

УДК 577.152.344

ПРОТЕИНАЗЫ СЕМЕЙСТВА КАЛЬПАИНОВ. СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ¹

© 2010 г. Н. Н. Немова, Л. А. Лысенко, Н. П. Канцерова

Институт биологии Карельского научного центра РАН

185910 Петрозаводск, ул. Пушкинская, д. 11

E-mail: nemova@krc.karelia.ru

Поступила в редакцию 16.02.10 г.

Окончательный вариант получен 19.02.10 г.

Проанализированы результаты исследований, представленные в современной литературе, а также собственные данные, посвященные изучению структуры, классификации, филогении кальцийзависимых протеолитических ферментов, или кальпаинов. Рассмотрены наиболее изученные функции кальпаинов в жизнедеятельности клетки. Обозначены некоторые еще не разрешенные вопросы, касающиеся биологической роли множественных белков семейства кальпаинов.

Ключевые слова: протеолиз, кальпаины, регуляция, функции.

Протеолиз — один из универсальных процессов живой природы — в настоящее время рассматривается как основной механизм биохимического контроля (Антонов, 1983; Kirschner, 2000). Современные методы белковой химии, молекулярной биологии и биоинформатики позволяют идентифицировать все большее число чрезвычайно разнообразных классов и семейств протеиназ, использующих различные механизмы катализа для гидролиза субстратов и приспособленных к широкому диапазону условий функционирования в различных организмах. Биоинформационный анализ генома человека показал, что протеиназы и их неактивные гомологи кодируются 1.7% структурных генов и таким образом составляют самую многочисленную группу ферментов, включающую 570 представителей, что превышает пул киназ (456 ферментов) и уступает только белкам семейства факторов транскрипции (Rawlings et al., 2004). Клеточный протеолитический аппарат высокоселективен и строго регулируется, поскольку избыточная деструкция жизненно необходимых белков или замедленная деградация короткоживущих регуляторных белков могут существенно изменить клеточные функции.

КАЛЬПАИНЫ КАК СОСТАВЛЯЮЩАЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОГО АППАРАТА КЛЕТКИ

Внутриклеточная деградация белков у эукариот и, по всей видимости, у многих прокариот — результат совместной деятельности кальпаинов, лизосомальных катепсинов и протеасом (Goll et al., 2003),

при этом кальпаины (EC 3.4.22.17) отвечают за инициацию процесса (Cottin et al., 1994). Кальпаины — конститутивные ферменты, но, по результатам ряда исследований (Cottin et al., 1994), их нельзя рассматривать как белки “домашнего хозяйства”, поскольку транскрипция их генов регулируется. Несмотря на то что физиологические функции кальпаинов еще окончательно не установлены, предполагается, что им свойственна регуляторная и сигнальная функции в значительно большей степени, чем катаболическая, характерная для лизосомальных протеиназ или протеасом (Goll et al., 2003). Кальпаины принимают участие в основных кальцийзависимых клеточных процессах — передаче сигнала, клеточном цикле, пролиферации, дифференцировке, миграции, апоптозе, слиянии мембран, формировании мышечных волокон и других (Sorimachi et al., 1997; Goll et al., 2003), а изменение их активности описано при некоторых метаболических нарушениях и дегенеративных заболеваниях (Tidball, Spencer, 2000; Suzuki et al., 2004).

Иммунологические исследования показывают, что кальпаины локализуются исключительно внутри клеток (Goll et al., 2003). Основной пул кальпаинов растворен в цитозоле, кроме того, за счет заряженных петель (Strobl et al., 2000) кальпаины способны ассоциироваться с плазматической мембраной и субклеточными органеллами, такими как миофибриллы скелетных мышц, элементы цитоскелета немускульных клеток, мембраны эндоплазматического ретикулума (ЭПР) и аппарата Гольджи (АГ), и проникать в люмены этих органелл (Hood et al., 2004). Эндогенный ингибитор кальпаинов кальпастатин обнаруживается на поверхности ЭПР и АГ как периферический белок (Hood et al., 2004). При повреждении тканей элиминация активного кальпаина в кровеносном русле и межклеточном

¹ Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 08-04-01140), Программой Президента РФ “Ведущие научные школы” (проекты № НШ-3731-2010-4, НШ-306-200844) и Программой Президиума РАН “Биологическое разнообразие”.

матрикс обеспечивается ингибиторами плазмы — α -2-макроглобулином и другими белками (Crawford, 1990).

Кальпаины присутствуют у большинства организмов: от бактерий до человека, исключая археобактерии и вирусы. Анализ полностью или частично расшифрованных геномов организмов (Croall, Ersfeld, 2007) показал, что лишь у немногих из них отсутствуют гены кальпаинов; у бактерий, большинства простейших, грибов и растений обнаруживается единственный ген кальпаина, тогда как у всех позвоночных животных и, как ни удивительно, у ряда паразитарных кинетопластид и инфузорий присутствует множество родственных генов кальпаинов. Большинство ферментов, кодируемых этими генами, еще не выделены, поэтому об их свойствах известно очень немного (Бондарева и др., 2006; Бондарева, Немова, 2008; Goll et al., 2003).

По современной классификации пептидаз, разработанной создателями базы данных MEROPS (Rawlings et al., 2008) и учитывающей гомологию аминокислотных последовательностей и сходство структурной организации, кальпаины выделены в индивидуальное семейство C2 клана цистеиновых пептидаз CA. К настоящему времени идентифицированы уже 673 последовательности, кодирующие кальпаины и их гомологи. Принадлежность белка к семейству определяется сходством его последовательности в области каталитического папаинподобного кора (домены Па и Пб) с типичной протеиназой семейства — кальпаином 2 человека. Термин “кальпаин” отражает чувствительность этих протеиназ к Ca^{2+} и их сходство с папаином в области каталитического домена.

