

ОГЛЯДИ

УДК 577.352.4

Mg²⁺, АТР-ЗАЛЕЖНА КАЛЬЦІЄВА ПОМПА ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВИХ КЛІТИН. І. СТРУКТУРНА ОРГАНІЗАЦІЯ ТА ВЛАСТИВОСТІ

Т. О. ВЕКЛИЧ, Ю. Ю. МАЗУР, С. О. КОСТЕРІН

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: veklich@biochem.kiev.ua, yuliya.vorona@gmail.com*

Регуляція концентрації Ca²⁺ у цитоплазмі має вирішальне значення у функціонуванні клітин. Зміна концентрації Ca²⁺ відіграє фундаментальну роль й у гладеньком'язових клітинах, оскільки це обумовлює процеси скорочення/розслаблення. Одним із ключових протеїнів, який бере участь у регуляції концентрації Ca²⁺ в цитоплазмі, є Mg²⁺, АТР-залежна Ca²⁺-помпа плазматичної мембрани. Тому питання регуляції активності та пошук препаратів, які дозволяли б цілеспрямовано змінювати активність Ca²⁺-помпи плазматичної мембрани, є актуальним у контексті сучасних біохімічних досліджень механізмів енерго- та фармакомеханічного спряження збудження і скорочення м'язів. В огляді узагальнено дані літератури і результати власних досліджень щодо властивостей Ca²⁺-помпи плазматичної мембрани клітин гладеньких м'язів. Розглянуто структурну організацію, кінетичні властивості та молекулярну біологію цієї транспортної системи.

Ключові слова: Ca²⁺, Mg²⁺-АТРаза, плазматична мембрана, гладеньком'язові клітини, міометрій, калікс[4]арени.

Іони Ca є універсальним клітинним неорганічним месенджером і саме під контролем Ca²⁺-залежних сигналів знаходиться більшість клітинних процесів: скорочення м'язів, проліферація, секреція, а також апоптоз. Кальцієві сигнали значною мірою визначаються системами підтримання концентрації цитоплазматичного Ca²⁺ ([Ca²⁺]_c), у чому особливу роль відіграють як енергонезалежні системи транспорту Ca²⁺ у клітину, так і енергозалежні системи викиду зазначеного іону з цитоплазми.

У гладеньких м'язах (ГМ) Ca²⁺ потрапляє до цитоплазми з позаклітинного простору крізь плазматичну мембрану (ПМ) або із внутрішньоклітинних Ca²⁺ депо, в основному із саркоплазматичного ретикулума (СР). За надходження Ca²⁺ у цитоплазму відповідають Ca²⁺-канали, розташовані на ПМ та СР. У ПМ знаходяться 3 типи Ca²⁺-каналів: потенціал-, ліганд- і депокеровані Ca²⁺-канали; тоді як на мембрані СР – 2 типи лігандкерованих: ріанодинові та інозитол-1,4,5-трифосфатні [1, 2]. Інозитол-

1,4,5-трифосфатні рецептори на СР гладеньких м'язів відкриваються під впливом інозитол-1,4,5-трифосфату (IP₃), що утворюється фосфоліпазою С. Ріанодинові рецептори активуються кофеїном, підвищенням [Ca²⁺]_c та перевантаженням Ca²⁺ СР [3]. Джерела входу Ca²⁺ взаємопов'язані між собою. Наприклад, вивільнення Ca²⁺ із СР може змінювати активність іонних каналів, що знаходяться на ПМ та впливають на мембранний потенціал, і, таким чином, обумовлювати вхід Ca²⁺ через потенціалзалежні Ca²⁺-канали [3], у той же час зменшення [Ca²⁺]_c в СР активує депокеровані Ca²⁺-канали ПМ (TRP) (рис. 1) [4].

Основними системами видалення Ca²⁺ із цитозолу є Ca²⁺, Mg²⁺-АТРаза ПМ, Ca²⁺, Mg²⁺-АТРаза СР, Na⁺/Ca²⁺-обмінник та Ca²⁺-уніпортер мітохондрії (рис. 1) [1–3, 5]. Na⁺/Ca²⁺-обмінник є низькоафінним щодо Ca²⁺ (K_{Ca} = 1 мкМ), але має значну ємність та характеризується високим числом обертів; тоді як Ca²⁺-помпи СР та ПМ, хоч і мають вищий афінітет до Ca²⁺

($K_{Ca} = 0,1-0,3$ мкМ), але їм притаманна значно менша кількість обертів [6–8]. Таким чином, Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази ПМ та СР можуть відповідати за підтримання рівня $[Ca^{2+}]_c$ у спокої, тоді як Na^+/Ca^{2+} -обмінник, мабуть, відіграє роль за регуляції високих, стимуляторних концентрацій Ca^{2+} [6]. Внесок кожної із зазначених систем в усунення Ca^{2+} з цитоплазми залежить від типу гладеньком'язових клітин (ГМК), але загалом Na^+/Ca^{2+} -обмінник відповідає наближено за 60% усунення Ca^{2+} з цитозолу, а на роль кожної з pomp відводиться по 20–30% [7]. Результати досліджень [9] вказують на те, що мітохондрії також можуть діяти як система зниження $[Ca^{2+}]_c$. У такому разі енергія дихального ланцюга, яка зазвичай використовується для синтезу АТР, іде на транспорт Ca^{2+} (рис 1). Афіність до Ca^{2+} у цьому процесі незначна ($K_{Ca} = 10-20$ мкМ) [7], тому раніше вважалося, що такий шлях не може використовуватися для регуляції гомеостазу Ca^{2+} у цитоплазмі в умовах низької концентрації $[Ca^{2+}]_c$, хоча експериментально показана можливість накопичення Ca^{2+} ізольованими мітохондріями. Сьогодні доведено, що такий шлях має місце за рахунок близької асоціації СР і мітохондрій, що зближує домени з високою концентрацією Ca^{2+} , утворені внаслідок вивільнення Ca^{2+} з ретикулула, з низькоафінним

мітохондріальним уніпортером [9]. До того ж накопичення Ca^{2+} мітохондріями стимулює утворення АТР, оскільки Ca^{2+} є позитивним регулятором кількох ензимів циклу Кребса. Зростання рівня АТР опосередковано впливає на $[Ca^{2+}]_c$, бо АТР є джерелом енергії для функціонування pomp, які усувають Ca^{2+} з цитоплазми [3].

