becker, S., Khanna, V.K., Kurzydowski, K., Leisner, E., Pette, D., MacLennan, D.H. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 12360–12369.
149. Smith, W.S., Broadbridge, R., East, J.M., Lee, A.G. (2002) *Biochem. J.*, **361**, 277–286.
150. Hawkins, C., Xu, A., Narayanan, N. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 31198–31206.
151. Toyofuku, T., Kurzydowski, K., Narayanan, N., MacLennan, D.H. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 26492–26496.
152. Xu, A., Netticadan, T., Jones, D.L., Narayanan, N. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2B64**, 241–246.
153. Bayer, K.U., Harbers, K., Schulman, H. (1998) *EMBO J.*, **17**, 5598–5605.
154. Damiani, E., Sacchetto, S., Margreth, A. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **279**, 181–189.
155. Пелози М., Донелла-Деана А. (2000) *Биохимия*, **65**, 309–320.
156. Matsunaga, S., Harmon, S., Gohlsch, B., Ohlendieck, K., Pette, D. (2001) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **22**, 685–691.
157. Matsunaga, S., Inashima, S., Yamada, T., Watanabe, H., Hazama, T., Wada, M. (2003) *Eur. J. Physiol.*, **446**, 394–399.
158. Stavrianeas, S., Spangenburg, E., Batts, T., Williams, J.H., Klug, G.A. (2003) *Eur. J. Appl. Physiol.*, **89**, 63–68.
159. MacLennan, D.H. (2000) *Eur. J. Biochem.*, **267**, 5291–5297.
160. Pedersen, P.L. (2002) *J. Bioenerg. Biomembr.*, **34**, 327–332.
161. Dobson-Stone, C., Fairclough, R., Dunne, E., Brown, J., Dissanayake, M., Munro, C.S., Starchan, T., Burge, S., Sudbrak, R., Monaco, A.P., Hovnanian, A. (2002) *J. Invest. Dermatol.*, **118**, 338–343.
162. Takahashi, H., Atsuta, Y., Sato, K., Ishida-Yamamoto, A., Suzuki, H., Iizuka, H. (2001) *J. Dermatol. Sci.*, **26**, 169–172.
163. Dhitavat, J., Dode, L., Leslie, N., Sakuntabhai, A., Lorette, G., Hovnanian, A. (2003) *J. Invest. Dermatol.*, **121**, 486–489.
164. Simonides, W.S., Thelen, M.H.M., van der Linden, C.G., Muller, A., van Hardeveld, C. (2001) *Biosci. Rep.*, **21**, 139–154.
165. Block, B.A. (1994) *Ann. Rev. Physiol.*, **56**, 535–577.
166. Saiki, Y., Ikemoto, N. (1999) *Biochemistry*, **38**, 3112–3119.
167. Khan, S.Z., Longland, C.L., Michelangeli, F. (2000) *Biochem. Pharmacol.*, **60**, 1797–1806.
168. Frank, K., Bolck, B., Brixius, K., Kranias, E.G., Schwinger, R.H.G. (2002) *Basic Res. Cardiol.*, **1**, 1/72–178.
169. Sze, H., Liang, F., Hwang, I., Curran, A.C., Harper, J.F. (2000) *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **51**, 433–462.