СТРУКТУРА ТИПИЧНОЙ ПРОТЕИНАЗЫ СЕМЕЙСТВА

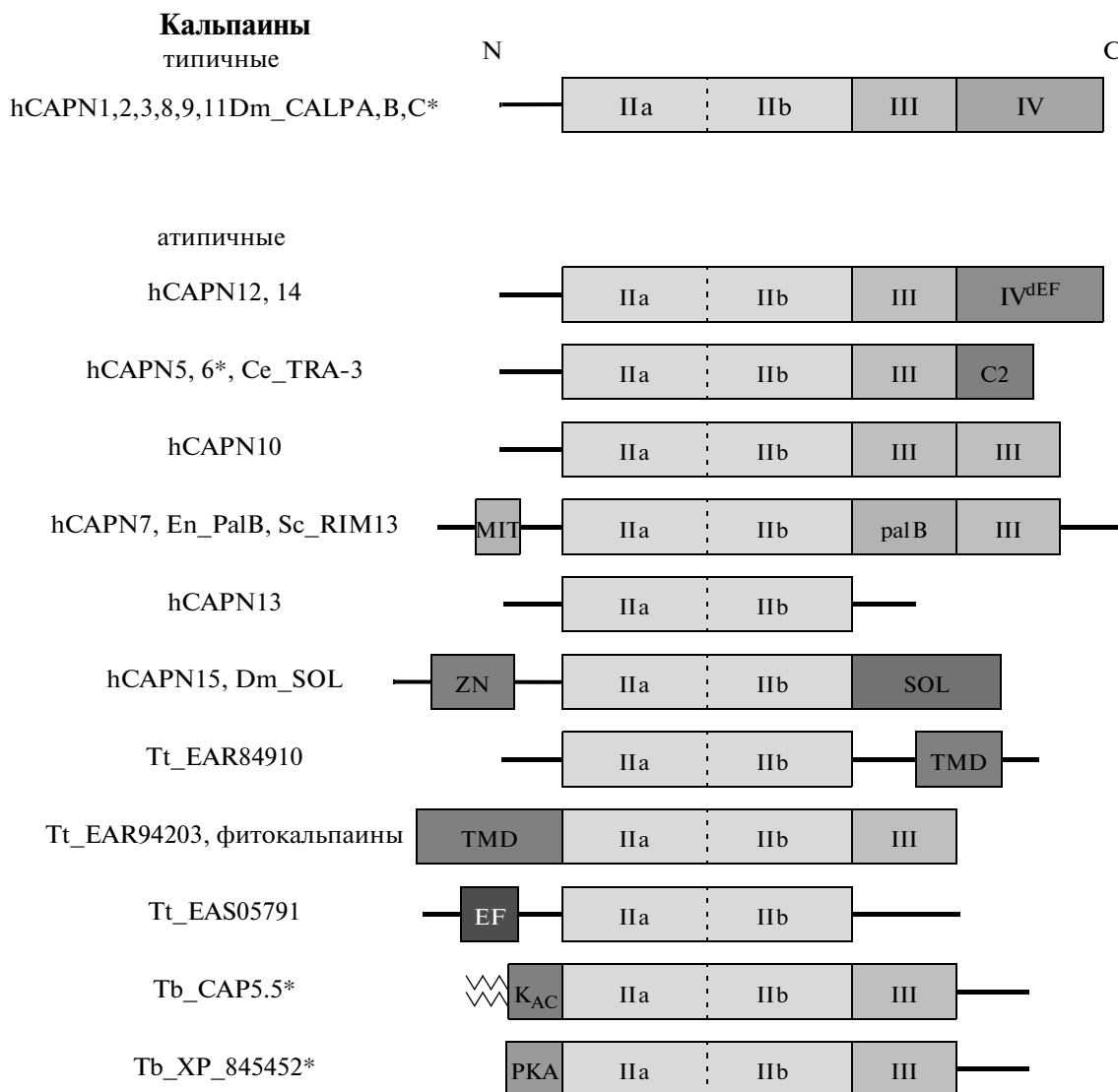
Наиболее полно охарактеризован кальпаин 2 человека, кодируемый геном *CAPN2*, — типичный фермент семейства C2 (Rawlings et al., 2008). Его ортолог был обнаружен первым из белков семейства в мозгу крысы почти полвека назад в 1964 г. Гуроффом (Dayton et al., 1976). Кальпаин 2 — субъединица более сложного фермента, m-кальпаина, который имеет структуру гетеродимера (Suzuki et al., 2004), при этом кальпаин 2 обладает полной каталитической активностью (Barrett et al., 1998). На основании аминокислотной последовательности он подразделяется на четыре домена (I–IV) (Suzuki, 1990) (рисунок), по данным рентгеноструктурного анализа, в составе домена II выделяют два субдомена, а между доменами III и IV обнаруживается линкерная область (Strobl et al., 2000). N-концевой домен I, или пропептид, не блокирует стерически активный центр (Strobl et al., 2000), поэтому его автокаталитическое отщепление не является необходимым условием для активации фермента. Каталитический домен II со-

держит типичную каталитическую триаду цистеиновых протеиназ: аминокислотный остаток (a.o.) Cys105 (субдомен Па), a.o. His262 (субдомен Пб) и a.o. Asp286 (субдомен Пб). По данным кристаллографии, каталитические остатки субдоменов в отсутствие Ca^{2+} разобщены (расстояние 1.05 нм), а связывание Ca^{2+} индуцирует конформационное изменение полноразмерной молекулы, которое приводит к сокращению расстояния между остатками триады до 0.37 нм, что обеспечивает их эффективное взаимодействие. Домен III обеспечивает сопряжение каталитического домена II и Ca^{2+} -связывающего домена IV, а также усиление Ca^{2+} -индуцированных конформационных изменений. Его пространственная организация имеет сходство с консервативным доменом C2 протеинкиназы C и ряда других белков, в связи с чем домен III называют C2-подобным. Функция его в составе полноразмерного белка, аналогично C2-домену, заключается в связывании Ca^{2+} и ассоциации с фосфолипидами мембран. Последовательность домена IV имеет сходство с кальмодулином (идентичных a.o. 24–44% для молекул человека) и содержит пять потенциальных Ca^{2+} -связывающих EF-hand-мотивов (Strobl et al., 2000). Учитывая сопряженное действие доменов II–IV, механизм активации кальпаинов рассматривается как Ca^{2+} -индуцируемая междоменная самоактивация.