Основним шляхом надходження Ca^{2+} у ГМК під час скорочення є позаклітинне середовище, тому вихід вказаного іону також повинен відбуватися поза межі клітини, саме через це головна роль у видаленні Ca^{2+} з клітини належить саме структурам ПМ. Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРаза, разом з Na^+/Ca^{2+} -обмінником, становить основну транспортну систему ГМК, відповідальну за довготривалу регуляцію концентрації Ca^{2+} у спокої, тобто за обмін Ca^{2+} між внутрішньоклітинним та позаклітинним середовищем [7]. Парціальний внесок обмінника та помпи залежить від типу тканини. Наприклад, у ГМ матки саме Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРаза ПМ відповідає за значну частину викиду Ca^{2+} : за допомогою методу фіксації напруги [10] встановлено, що від її активності залежить 70% відкачаного Ca^{2+} , тоді як на роль Na^+/Ca^{2+} обмінника припадають інші 30%. Беручи до уваги експресію зазначеної помпи у всіх тканинах та її низьку транспортну здатність, висунуто припущення, що роль цієї системи полягає у

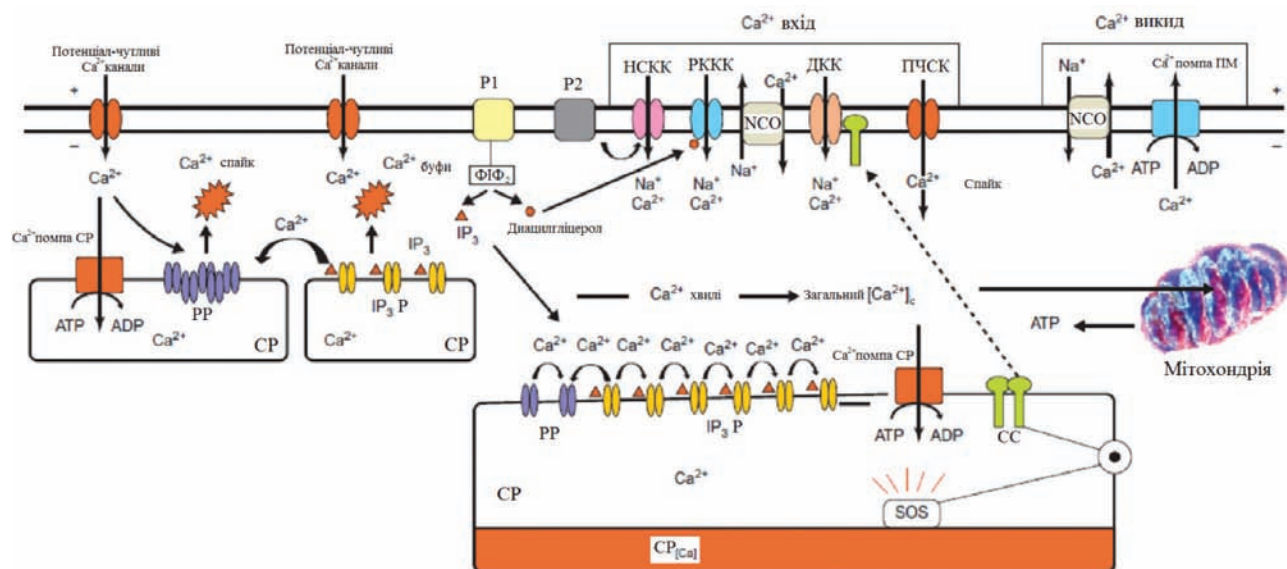


Рис. 1. Шляхи та механізми транспорту Ca^{2+} у ГМК (адаптована з [1]). Скорочення: ПМ-плазматична мембрана, СР – саркоплазматичний ретикулум, Р – рецептор, NCO – Na^+/Ca^{2+} -обмінник, PP – ріанодинові рецептори, IP_3 – інозитолтрифосфат, IP_3P – інозитолтрифосфатний рецептор, $ФІФ_2$ – фосфатидилбіфосфат, CC – Ca^{2+} сенсори у СР (STIM), HCKK – неселективні катіонні канали, PKKK – рецепторкерзовані катіонні канали, DKK – депокеровані канали, PCHCK – потенціалчутливі Ca^{2+} -канали

встановленні та підтриманні фізіологічно значущого рівня $[Ca^{2+}]_c$ [5].

Зважаючи на важливу роль Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази у підтриманні фізіологічної концентрації Ca^{2+} у ГМК у стані спокою, перша частина нашого огляду має за мету розглянути основні властивості кальцієвої помпи ПМ, її структурну організацію та молекулярну біологію.

1. Структурно-функціональні властивості Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани ГМК

1.1. Структурна організація Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази

Перші уявлення про первинну будову Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази ПМ були отримані у 1988 р. з використанням структури комплементарної ДНК. Топологія помпи була розроблена на основі будови pomp P_{2B} -типу [5], беручи за основу Ca^{2+} -pomпу СР. Загальна схематична модель структурної організації показана на рис. 2. Ca^{2+} -pomпа ПМ містить 10 трансмембранних ділянок, NH_2 - та $COOH$ -кінці локалізовані з цитоплазматичного боку мембрани. Основна маса протеїну (близько 80 %) знаходиться в цитозолі та складається із трьох основних частин [2]. Перша (А-петля) складається із внутрішньоклітинної петлі між трансмембранними сегментами 2 та 3, що в основному сформована з β -складчастих шарів. Ця ділянка бере участь у спряженні гідролізу АТР та транслокації Ca^{2+} , передає інформацію щодо конформаційних змін, які

виникають під час реакційного циклу, та містить одну з послідовностей, що формують відповідь на кислі фосфоліпіди. Друга частина (N-петля) знаходиться в петлі між трансмембранними сегментами 4 та 5, де міститься сайт утворення проміжного аспартил-фосфату та сайт приєднання АТР. Вважається, що петля має підвищену рухливість, оскільки зазначені ділянки мають зближуватися під час реакційного циклу. Ці дві частини протеїну характерні для всіх АТРази Р-типу, але третя (Р-петля) є особливою структурою, характерною лише для Ca^{2+} -pomпи ПМ, та складається з видовженого $COOH$ -хвоста, який містить як β -складчасті шари, так і α -спіралі. На цій ділянці розміщені сайти регуляції активності помпи, у тому числі сайт зв'язування з кальмодуліном [2, 11, 12]. Загалом, структура Ca^{2+} -pomпи ПМ дуже подібна до структури інших АТРази P_2 -типу, у тому числі Ca^{2+} -pomпи СР. Але основна відмінність полягає у наявності $COOH$ -хвоста, який у Ca^{2+} -pomпи СР (20–50 залишків) значно менший, ніж у Ca^{2+} -pomпи ПМ (70–200 залишків) [12].