КЛАССИФИКАЦИЯ КАЛЬПАИНОВ

В связи с постоянным пополнением информации о новых белках семейства классификация кальпаинов до настоящего времени уточняется. Так, лишь в 2008 г. было обособлено подсемейство C2B, включающее только кальпаины прокариот (типичный фермент — протеиназа *Trp Porphyromonas gingivalis*) (Rawlings et al., 2008). Все остальные кальпаины составляют многочисленное подсемейство C2A (типичный фермент — кальпаин 2 человека). Номенклатура кальпаинов также далека от завершения, пока не унифицированы названия генов кальпаинов у разных организмов: так, кальпаины человека обозначаются *CAPN* (у мыши и других млекопитающих — *capn*), дрозофилы и трипаносом — *CALP*, *Arabidopsis* — *DEK1*.

Среди ферментов многочисленного подсемейства C2A на основе структурных характеристик выделяют две группы кальпаинов — типичные и атипичные (Бондарева и др., 2006; Goll et al., 2003; Croall, Ersfeld, 2007) (рисунок). Типичные кальпаины (1–3, 8, 9, 11 человека и *CALPA*, B, C дрозофилы) имеют четырехдоменную организацию и содержат Ca^{2+} -связывающие EF-hand-мотивы в составе кальмодулинподобного домена IV. Атипичные кальпаины (5–7, 10, 12–15 человека) вместо кальмодулинподобного домена содержат в C-концевой области



Модульная организация белков семейства кальпаинов (по: Croall, Ersfeld, 2007, с изменениями); приведены все идентифицированные у человека гены кальпаинов (hCAPN), а также избранные примеры кальпаинов других видов: Dm – *Drosophila melanogaster*; Ce – *Caenorhabditis elegans*; En – *Emericella (Aspergillus) nidulans*; Sc – *Saccharomyces cerevisiae*; Tt – *Tetrahymena thermophila*; Tb – *Trypanosoma brucei*. (—) – последовательности, уникальные для каждого кальпаина; * белки, в которых отсутствуют ключевые а.о. каталитической триады и, как следствие, протеолитическая активность. Домены: C2 – дополнительный C2-подобный; IV^{dEF} – IV с дегенеративными EF-hand-мотивами, не способными связывать Ca²⁺; EF – с EF-hand-мотивами, отличный от домена IV; K_{AC} – ацилированный у кальпаинов кинетопластид; MIT – отвечающий за ассоциацию с микротрубочками и транспорт молекул; palB – гомолог palB; PKA – регуляторной субъединицы протеинкиназы A; SOL – малых оптических бугров (small optic lobe); TMD – трансмембранный; Zn – Zn-finger.

другие функциональные домены (T, SON, PBN), по наличию которых выделяют группы гомологов TRA-3, SOL, PalB. Единую филогенетическую группу составляют кальпаины, содержащие N-концевые трансмембранные домены. Анализ филогенетического древа, построенного по результатам сравнения последовательностей в области каталитического кора, подтвердил разделение кальпаинов на указанные группы (Jékely, Friedrich, 1999; Croall, Ersfeld, 2007).

КАЛЬПАИНЫ ЧЕЛОВЕКА

Ранее считалось, что кальпаиновая система человека включает три молекулы, присутствующие практически во всех тканях, – две Ca²⁺-зависимые протеиназы, микрокальпаин (100 мкМ Ca²⁺ для проявления максимальной активности *in vitro*) и милликальпаин (1 мМ), а также их высокоспецифичный эндогенный ингибитор кальпаистатин. Указанные кальпаины – гетеродимеры, содержащие каталитическую субъединицу с молекулярной массой

80 кДа (кодируемую генами *CAPN1* и *CAPN2* для микро- и милликальпаина соответственно) и единую регуляторную субъединицу с молекуляр. массой 28 кДа (кодируемую геном *CPNS1*, прежнее название — *CAPN4*) (Suzuki et al., 2004). Обычно в ткани присутствуют обе формы фермента, однако их относительное содержание варьирует в широких пределах (Suzuki et al., 2004). Первое сообщение о том, что кальпаиновая система включает и другие молекулы, помимо вышеуказанных, появилось в 1989 г., когда японские исследователи обнаружили в мышцах мРНК белка, последовательность которого гомологична (степень гомологии 51–54%) субъединице с молекуляр. массой 80 кДа известных ранее микро- и милликальпаинов (Sorimachi et al., 1989). Сейчас этот белок известен как кальпаин 3а (сплайс-вариант гена *CAPN3*). Успешно завершённый анализ генома человека позволил установить, что всего в нем содержится 14 последовательностей, кодирующих кальпаины; в тканях обнаружена экспрессия 13 из них, но лишь единицы выделены и полно охарактеризованы (Бондарева и др., 2006; Dear, Boehm, 1999; Goll et al., 2003; Suzuki et al., 2004).

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ КАЛЬПАИНОВ

Обладая мощным гидролитическим потенциалом в отношении основных белковых компонентов клетки, кальпаины регулируются на многих уровнях при помощи следующих механизмов — содержания активатора (Ca^{2+}) в цитозоле, реакционной способности SH-групп Cys в активном центре, эндогенного ингибитора кальпастина, фосфорилирования, аутолиза (Goll et al., 2003). К регуляции кальпастином чувствительны только кальпаины гетеродимерной структуры (микро- и милликальпаины и, по всей видимости, кальпаин 9), так как один из трех сайтов связывания фермента и ингибитора находится в последовательности малой субъединицы. Таким образом, не только ген малой субъединицы *CPNS1*, но и ген кальпастина *CAST* обнаруживаются только у позвоночных (Goll et al., 2003).