1.2. Молекулярна біологія Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази

У геномі ссавців Ca^{2+} -pomпа ПМ кодується 4 неалельними генами [13]. Відомо локуси генів людини: 12q21-q23 для Ca^{2+} -pomпи 1 [14], 3p25-p26 для Ca^{2+} -pomпи 2 [15], Xq28 для Ca^{2+} -pomпи 3 [15, 16], 1q25-q32 для Ca^{2+} -pomпи 4 [14]. Гени Ca^{2+} -pomпи ПМ ссавців мають подібну

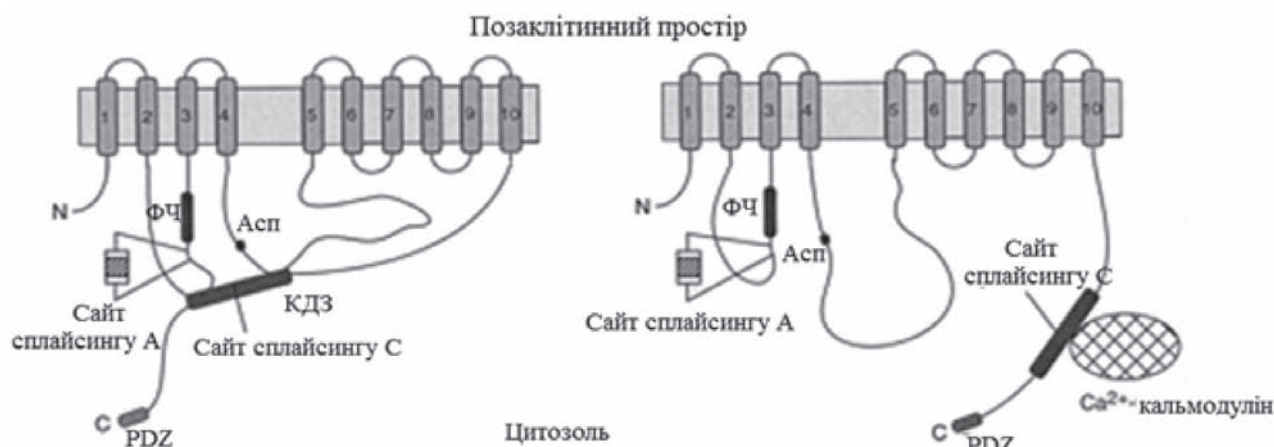


Рис. 2. Структурна організація Ca^{2+} -pomпи плазматичної мембрани (адаптовано з [12]). Скорочення: КДЗ – кальмодулінзв'язувальний домен, ФЧ – фосфоліпідчутлива ділянка, ТМ – трансмембранні домени, Асп – сайт формування аспартилового залишку, PDZ – домен зв'язування (postsynaptic density protein)

екзон-інтронну структуру та консервативне розташування інтронів [12]. За розміром гени великі, їхній розмір коливається від 70 кб (для 3 ізоформи миші) [17] до більш ніж 100 кб для Ca^{2+} -помпи ізоформ 1 та 2 людини [12, 18]. Ізоформи мають 80 % амінокислотної гомології, N- та C-кінці мають найменший ступінь подібності і відповідають за структурні відмінності між ізоформами [5]. Усі первинні транскрипти підлягають альтернативному сплайсингу, який відбувається в 3 точках: А, В, С (рис. 2), – більш як 20 сплайс-варіантів РНК було ідентифіковано [12].

Сайт альтернативного сплайсингу А локалізований вище фосфоліпідзв'язувального домену, у першій внутрішньоклітинній петлі, нижче кальмодулінзв'язувальної послідовності C-кінця [19]. Альтернативний сплайсинг у точці А утворює малий екзон 36–42 нт довжиною, що кодує короткий сегмент першої внутрішньоклітинної петлі. Наявність цього екзону є варіативною для всіх ізоформ, окрім Ca^{2+} -помпи 1 – у цьому протеїні екзон довжиною 39 нт присутній завжди. Для Ca^{2+} -помпи 2 у сайті сплайсингу А можлива варіативна вставка з 3 екзонів: 33, 60, 42 нт. Ca^{2+} -помпи 3 та 4 мають єдиний екзон (42 та 36 нт відповідно) у зазначеному сайті сплайсингу. Альтернативний сплайсинг у точці В є досить рідкісним: для Ca^{2+} -помп 1 та 3 характерна наявність 108 нт екзону, також було ідентифіковано транскрипти альтернативного сплайсингу Ca^{2+} -помпи 2 та 4. Видалення цього екзону призводить до втрати 10-го трансмембранного домену, і COOH -хвіст спрямований поза межі клітини [12]. Сайт сплайсингу С знаходиться всередині кальмодулінзв'язувального домену, у C-термінальному хвості [19]. Альтернативний сплайсинг у сайті С характерний для всіх ізоформ і є найрізноманітнішим. Для Ca^{2+} -помпи 1 характерно 5 ізоформ, які виникають внаслідок сплайсингу; у Ca^{2+} -помпи 2 є два екзони, що утворюють 3 варіанти; Ca^{2+} -помпа 3 має також два екзони з внутрішніми донорними сайтами, які утворюють 6 сплайсізоформ; Ca^{2+} -помпа 4 має єдиний екзон для сплайсингу, але його вставка зумовлює зсув рамки зчитування, що призводить до утворення коротшого COOH -термінального домену [12]. Альтернативний сплайсинг Ca^{2+} -помпи в трьох сайтах призводить до утворення кількох протеїнів. Але саме сплайс-варіанти в сайті С призводять до утво-

рення ензимів, що відрізняються за структурою C-термінальних доменів, тобто за регуляторними властивостями. Внаслідок цього формуються ізоформи Ca^{2+} -помп із подібними каталітичними характеристиками, але різною регуляцією кальмодуліном та протеїнкіназою (ПК) А [12, 13]. Регуляція альтернативного сплайсингу є не до кінця з'ясованим процесом. Основними факторами, які змінювали експресію того чи іншого сплайс-варіанту, були: зміна цитозольної концентрації Ca^{2+} , гіперкалієва деполяризація (клітини нейробластоми), пролонгована деполяризація, диференціація (гранулярні клітини). Можливий механізм впливу на процес альтернативного сплайсингу може залучати активацію кальмодулінзалежної кінази IV, яка взаємодіє та фосфорилує визначені нуклеотидні послідовності генів Ca^{2+} -помпи ПМ [19].

Розподіл ізоформ Ca^{2+} -помпи ПМ у клітинах залежить від потреб клітин у підтриманні цитозольної концентрації Ca^{2+} . Ca^{2+} -помпи 1 та 4 містяться у всіх тканинах і є єдиними ізоформами в ГМ [7]. Ca^{2+} -помпа 3 у дорослих людей міститься тільки в мозку (7,5 кб мРНК) та посмугованих м'язах (4,5 кб мРНК), а Ca^{2+} -помпа 2 – у клітинах Пуркіне мозочка та волоскових клітинах завитка равлика, хоча може бути присутня і у матці, нирках, печінці, міокарді, і має досить високий локальний рівень у молочних залозах [7, 12, 17]. Важливо, що Ca^{2+} -помпа 2 функціонує ефективно без стимуляції кальмодуліном [20].