ФУНКЦИИ КАЛЬПАИНОВ

Высоковариабельная структура обнаруженных последовательностей кальпаинов и кальпаиноподобных молекул свидетельствует о широком разнообразии выполняемых ими клеточных функций. Специфичность действия кальпаинов — расщепление субстратов по ограниченному числу сайтов с образованием крупных, часто каталитически активных фрагментов — свидетельствует о том, что их приоритетная функция — регуляторная или сигнальная. Кальпаины регулируют ряд клеточных функций за счет протеолитической модификации сигнальных молекул, ферментов, контролирующих клеточный цикл, регуляцию экспрессии генов и не только. Большой объем информации о функциях

кальпаинов получен с помощью методов клеточной биологии и генетики (таблица). Проведенные на мышцах эксперименты по выключению экспрессии генов кальпаинов подтвердили жизненную важность милликальпаина (гены *capn2* и *capn4*), причем на очень ранней предимплантационной стадии эмбриогенеза (Arthur et al., 2000; Dutt et al., 2006), и слабое фенотипическое проявление подавления гена микрокальпаина (Azam et al., 2001; Dutt et al., 2006). Мыши с нокаутом гена *capn3* лишь незначительно отличаются от дикого типа, однако у человека функциональное нарушение кальпаина 3а, кодируемого этим геном, приводит к развитию мышечной дистрофии Эрба—Рота (*LGMD* типа 2А) (Duguez et al., 2006). Обнаружение кальпаинов, в активном центре которых замещены необходимые для катализа а.о., позволяет предположить, что в некоторых случаях кальпаины могут выполнять функции, не связанные с протеолизом; природа этих функций пока неизвестна.

Рассмотрим только некоторые, наиболее изученные функции кальпаинов.

Взаимодействие цитоскелета и мембраны: миграция клеток. Разрушение молекулярных комплексов прикрепления цитоскелета к мембране, — вероятно, наиболее четко установленная функция кальпаинов (Glading et al., 2002). Более 30 белков цитоскелета чувствительны к кальпаинам. Реорганизация цитоскелета в ходе слияния и миграции клеток сопровождается разнообразными физиологическими процессами — развитие, воспаление, метастазирование опухолей, слияние миобластов скелетных мышц в ходе дифференцировки. Направленная миграция клеток включает прикрепление лидирующего края к субстрату за счет формирования фокальных адгезивных контактов, что создает натяжение для перемещения тела клетки, а также кальпаинозависимое разрушение белков адгезионного комплекса на отстающем крае, которое приводит к сокращению “хвоста”.

Аномотоз. Установлено, что ведущую роль в регуляции апоптоза большинства клеток играют каспазы. Кальпаины способны модифицировать каспазный путь апоптоза, в некоторых случаях выступая в роли отрицательного регулятора за счет инактивации каспазы-7, 8 и 9 (Chua et al., 2000), а в других случаях — положительного регулятора (процессинг прокаспазы-12) (Nakagawa, Yuan, 2000). В культуре клеток китайского хомяка, характеризующихся сверхэкспрессией микрокальпаина и кальпастина, кальпаин тормозит апоптоз, индуцированный фактором α некроза опухоли (TNF- α), в то время как кальпастин предотвращает апоптоз, индуцированный тапсигаргином, ионофором A23187 и другими агентами (Lu et al., 2002).

Кальпаины также могут действовать как регуляторы каспазанезависимого пути апоптоза. Так, в тромбоцитах человека в присутствии необходимых

Физиологические функции кальпаинов, выявленные при помощи генетических методов (по: Croall, Ersfeld, 2007, с изменениями)

Целевой ген (разрушение или мутация)	Модельный организм	Фермент(ы)	Результат, изменение функции
<i>capns1</i> (<i>capn4</i>)	Мышь	Кальпаины 1, 2 и, возможно, 9	Гибель эмбриона на предимплантационной стадии – критически важен в ходе эмбриогенеза (Tan et al., 2006)
<i>capn1</i>	Тот же	Кальпаин 1	Жизнеспособные, фертильные мыши с некоторыми изменениями в тромбоцитах – не критичен для развития (Azam et al., 2001)
<i>capn2</i>	»	Кальпаин 2	Гибель эмбриона на ранней стадии эмбриогенеза – критически важен в развитии (Dutt et al., 2006)
<i>capn3</i> (природная мутация)	Мышь (человек)	Кальпаин 3	Нарушение регенерации мышц (мышь), миопатия Эрба–Рота (LGMD2A) (человек) (Duguez et al., 2006)
<i>capn9</i> / нокаут гомозиготного гена	Клеточная культура мыши NIH3T3	Кальпаин 9	Повышенная пролиферация клеток – потенциальный опухолевый супрессор (Liu et al., 2000)
<i>capn10</i> (популяционная варибельность)	Человек	Кальпаин 10	Потенциальный фактор риска развития диабета типа 2; транспорт GLUT4 (Turner et al., 2005)
<i>dek1</i> (природная мутация)	Кукуруза, <i>Arabidopsis</i> , табак	Фитокальпаин	Гибель на стадии зародыша (кукуруза), дефекты развития (Lid et al., 2005)
<i>tra3</i> (<i>capn5</i>) (мутация и генная инженерия)	<i>C. elegans</i>	Tra3	Половая детерминация (Sokol, Kuwabara, 2000)
<i>palB</i> (<i>capn7</i>) (мутация)	<i>Emericella nidulans</i>	PalB	Нарушение пути передачи pH-сигнала (Nozawa et al., 2003)

участников каспазного пути (каспазы-9, 3, активаторов каспаз АРАФ-1 и цитохрома с) именно активация кальпаинов (микрокальпаина), а не каспаз служит пусковым сигналом к апоптозу (Wolf et al., 1999). Результаты проведенных исследований показывают, что участие кальпаинов в апоптозе инициируется специфичными сигналами и ограничивается немногими типами клеток (Kidd et al., 2000).