Ділянки, які підлягають альтернативному сплайсингу, залучені в регуляторні взаємодії та диференційну локалізацію помпи. Від альтернативного сплайсингу C-кінця залежить ступінь його автоінгібування, кінетика взаємодії кальмодуліну, взаємодія з регуляторними протеїнами. Сплайс-ізоформи, які відрізняються за C-кінцем, позначаються як а та b [5, 8]. Так, порівняно з Ca^{2+} -помпою 4b, Ca^{2+} -помпа 4a менш чутлива до кальмодуліну: концентрація комплексу « Ca^{2+} -кальмодулін», необхідна для напівмаксимальної активації помпи 4a, в 7 разів вища, ніж для Ca^{2+} -помпи 4b. Кальмодулін (1,5 мкМ) також виявляв різний вплив на афінність ізоформ Ca^{2+} -помп ПМ до Ca^{2+} : $K_{1/2}$ для Ca^{2+} -помпи 4a – 0,54 мкМ, а для Ca^{2+} -помпи 4b – 0,25 мкМ. Отже, відмінність між ізоформами у першу чергу впливає на спорідненість до кальмодуліну, а це, відповідно,

впливає на афінітет до Ca^{2+} . Ізоформа 4b Ca^{2+} -помпи є поширенішою за Ca^{2+} -помпу 4a. Ca^{2+} -помпа 4a зустрічається лише у мозку, ГМ та, можливо, серці. Імовірно, що наявність Ca^{2+} -помпи 4a пов'язана з необхідністю підтримання вищої за середню концентрації Ca^{2+} в клітинах [21]. Цікаво, що, незважаючи на підвищену спорідненість кальмодуліну до Ca^{2+} -помпи 4b, швидкість активації кальмодуліном у 4 рази вища для Ca^{2+} -помпи 4a, так само і швидкість інактивації в умовах зменшення концентрації комплексу « Ca^{2+} -кальмодулін» ізоформи 4a відбувається у 30 разів швидше, ніж ізоформи 4b. Потреба швидкої реакції у відповідь на зростання концентрації Ca^{2+} також визначає місцезнаходження помпи у певних типах клітин. Так, Ca^{2+} -помпа 4b має повільну відповідь на зростання $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ($t_{1/2} = 46$ с) та малу швидкість інактивації ($t_{1/2} = 23$ хв). Таким чином, клітини, які містять переважно цей тип ізоформи, потребують тривалого періоду зменшення активності Ca^{2+} -помпи ПМ (гематопоектичні стовбурові клітини). Клітини, які потребують більш швидкої відповіді на Ca^{2+} сигнали (нервові чи м'язові), містять ізоформу 4a [22, 23].

1.3. Кінетичні та каталітичні властивості $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази

До сьогодні накопичена значна кількість експериментальних даних із вивчення кінетичних та каталітичних властивостей $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ, у тому числі й ГМК.

У ГМ активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази у фракції ПМ низька (одиниці мкмоль P_i /год·мг протеїну) [24–27]. Вона майже у 10 разів менша, ніж активність «базальної» Mg^{2+} -АТРази, яка маскує $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази [28]. У наших експериментах значення питомої ензиматичної активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ міоцитів матки становить 3–4 мкмоль P_i /год·мг протеїну [27, 29]. Очищена методом афінної хроматографії на кальмодулін-сефарозі 4Б у присутності азолектину солубілізована $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза зі ПМ клітин міометрія має питому активність до 80 мкмоль P_i /год·мг протеїну [30, 31].

Показник активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази змінюється залежно від фізіологічного стану м'яза матки. Наприклад, протягом вагітності активність солубілізованої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази значно зменшується: з $87,2 \pm 6,3$ ($n = 6$) до $34,1 \pm 3,1$ ($n = 5$) мкмоль P_i /год·мг протеїну. Як у стані

фізіологічного спокою, так і під час вагітності рівень накопичення Ca^{2+} у фракції везикул ПМ істотно домінує над рівнем, встановленим для інших фракцій [32]. Спорідненість $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази до Mg^{2+} є невисокою у сарколемі для тканин коронарної артерії, товстої кишки та міометрія. Значення коефіцієнта активації іонами Mg $A_{0,5}$ дорівнюють 0,2 і 1,2 мМ [24], а також 0,7 мМ [33] відповідно. Значення константи спорідненості (K_{MgATP}) для суто субстратної ензиматичної реакції MgATP^{2-} у разі очищеної солубілізованої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ клітин міометрія становить 0,56 мМ [25].

Після перевірки АТР, ГТР, УТР, СТР, як субстратів очищеної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ клітин міометрія, було показано, що ензим є високоспецифічним відносно АТР та гідролізує виключно цей нуклеозидтрифосфат [24]. Максимальна активність ензиму спостерігається за концентрації Ca^{2+} 5–29 мкМ (значення K_{Ca} становить 0,19 та 0,17 мкМ у фракції везикул ПМ та очищеного ензиму відповідно) [25, 34].

Оптимальне значення рН для солубілізованого ензиму – 7,5–8,0, для $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази у фракції ПМ – 6,4–7,0 [25, 35]. Ця різниця в оптимумі рН, імовірно, є наслідком різної просторової конфігурації ензиму, а, отже, і доступності активного центру молекули ензиму в солубілізованому стані і в мембрані. Температурний оптимум для солубілізованої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ еритроцитів спостерігався при 37–41 °С, а для $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ клітин міометрія – при 40–45 °С. Підвищення температури до 50 °С призводило до значного зниження активності очищеного ензиму. Енергія активації E_a АТР-гідролізної реакції, що каталізується цим ензимом, дорівнює 56,4 кДж/моль [36].

1.4. $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза та Mg^{2+} , АТР-залежний транспорт Ca^{2+}

Показано, що функціонування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичних мембран ГМК дійсно забезпечує трансмембранне активне перенесення Ca^{2+} із внутрішньоклітинного простору у зовнішньоклітинне середовище [24]. Так, максимальна активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази і Mg^{2+} , АТР-залежного накопичення Ca^{2+} в міоцитах матки спостерігаються за тієї самої концентрації Mg^{2+} – 3–5 мМ (концентрація АТР в середовищі інкубації – 3 мМ). Величини K_{Mg} і V_{max} відповідно становлять: у разі $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -

АТРазної активності – 0,18 мМ і 7,7 мкмоль Р_i/год·мг протеїну; у разі Mg²⁺,АТР-залежного накопичення Ca²⁺ у клітинах міометрія – 0,39 мМ і 17,4 нмоль Ca²⁺/за 15 хв·мг протеїну [35]. Як видно, величини констант активації за Mg²⁺ (K_{Mg}) є величинами одного порядку. У разі міометрія їх значення відповідають тим, що були одержані для Ca²⁺,Mg²⁺-АТРази сарколеми ГМ коронарної артерії і товстої кишки (0,2 і 1,2 мМ відповідно) [37].

Величини Ca²⁺,Mg²⁺-АТРазної активності і Mg²⁺,АТР-залежного накопичення Ca²⁺ у клітинах міометрія максимальні за концентрації АТР 1 мМ (концентрація MgCl₂ у середовищі інкубації – 5 мМ). Значення K_{Mg} і V_{max} для Mg²⁺ відповідно складають: 0,16 мМ і 8,0 мкмоль Р_i/год·мг протеїну (для Ca²⁺,Mg²⁺-АТРазної активності) та 0,25 мМ і 18,0 нмоль Ca²⁺/мг протеїну за 15 хв (для Mg²⁺,АТР-залежного накопичення Ca²⁺ у міоцитах матки). І у цьому разі значення K_{Mg} для Ca²⁺,Mg²⁺-АТРазної реакції і Mg²⁺,АТР-залежного накопичення Ca²⁺ також практично однакові [35].

Також для обох випадків має місце висока субстратна специфічність відносно АТР та абсолютна необхідність присутності Mg²⁺ у середовищі інкубації [24].

Вивчення впливу величини рН на активність Ca²⁺,Mg²⁺-АТРази і рівень накопичення Ca²⁺ у фракції сарколеми міометрія показало, що у разі 50 мМ трис-малеат/NaOH буферного розчину оптимальним є значення рН 6,4–7,0 (при 37 °С) [24].

Важливо відзначити, що Ca²⁺,Mg²⁺-АТРаза, очищена з ПМ клітин міометрія з використанням методу афінної хроматографії на кальмодулін-сефарозі 4Б, була реконструйована в азолек-

тинових ліпосомах (із використанням методу холайного діалізу), одержані протеоліпосоми активно накопичували Ca²⁺ у Mg²⁺,АТР-залежному процесі [38].

Вищенаведені результати однозначно вказують на той факт, що саме Ca²⁺,Mg²⁺-АТРаза є «молекулярною машиною», яка забезпечує Mg²⁺,АТР-залежний активний транспорт іонів Ca через ПМ ГМК.

1.5. Молекулярний механізм спряження Ca²⁺,Mg²⁺-залежного ензиматичного гідролізу АТР та Mg²⁺,АТР-залежного активного транспорту Ca²⁺ через ПМ. Енергетика кальцієвої помпи

Ca²⁺-помпа ПМ ГМ належить до АТРаз Р-типу, підродина Р2, які утворюють проміжний фосфорильований ензим, що пов'язано з процесом перенесення іона Ca [2, 13, 39]: γ-фосфат молекули АТР переноситься на аспартатний залишок ензиму [7, 13]. Також для Ca²⁺-помпи ПМ характерний контртранспорт протона, що призводить до змін рН навколо ГМК, в подальшому впливаючи на активність Ca²⁺-помпи ПМ та на внутрішньоклітинний рН [6, 40].

Точний механізм активного перенесення іонів Ca Ca²⁺-помпою ПМ невідомий, проте уявлення щодо нього розбудовані на прикладі Ca²⁺-помпи СР, що також належить до АТРаз Р-типу. Проміжні етапи реакції сформульовано у 4-етапній схемі (рис. 3) [2, 19].

Вважають, що у E₁ конформації Ca²⁺-помпа ПМ має високу спорідненість до Ca²⁺ з цитоплазматичного боку (K_{Ca} ~ 10⁻⁷–10⁻⁶ М). Приєднання Ca²⁺ та АТР до E₁ конформера призводить до структурних змін, які обумовлюють переміщення Ca²⁺ у позаклітинне середовище (E₂-стан).

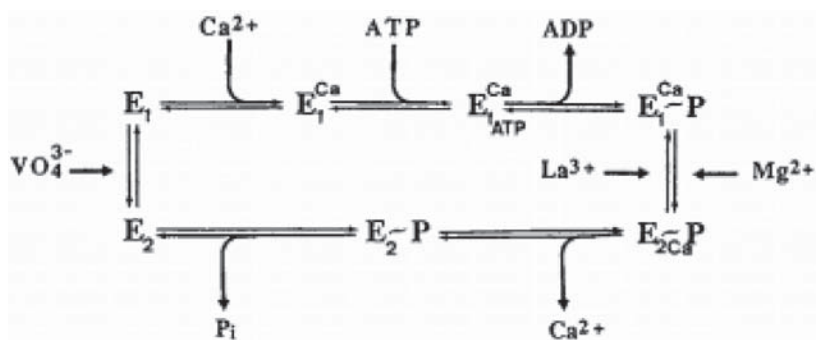


Рис 3. Схема каталітичного циклу Mg²⁺,АТР-залежної Ca²⁺-помпи ПМ (адаптовано з [44]). E₁, E₂ – конформаційні стани Ca²⁺-помпи ПМ, La³⁺ – лантам, VO₄³⁻ – ортованадат.

Внаслідок цього відбувається вивільнення Ca^{2+} після гідролітичного розщеплення фосфорильованого проміжного продукту, оскільки фосфорильована форма помпи має низьку афінність до Ca^{2+} ($K_{\text{Ca}} \sim 10^{-3}$ М). Після вивільнення Ca^{2+} помпа повертається до початкової конформації (E_1) (рис. 3) [41, 42]. Етап дефосфорилювання прискорюється K^+ або приєднанням АТР до регуляторного, низькоафінного сайту. Кальмодулін також збільшує швидкість відщеплення АТР на етапі дефосфорилювання. Перехід із E_2 до E_1 конформації інгібується у присутності Ca^{2+} в мілімолярних концентраціях. Також присутність Ca^{2+} та кальмодуліну призводить до утворення більш гнучкої конформації COOH -кінця у стані повної активації [43].

Показано, що у разі очищеної Ca^{2+} -помпи ПМ найбільша питома активність виявляється при 40 °С [36]. Розраховані із графіків Арреніуса величини енергії активації E_a гідролізу АТР солубілізованою, реконструйованою в азолектинових ліпосомах Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазою, а також Mg^{2+} , АТР-залежного транспорту Ca^{2+} вказаним реконструйованим ферментом, складають $56,4 \pm 1,5$; $68,0 \pm 5,1$ та $63,1 \pm 2,9$ кДж/моль відповідно [36].