РОЛЬ КАЛЬПАИНОВ В ОНТОГЕНЕЗЕ

Высокоселективный кальпаинозависимый протеолиз рассматривается как основной протеолитический путь, который обеспечивает поддержание клеточного гомеостаза (Chondrogianni et al., 2002) и имеет особое значение в процессах развития и дифференцировки как инструмент направленной инактивации стадийспецифичных белков и оперативной замены ферментов, запасенных в оогенезе (Немова, 1996). Созревание половых продуктов у рыб, ракообразных и других водных организмов сопровождается повышением кальцийзависимого протеолиза во всех органах, за исключением гонад (Немова и др., 1993, 2001; Немова, 1996; Мухин и др., 2000), что может быть связано с оттоком пластического материала в развивающиеся гонады. Инициация мейоза в ооцитах морской звезды сопровождается резким подъемом Ca^{2+} , разрушением ядерной оболоч-

ки и расщеплением белков ламины, чувствительных к кальпаинам (Santella et al., 2000). Микроинъекция кальпаина в ядро профазных ооцитов является пусковым сигналом к мейозу. В яйцах *Xenopus* микрокальпаин запускает переход к стадии метафазы, расщепляя протеинкиназу pp39^{mos} (Watanabe et al., 1989).

В половых клетках позвоночных (млекопитающих, рыб) экспрессируется полная кальпаиновая система, включая микро- и микрокальпаины (экспрессия микрокальпаина повышается при переходе к мейозу) и кальпастатин (Немова и др., 1993; Haim et al., 2006). При этом кальпаины концентрируются в области акросомы (Ben-Aharon et al., 2005), а кальпастатин ассоциируется с поверхностью мембран, обращенной в цитозоль, что пространственно облегчает контроль активности кальпаинов в процессе акросомальной реакции при оплодотворении. Повышение уровня внутриклеточного Ca^{2+} – наиболее раннее событие при активации оплодотворенной яйцеклетки, индуцированной проникновением сперматозоида (Эпель, 1992). Активация яйца сопровождается активацией кальпаинов (Haim et al., 2006), о чем судят по расщеплению α -спектрина (Ben-Aharon et al., 2005). Этап активации яйцеклетки, на котором необходима протеолитическая активность кальпаина, сопровождается пространственным разобщением микрокальпаина и кальпас-

тапина, т.е. фермент “уходит” из-под контроля его регулятора (Haim et al., 2006). Ингибиторы кальпаинов подавляют запуск мейоза в партеногенетических ядрах, снижают акросомальную и кортикальную реакцию, а также эффективно ингибируют оплодотворение *in vitro* в дозозависимой манере (Ben-Aharon et al., 2005).

Доказана абсолютная необходимость милликальпаина в раннем развитии животных (Dutt et al., 2006). Нормальное эмбриональное развитие в отсутствие микрокальпаина (Azam et al., 2001) может объясняться либо более поздней его экспрессией, либо тем, что милликальпаин в ряде ситуаций может компенсировать отсутствие микрокальпаина. Это свидетельствует о функциональной разнокачественности этих форм кальпаинов *in vivo* при почти полной идентичности их субстратной специфичности. Можно предположить, что эти белки могут выполнять идентичные физиологические функции, но отвечать на разные клеточные сигналы. Показана регуляторная роль тканеспецифичного ортолога кальпаина 8a в эмбриогенезе амфибий *Xenopus laevis* (Duan et al., 2002). Обнаружено повышение уровня экспрессии и активности микро- и милликальпаинов при имплантации бластоцисты в матку млекопитающих (Elce et al., 1984), при созревании плацент (Thompson et al., 2002), отмечена необычайно высокая активность милликальпаина в матке при беременности (Elce et al., 1984) и в процессе ее инволюции. Такая высокая активность кальпаинов в течение беременности пока не получила объяснения.

В развивающейся икре и ранних личинках рыб можно выделить своеобразные “критические” периоды развития зародышей, когда активность кальпаинов существенно изменяется (Немова и др., 1993; Немова, 1996): готовность яйцеклетки к оплодотворению коррелирует с высокой активностью кальпаинов (Немова и др., 1993), следующий “всплеск” активности кальпаинов наблюдается при гастрюляции, последний — при выклеве личинок (Немова, Сидоров, 1984), так как процесс дезинтеграции яйцевых оболочек, несомненно, связан с деятельностью протеолитических ферментов. Указанные “критические” периоды сопровождаются активацией и других протеолитических систем (например, лизосомальной) (Немова, Сидоров, 1984, 1985), завершающих кальпаининдуцированный процесс деструкции белков. У рыб в ходе раннего дробления синтез белка увеличивается очень медленно, следовательно, процессы оплодотворения и раннего дробления “обслуживаются” протеиназами, запасенными в оогенезе. В данном случае правильнее говорить не о синтезе, а об активации предсуществующих ферментов, которая происходит либо путем удаления соответствующих ингибиторов, либо за счет изменения субклеточной локализации кальпаинов.

Кальпаины и кальпаастатин участвуют в процессе клеточной дифференцировки (Nakamura et al., 1992), например в слиянии миобластов скелетных мышц. В локусе слияния миобластов происходит обширная реорганизация комплексов прикрепления цитоскелета и мембран, осуществляемая синергично микро- и милликальпаинами, а также кальпаинами 3a и 6 (Dear, Boehm, 1999), при этом уровень кальпаастатина на ранних этапах дифференцировки снижен, а в процессе слияния ингибитор отсутствует (Varnouy et al., 2005). Значительное повышение экспрессии и активности m-кальпаина в эмбриональных миоблестах наблюдается ранее, чем инициируется экспрессия милликальпаина (Cottin et al., 1994).