1.6. Функціональна роль Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази

До тепер відсутність специфічних інгібіторів кальцієвої помпи ПМ значно обмежувало вивчення її фізіологічної ролі, тому більшість уявлень про участь помпи у тих чи інших процесах сформовані переважно на результатах, одержаних на генетично модифікованих організмах.

Численні дослідження вказують на те, що Ca^{2+} -помпа ПМ необхідна для підтримання внутрішньоклітинного Ca^{2+} -гомеостазу та функціонування ГМК [8]. Висока афінність Ca^{2+} -помпи до Ca^{2+} ($K_{\text{Ca}} \sim 0,3\text{--}0,6$ мкМ) робить її ідеальною системою для підтримання низької сталої концентрації вільного Ca^{2+} (80–100 нМ) у цитозолі в стані спокою [45–47]. За результатами проведеного нами математичного моделювання, використання інгібітора калікс[4]-арену С-90, специфічного до Ca^{2+} -помпи ПМ [27], призводить до зростання $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (рис. 4), що підтверджується результатами конфокальної мікроскопії (концентрація калікс[4]-арену С-90 20 мкМ), виконаної на іммобілізованих на полі- L -лізині ГМК.

Домінування того чи іншого шляху викиду Ca^{2+} із клітини залежить від концентрації Ca^{2+} у цитоплазмі: як вже було зазначено, Ca^{2+} -помпа ПМ має високу афінність, але низьку максимальну швидкість, тому вона важлива саме для підтримання $[\text{Ca}^{2+}]_c$ у стані спокою [48]. В ізольованих міоцитах ГМ судин, сечового міхура, матки [7] виведення значної частини Ca^{2+} , який надійшов до клітини за скорочення, відбувається через Ca^{2+} -помпу та $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник ПМ. Інгібування обох механізмів повністю блокувало б вихід Ca^{2+} із клітини. Зокрема, у ГМ матки, незалежно від походження $[\text{Ca}^{2+}]_c$, основна роль у його викиді належить Ca^{2+} -помпі ПМ 4. Це підтверджується результатами експериментів на нокаутаних по Ca^{2+} -помпі ПМ 4 мишах, де релаксація м'язового скорочення уповільнюється на 50% [6], тому припускається, що у ГМ матки внесок Ca^{2+} -помпи ПМ у релаксацію м'яза складає 65–85% [6, 7], а у видалення Ca^{2+} з цитоплазми – 70% [6, 8, 49]. У дослідженнях, виконаних на сечовому міхурі, значення $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника ПМ у видаленні Ca^{2+} із клітини зростає: вказаний протеїн відповідає за 56–75% викиду Ca^{2+} , Ca^{2+} -помпа ПМ – за 25–27%, Ca^{2+} -помпа СР – до 31% [8, 49–51]. Із використанням мишей з мутантними генами Ca^{2+} -помпи ПМ розраховано, що внесок Ca^{2+} -помпи ПМ у розслаблення ГМ сечового міхура становить 25–30% [52]. На ГМ аорти показано, що загалом Ca^{2+} -помпи СР та ПМ відповідають за 60–70% розслаблення [53].

Важливо відмітити, що ізоформи мають різне значення як для контролю $[\text{Ca}^{2+}]_c$ у різних

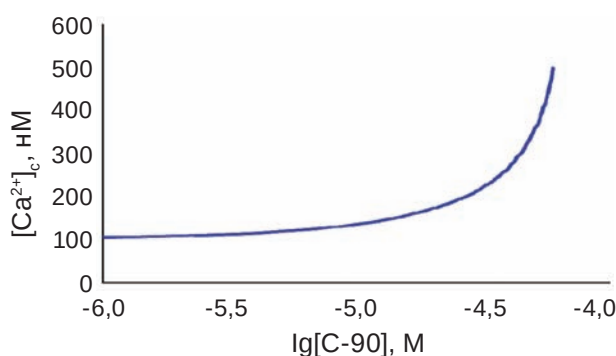


Рис. 4 Моделювання залежності рівноважної базальної концентрації Ca^{2+} в незбуджених клітинах міометрія від концентрації калікс[4]-арену С-90 (специфічного інгібітора Ca^{2+} -помпи ПМ, $I_{0,5} = 20$ мкМ)

тканинах, так і для глобальних змін $[Ca^{2+}]_c$. Було продемонстровано, що Ca^{2+} -помпа ПМ 1 залучена до загальної системи видалення Ca^{2+} [54], і повне видалення гена помпи є летальним на етапі ембріогенезу [55]; тоді як повноцінне функціонування Ca^{2+} -помпи ПМ 4 необхідне для адекватної зміни $[Ca^{2+}]_c$ у разі активації ацетилхолінового рецептора [54]. Так, за неефективної роботи Ca^{2+} -помпи ПМ 4 сигнал від ацетилхолінового рецептора маскується внаслідок активації Ca^{2+} -чутливих K^+ -каналів за високої $[Ca^{2+}]_c$ [50, 56].

Активність помпи включає антипорт протонів, який за інтенсивної активності призводить до значного закислення внутрішньоклітинного середовища. Такий ефект, одночасно з відкачуванням $[Ca^{2+}]_c$, сприяє релаксації ГМ, оскільки низьке значення рН зменшує активність Ca^{2+} -каналів L-типу. Отже, рН-індуковане інгібування електричної активності синхронізоване з $[Ca^{2+}]_c$ -залежною механічною релаксацією. Оскільки зміни внутрішньоклітинного рН пов'язані із силою скорочення, то чим сильніше скорочення – тим більші зміни рН і більше розслаблення. У ГМ матки завдяки одночасному закисленню цитоплазми та скороченню етап розслаблення є пролонгованим, що дозволяє запобігати гіпоксичному ушкодженню тканин матки та плода. Водночас внутрішньоклітинне зменшення рН корелює з позаклітинним підвищенням рН, яке призводить до зростання амплітуди коливань $[Ca^{2+}]_c$ та сили скорочення [40].

Хоча Ca^{2+} -помпа ПМ відіграє важливу роль у підтриманні низької $[Ca^{2+}]_c$ [57], її значення не обмежене тільки цим [46, 48, 51], а саме:

- Антипорт протонів під час викиду Ca^{2+} може призводити до закислення клітин та змінювати спорідненість Ca^{2+} -зв'язуючих протеїнів до Ca^{2+} , оскільки протони конкурують з Ca^{2+} за зв'язування з протеїнами;
- Зниження активності Ca^{2+} -помпи ПМ сприяє відновленню пулу Ca^{2+} у внутрішньоклітинних Ca^{2+} -депо;
- Може мати місце опосередкована стимуляція Ca^{2+} -помпи СР, оскільки рН оптимум її активності становить 6,8;
- Спостерігається асоціація між Ca^{2+} -помпою ПМ та регуляцією росту ГМК: надекспресія Ca^{2+} -помпи ПМ призводить до уповільнення росту клітин. І навпаки: змен-

шення активності Ca^{2+} -помпи ПМ збільшує проліферативну активність ГМК судин; цей процес важливий в етіології серцевосудинних захворювань;

- Можлива зміна амплітуди та частоти Ca^{2+} сигналів та Ca^{2+} -осциляцій;
- Важливим є контроль примембранної концентрації Ca^{2+} , що суттєво для ендокринної секреції, вивільнення нейтротрансмітерів, клітинної проліферації, скорочення ГМ;
- Існує припущення, що порушення викиду Ca^{2+} з клітин внаслідок зменшення активності Ca^{2+} -помпи ПМ пов'язано з процесом старіння.

Останнім часом все більшого визнання набуває думка, що ізоформи Ca^{2+} -помпи ПМ, більше того – різні сплайс-варіанти, відіграють спеціалізовану роль в клітинах. У ГМК переважно знаходять ізоформи Ca^{2+} -помпи ПМ 1 та 4, які експресуються у всіх тканинах, тоді як ізоформи 2 та 3 зустрічаються значно рідше.

Було проведено багато досліджень із нокаутуванням геном Ca^{2+} -помпи ПМ 1, їхні результати вказують на його роль як гена «домашнього господарства». Нуль-мутанти Ca^{2+} -помпи ПМ 1 були летальними ще під час ранніх стадій ембріогенезу, хоча гетерозиготи не мали значних відхилень [2]. Оскільки Ca^{2+} -помпа ПМ 1b є найпоширенішою формою, вважається, що саме вона виконує найбільше базових функцій у клітині [58]. Її рівень у ГМК судин залежить від фази клітинного циклу. В інтерфазі G_1/S відбувається транскрипційна репресія за допомогою фактора с-Муб, і рівень експресії Ca^{2+} -помпи ПМ 1 зменшується у сорок разів порівняно з фазою G_0 . Суперекспресія Ca^{2+} -помпи ПМ зменшує проліферацію клітин у 2,5 раза [2], натомість аплікація неспецифічних (карбоксиеозин, іони La) та специфічних інгібіторів (калоксин 1b1) Ca^{2+} -помпи ПМ до ГМК дихальних шляхів підсилює проліферацію цих клітин [59]. Також під час проліферації ГМК судин змінюється профіль інших сплайс-ізоформ Ca^{2+} -помп ПМ у [60], а саме – зростає рівень мРНК Ca^{2+} -помпи ПМ 4a. Зміна співвідношення сплайс-ізоформ Ca^{2+} -помпи ПМ 4a/ Ca^{2+} -помпи ПМ 4b пов'язана з їх спорідненістю до кальмодуліну та Ca^{2+} . Таким чином, зростання експресії Ca^{2+} -помпи ПМ 4a, що має нижчу спорідненість до Ca^{2+} , призведе до підвищення $[Ca^{2+}]_c$ у стані спокою. У той самий час Ca^{2+} -помпа ПМ 4b має найнижчу базальну активність, але найбільшу активацію

за взаємодії з кальмодуліном. Особливості активації кальмодуліном вказують на те, що ця ізоформа залучена до розвитку та тривалості Ca^{2+} -сигналу, вона дозволяє розвинути першому Ca^{2+} -спайку впродовж кількох секунд перед тим, як бути активованою, та лишається активною на кілька хвилин після дисипації спайку; таким чином, відповідь на наступний спайк формується значно швидше [2, 43, 61].

Для сплайс-ізоформ b властива низка взаємодій через PDZ-домен, які характерні в основному для нервових тканин, хоча деякі взаємодії (MAGUS, PISP) можуть бути властивими і для ГМ. Також показана взаємодія RASSF1 з ізоформою Ca^{2+} -помпи ПМ 4b, що призводить до інгібування EGF-залежної активації мітоген-активованої ПК Erk [62]. Це дає підстави вважати, що Ca^{2+} -помпа ПМ бере участь у регуляції апоптозу, що також підтверджується результатами, за якими інгібування Ca^{2+} -помпи ПМ призводить до активації процесу апоптозу в ГМ судин [63].

З використанням трансгенних мишей [2, 64], які мали суперекспресію Ca^{2+} -помпи ПМ 4b в ГМ судин, було встановлено, що за таких умов спостерігається підвищення кров'яного тиску за збереження ендотеліозалежної релаксації та зростання скорочення судин у відповідь на деполяризацію. Такі результати корелюють з гіпотезою, що участь Ca^{2+} -помпи ПМ у регуляції тону м'язів не обмежується безпосередньою регуляцією скорочення, а відбувається і завдяки регуляції передачі сигналів у клітині. Через PDZ-зв'язуючий домен Ca^{2+} -помпа ПМ взаємодіє з нейрональною синтазою оксиду азоту (nNOS) у кавеолах і інгібує активність останньої в залежності від концентрації комплексу « Ca^{2+} -кальмодулін» [65]. Утворення комплексу « Ca^{2+} -помпа ПМ/nNOS» відбувається завдяки $\alpha 1$ -синтропіну, який приєднується до Ca^{2+} -помпи ПМ у внутрішньоклітинній петлі між трансмембранними доменами 4 та 5. До того ж Ca^{2+} -помпа ПМ 4 у серцевому м'язі пригнічує активність nNOS, оскільки зменшує концентрацію Ca^{2+} у безпосередній близькості до синтази. Зміна активності nNOS, у свою чергу, знижує утворення cGMP гуанілатциклазою. Як результат: зменшується фосфодіестеразна активність, уповільнюється деградація cAMP і збільшується активність ПКА. Тому змінюються параметри скорочення у відповідь на стимуляцію

агоністом β -адренергічних рецепторів, оскільки відбувається фосфорилування групи протеїнів, залучених до спряження збудження-скорочення.

Також Ca^{2+} -помпа ПМ 4 може бути важливою за регуляції кальциневрин/NFAT сигнального шляху. Ці два протеїни безпосередньо приєднуються до внутрішньоклітинної петлі між трансмембранними доменами 4 та 5. Кальциневрин (серин/треонінова фосфатаза) активується під час підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ та дефосфорилує NFAT (ядерний фактор активованих Т-клітин), який переміщується в ядро та активує гени гіпертрофії [49]. Суперекспресія Ca^{2+} -помпи ПМ 4 супроводжується інгібуванням кальциневрину, що завдяки цьому має протекторну дію за розвитку патологічної гіпертрофії серцевого м'яза.