Адаптация мышечной ткани к хроническому растяжению, нагрузке, разгрузке, иммобилизации и старению обеспечивается специфичной ответной реакцией кальпаин-зависимого протеолиза в ответ на механическое напряжение (Blazevich, Sharp, 2005). Кальпаинам принадлежит ведущая роль в быстром изменении скорости обмена миофибриллярных белков при действии этих факторов (Dayton et al., 1976), а лизосомальные протеиназы через несколько суток после воздействия завершают гидролиз (Tidball, 1995). Основная причина повреждения мышечной ткани как при избыточной нагрузке, так и при разгрузке — прогрессирующая утрата способности мышц к поддержанию уровня Ca^{2+} (Murphy et al., 2006). Ca^{2+} -индуцированное усиление протеолиза в мышцах сопровождается потерей белков-субстратов кальпаинов (Goll et al., 1991) и подавляется ингибиторами кальпаинов, но не лизосомотропными агентами (Zeman et al., 1985). Фрагменты автокаталитического расщепления микро- и милликальпаинов играют роль стимулятора миогенеза, активируя пролиферацию миобластов и их дифференцировку (Shewchuk, 2003).

Предполагают (Kunimatsu et al., 1989), что кальпаины выполняют определенную роль в развитии *воспаления*: автокаталитические N-концевые фрагменты домена I, аналогично пептидам бактериального происхождения, индуцируют хемотаксис нейтрофилов, их агрегацию, продукцию активных форм кислорода, изменение цитоскелета и дегрануляцию.

Результаты экспериментов по воздействию *голодания* на теплокровных и рыб указывают на то, что оно сопровождается ускоренной деградацией белков, преимущественно миофибриллярных (Немова и др., 1980). Голодание животных в течение 1–8 сут стимулирует экспрессию основных протеолитических систем: микро-, милликальпаинов и кальпаина 3a (активность кальпаастатина в этих условиях не изменяется), а также конститутивных α -субъединиц протеасомы 20S, катепсинов B и D и каспазы-3 (Ilian, Forsberg, 1992). У рыб, для большинства из которых голодание сопровождается зимовальным и

нерестовый периоды, этот этап сопровождается повышением уровня экспрессии микро- и милликальпаинов и кальпастатина (Salem et al., 2005). Обеспечение энергетических потребностей организма поддерживается за счет способности к аутофагии, при этом белковые резервы расходуются позже, чем углеводные и липидные, — начиная с середины периода низких температур наблюдается прогрессивное повышение активности внутриклеточных протеиназ — милликальпаина и катепсинов (Немова и др., 1980; Немова, Высоцкая, 1989; Salem et al., 2005). В период нерестового голодания (например, у рыб сем. Salmonidae) за счет эндогенного питания поддерживается не только жизнеспособность особи, но и формирование массы гонад. Активация нейтральных и кислых протеиназ у лососей приводит к гидролизу скелетных мышц, а также сердечной мышцы и сосудистой стенки (Немова, Высоцкая, 1989; Немова, 1996), что может быть одной из возможных причин их гибели после нереста.

В заключении следует кратко обозначить некоторые еще не разрешенные вопросы относительно биологической роли множественных белков семейства кальпаинов:

1) выделение и биохимическая характеристика большинства кальпаинов, а также идентификация возможных связывающихся с ними партнеров;

2) изменение функций белка при ассоциации протеолитического кора с определенными модулями;

3) модуляция функций кальпаинов посредством белок-белковых взаимодействий, связывания с мембранами, связывания с кальцием и посттрансляционной модификации;

4) регуляция протеолитических и непротеолитических кальпаинов;

5) альтернативная функция белков семейства, в которых отсутствуют ключевые а.о. каталитической триады;

6) условия, при которых экспрессируются специфичные изоформы и множество их возможных сплайс-вариантов в тканеспецифичной или время-зависимой манере; функция(и) индивидуальных изоформ в многообразии физиологических ситуаций: от прокариот до человека;

7) биосенсоры для визуализации активности кальпаинов (или их активации), подобных тем, что применяются для молекул других сигнальных путей, детекция участия кальпаинов в клеточных процессах при помощи клеточных репортерных субстратов и кальпастатина, который селективно связывается с кальпаинами 1 и 2 в активной конформации;

8) точная характеристика на уровне транскрипции, трансляции и активности, позволяющая детектировать множество сплайс-вариантов;

9) регуляторные пути, в которых участвуют кальпаины, полный перечень их субстратов *in vivo*, регуляторы всех функций кальпаинов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Антонов В.К. Химия протеолиза. М.: Мир, 1983. 367 с.
- Бондарева Л.А., Немова Н.Н. Молекулярная эволюция внутриклеточных Ca^{2+} -зависимых протеиназ // Биоорган. химия. 2008. Т. 34. № 3. С. 295–302.
- Бондарева Л.А., Немова Н.Н., Кяйвярайнен Е.И. Внутриклеточная Ca^{2+} -зависимая протеолитическая система животных. М.: Наука, 2006. 294 с.
- Мухин В.А., Немова Н.Н., Кяйвярайнен Е.И. и др. Кальцийактивируемая протеиназа в половых гаметах морского зеленого ежа (*Strongylocentrotus droebachiensis*) // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 2000. Т. 36. С. 3–6.
- Немова Н.Н. Внутриклеточные протеолитические ферменты у рыб. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 1996. 104 с.
- Немова Н.Н., Высоцкая Р.У. Активность лизосомальных протеиназ в раннем развитии *Artemia salina* // Биохимия экто- и эндотермных организмов. Петрозаводск: КарНЦ, 1989. С. 112–116.
- Немова Н.Н., Сидоров В.С. Лизосомальные протеиназы в эмбриогенезе лосося *Salmo salar* L. // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 1984. Т. 20. С. 576–580.
- Немова Н.Н., Сидоров В.С. Кислая протеиназа из икры радужной форели // Укр. биохим. журн. 1985. Т. 3. С. 22–26.
- Немова Н.Н., Сидоров В.С., Пунамти П.О. Лизосомальное переваривание белков органов лосося *Salmo salar* L. при голодании в условиях содержания в садках в преднерестовый период // Вопр. ихтиологии. 1980. Т. 120. С. 180–182.
- Немова Н.Н., Кяйвярайнен Е.И., Мосолов В.В. и др. Кальцийактивируемая протеиназа в эмбриогенезе лосося *Salmo salar* L. // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 1993. Т. 3. С. 231–235.
- Немова Н.Н., Кяйвярайнен Е.И., Крупнова М.Ю. и др. Механизмы протеолитической регуляции в развитии гидробионтов // Вопр. рыболовства. 2001. Прил. 1. С. 189–192.
- Эпель Д. Инициирование развития в период оплодотворения // Онтогенез. 1992. Т. 23. С. 213–227.
- Arthur J.S.C., Elce J.S., Hegadorn C. et al. Disruption of the murine calpain SC subunit gene, *Capn4*: Calpain is essential for embryonic development but not for cell growth and division // Mol. Cell Biol. 2000. V. 20. P. 4474–4481.
- Azam M., Andarabi S., Sahr K. et al. Disruption of the mouse μ -calpain gene reveals an essential role in platelet function // Ibid. 2001. V. 21. P. 2213–2220.
- Barnoy S., Maki M., Kosower N.S. Overexpression of calpastatin inhibits L8 myoblast fusion // Biochem. Biophys. Res. Comm. 2005. V. 332. P. 697–701.
- Barrett A.J., Rawlings N.D., Woessner J.F. Handbook of proteolytic enzymes. London: Academic, 1998. 125 p.

- Ben-Aharon I., Brown P.R., Etkovitz N. et al.* The expression of calpain 1 and calpain 2 in spermatogenic cells and spermatozoa of the mouse // *Reproduction*. 2005. V. 129. P. 435–442.
- Blazevich A.J., Sharp N.C.* Understanding muscle architectural adaptation: macro- and micro-level research // *Cells Tiss. Organs*. 2005. V. 181. №. 1. P. 1–10.
- Chondrogianni N., Fragoulis E.G., Gonos E.S.* Protein degradation during aging: the lysosome-, the calpain and the proteasome-dependent cellular proteolytic systems // *Biogerontology*. 2002. V. 3. P. 121–123.
- Chua B.T., Guo K., Li P.* Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 5131–5135.
- Cottin P., Brustis J.J., Poussard S.* Ca²⁺-dependent proteinases (calpains) and muscle cell differentiation // *Biochim. Biophys. Acta*. 1994. V. 1223. P. 170–178.
- Crawford C.* Protein and peptide inhibitors of calpains. In: *Intra-cellular calcium-dependent proteolysis*. Boca Raton: CRC, 1990. P. 75–89.
- Croall D.E., Ersfeld K.* The calpains: modular designs and functional diversity // *Genome Biol.* 2007. V. 8. P. 218.1 – 218.11.
- Dayton W.R., Goll D.E., Zeece M.G. et al.* A Ca²⁺-activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Purification from porcine muscle // *Biochemistry*. 1976. V. 15. P. 2150–2158.
- Dear T.N., Boehm T.* Diverse mRNA expression patterns of the mouse calpain genes *Capn5*, *Capn6*, and *Capn11* during development // *Mech. Devel.* 1999. V. 89. P. 201–209.
- Duan W.R., Ito M., Lee E.J.* Estrogen regulates a tissue-specific calpain in the anterior pituitary // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2002. V. 295. P. 261–266.
- Duguez S., Bartoli M., Richard I.* Calpain 3: a key regulator of the sarcomere? // *FEBS J.* 2006. V. 273. P. 3427–3436.
- Dutt P., Croall D.E., Arthur J.S.* m-Calpain is required for preimplantation embryonic development in mice // *BMC Devel. Biol.* 2006. V. 6. P. 3.
- Elce J.S., Baenziger J.E., Young D.C.* Ca²⁺-activated proteinase in the rat. Quantification by immunoassay in the uterus during pregnancy and involution, and in other tissues // *Biochem. J.* 1984. V. 220. P. 507–512.
- Glading A., Lauffenburger D.A., Wells A.* Cutting to the chase: calpain proteases in cell motility // *Trends Cell Biol.* 2002. V. 12. P. 46–54.
- Goll D.E., Dayton W.R., Singh I. et al.* Studies of the α -actinin/actin interaction in the Z-disk by using calpain // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. P. 8501–8510.
- Goll D.E., Thompson V.F., Li H. et al.* The calpain system // *Physiol. Rev.* 2003. V. 83. P. 731–801.
- Haim K., Ben-Aharon I., Shalgi R.* Expression and immunolocalization of the calpain-calpastatin system during parthenogenetic activation and fertilization in the rat egg // *Reproduction*. 2006. V. 131. P. 35–43.
- Hood J.L., Brooks W.H., Roszman T.L.* Differential compartmentalization of the calpain/calpastatin network with the endoplasmic reticulum and *Golgi apparatus* // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 43126–43135.
- Ilian M.A., Forsberg N.E.* Gene expression of calpains and their specific endogenous inhibitor, calpastatin, in skeletal muscle of fed and fasted rabbits // *Biochem. J.* 1992. V. 287. P. 163–171.
- Jékely G., Friedrich P.* The evolution of the calpain family as reflected in paralogous chromosome regions // *J. Mol. Evol.* 1999. V. 49. №. 2. P. 272–281.
- Kidd V.J., Lahti J.M., Teitz T.* Proteolytic regulation of apoptosis // *Cell Devel. Biol.* 2000. V. 11. P. 191–201.
- Kirschner M.* Intracellular proteolysis // *TCB*. 2000. V. 9. №. 12. P. M42–M45.
- Kunimatsu M., Higashiyama S., Sato K. et al.* Calcium dependent cysteine proteinase is a precursor of a chemotactic factor for neutrophils // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1989. V. 164. P. 875–882.
- Lid S., Olsen L., Nestesog R. et al.* Mutation in the *Arabidopsis thaliana DEK1* calpain gene perturbs endosperm and embryo development while over-expression affects organ development globally // *Planta*. 2005. V. 221. P. 339–351.
- Liu K., Li L., Cohen S.N.* Antisense RNA-mediated deficiency of the calpain protease, nCL-4, in NIH3T3 cells is associated with neoplastic transformation and tumorigenesis // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 31093–31098.
- Lu T., Xu Y., Mericle M.T.* Participation of the conventional calpains in apoptosis // *Biochim. Biophys. Acta*. 2002. V. 1590. P. 16–26.
- Murphy R.M., Snow R.J., Lamb G.D.* μ -Calpain and calpain-3 are not autolyzed with exhaustive exercise in humans // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2006. V. 290. P. 116–122.
- Nakagawa T., Yuan J.* Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis // *J. Cell Biol.* 2000. V. 150. P. 887–894.
- Nakamura M., Mori M., Morishita Y. et al.* Specific increase in calcium-activated neutral protease with low calcium sensitivity (m-calpain) in proerythroblastic K562 cell line cells induced to differentiation by phorbol 12-myristate 13-acetate // *Ex. Cell Res.* 1992. V. 200. P. 513–522.
- Nozawa S.R., May G.S., Martinez-Rossi N.M. et al.* Mutation in a calpain-like protease affects the posttranslational mannosylation of phosphatases in *Aspergillus nidulans* // *Fungal. Genet. Biol.* 2003. V. 38. P. 220–227.
- Rawlings N.D., Tolle D.P., Barrett A.J.* MEROPS: the peptidase database // *Nucl. Acids Res.* 2004. V. 32. P. D160–D164.
- Rawlings N.D., Morton F.R., Kok C.Y. et al.* MEROPS: the peptidase database // *Ibid.* 2008. V. 36. P. D320–D325.
- Salem M., Nath J., Rexroad C.E. et al.* Identification and molecular characterization of the rainbow trout calpains (Capn1 and Capn2): their expression in muscle wasting during starvation // *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 2005. V. 140. P. 63–71.
- Santella L., Kyozuka K., Hoving S. et al.* Breakdown of cytoskeletal proteins during meiosis of starfish oocytes and proteolysis induced by calpain // *Exp. Cell Res.* 2000. V. 259. P. 117–126.
- Shewchuk L.D.* An emerging role for calpain in skeletal muscle adaptation // *Diss. Abstr. Int.* 2003. V. 63. №. 12. P. 5629.

- Sokol S.B., Kuwabara P.E.* Proteolysis in *Caenorhabditis elegans* sex determination: cleavage of TRA-2A by TRA-3 // *Genes Devel.* 2000. V. 14. P. 901–906.
- Sorimachi H., Imajoh-Ohmi S., Emori Y. et al.* Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependent protease distinct from both m- and μ -types. Specific expression of the mRNA in skeletal muscle // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. P. 20106–20111.
- Sorimachi H., Ishiura S., Suzuki K.* Structure and physiological function of calpains // *Biochem. J.* 1997. V. 328. P. 721–732.
- Strobl S., Fernandez-Catalan C., Braun M. et al.* The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. P. 588–592.
- Suzuki K.* The structure of the calpains and the calpain gene. In: *Intra-cellular calcium-dependent proteolysis.* Boca Raton: CRC, 1990. P. 25–35.
- Suzuki K., Hata S., Kawabata Y.* Structure, activation, and biology of calpain // *Diabetes.* 2004. V. 53 (Suppl.1). P. 12–18.
- Tan Y., Dourdin N., Wu C. et al.* Conditional disruption of ubiquitous calpains in the mouse // *Genesis.* 2006. V. 44. P. 297–303.
- Thompson V.F., Saldaña S., Cong J. et al.* The calpain system in human placenta // *Life Sci.* 2002. V. 70. P. 2493–2508.
- Tidball J.G.* Inflammatory cell response to acute muscle injury. Review // *Med. Sci. Sports Exerc.* 1995. V. 27. P. 1022–1032.
- Tidball J.G., Spenser M.J.* Calpains and muscular dystrophies // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2000. V. 32. P. 1–5.
- Turner M.D., Cassell P.G., Hitman G.A.* Calpain-10: from genome search to function // *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2005. V. 21. P. 505–514.
- Watanabe N., Van De Woude G.F., Ikawa Y.* Specific proteolysis of the *c-mos* proto-oncogene product by calpain in fertilization of *Xenopus* eggs // *Nature.* 1989. V. 342. P. 505–511.
- Wolf B.B., Goldstein J.C., Stennicke H.R. et al.* Calpain functions in a caspase-independent manner to promote apoptosis-like events during platelet activation // *Blood.* 1999. V. 94. P. 1683–1692.
- Zeman R.J., Kameyama T., Matsumoto K. et al.* Regulation of protein degradation in muscle by calcium. Evidence for enhanced nonlysosomal proteolysis associated with elevated cytosolic calcium // *J. Biol. Chem.* 1985. V. 260. P. 13619–13624.

Proteinases of the Calpain Family: Structure and Functions

N. N. Nemova, L. A. Lysenko, and N. P. Kantserova

*Biological Institute, Karelian Branch, Russian Academy of Sciences, ul. Pushkinskaya 11, Petrozavodsk, 185910 Russia
e-mail: nemova@krc.karelia.ru*

Abstract—Results of studies presented in recent papers and personal data related to investigation of structure, classification, phylogeny of calcium-dependent peptidases or calpains have been analyzed. The most extensively studied functions of calpains in cell activity have been examined. Some not yet resolved questions concerned with the biological role of a great number of proteins of the calpain family have been defined.

Key words: proteolysis, calpains, regulation, functions