У дослідженні [66] трансгенні миші, що містили ген Ca^{2+} -помпи ПМ 4 в міокарді під керуванням промотором, не мали змін у скороченні/розслабленні м'яза, хоча змінювалася амплітуда α - та β -адренергічного сигналу, оскільки в кавеолах відповідні рецептори та Ca^{2+} -помпи ПМ розміщені надзвичайно близько, що доведено за колокалізацією з кавеоліном-3. Тому роль Ca^{2+} -помпи ПМ 4 у міокарді може полягати навіть не в регуляції серцевих скорочень, а в регуляції росту міокарда завдяки модуляції передачі сигналів у кавеолах.

Окрім взаємодії з nNOS, показаний вплив на функціонування eNOS, NOS-3, кальциневрин А через зв'язування відповідних ензимів із внутрішньоклітинною петлею між трансмембранними доменами 4 та 5 Ca^{2+} -помпи ПМ. Зменшення Ca^{2+} у мікрооточенні зазначених сигнальних протеїнів призводить до інгібування їхньої активності [67].

Таким чином, транспортна $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза ПМ є важливою у підтримці фізіологічної концентрації Ca^{2+} в міоцитах ГМ, компенсуючи пасивний потік Ca^{2+} в клітину у стані спокою. У зв'язку з тим, що внутрішньоклітинні пули Ca^{2+} (перш за все, CP) розвинені слабо, розслаблення ГМ відбувається в основному за рахунок викиду Ca^{2+} у позаклітинний простір [68]. Тому таргетна регуляція Ca^{2+} -помпи ПМ має важливе значення у забезпеченні контролю розслаблення ГМ, а саме – у зниженні концентрації Ca^{2+} до його фізіологічного рівня в клітині, а також в регуляції багатьох Ca^{2+} -залежних сигнальних шляхів, що може сприяти як проліферації клітин, так і апоптозу.

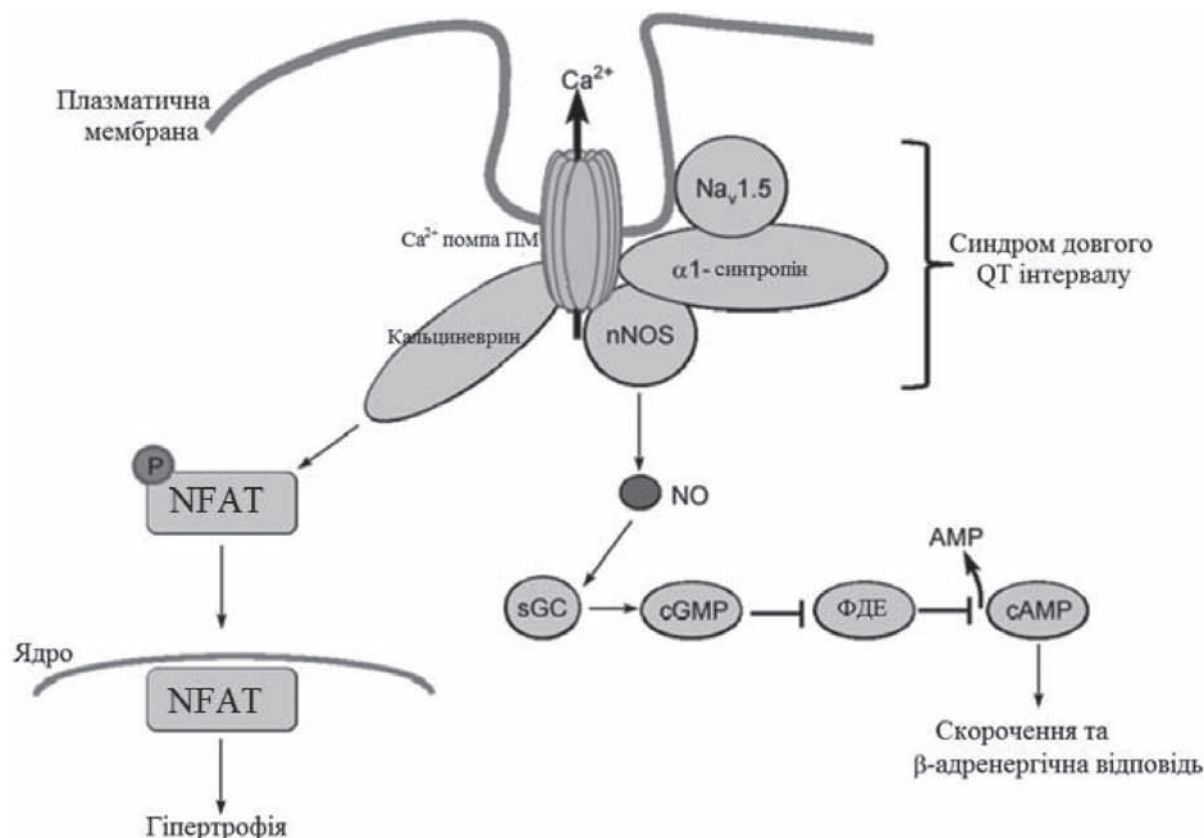


Рис. 5 Участь Mg^{2+} , ATP-залежної Ca^{2+} -помпи ПМ у регуляції сигнальних шляхів із залученням кальциневрину та nNOS (адаптовано з [49]). Скорочення: ПМ – плазматична мембрана, NFAT – ядерний фактор активованих Т-клітин, nNOS – нейрональна NO-синтаза, sGC – розчинна гуанілатциклаза, ФДЕ – фосфодіестераза

На жаль, багато свідчень про роль Ca^{2+} -помпи ПМ у ГМ отримано на генетично модифікованих організмах, що істотно порушує чистоту результатів, оскільки зниження або підвищення експресії помпи може спричинювати зміну експресії компенсаторних систем щодо надходження чи викиду Ca^{2+} . Саме тому важливим є пошук селективних низькомолекулярних ефекторів, які з високим афінитетом дозволяли б модифікувати активність Ca^{2+} -помпи ПМ. Використання таких ефекторів дозволить розширити існуючі уявлення про функціональну роль Ca^{2+} -помпи ПМ у клітинах.

1.7. Специфіка локалізації Ca^{2+} -помпи у клітинах

Вміст Ca^{2+} -помпи ПМ у мембрані не є високим – 0,1% від усіх мембранних протеїнів [69]. Отже, існування ділянок у мембрані, де існувала б підвищена концентрація протеїну помпи, дозволяла б створити мікродомени з

чітко регульованою концентрацією Ca^{2+} . Такими ділянками можуть бути кавеоли, оскільки рядом авторів продемонстрована асоціація з кавеолами Ca^{2+} -помп ПМ [8, 46, 70, 71]. Так, у кавеолах вміст цього Ca^{2+} -транспортувального протеїну у 18–25 разів вищий, ніж в інших частинах мембрани. Кавеоли є мембранними інвагінаціями, діаметром 50–100 нм, що збагачені сфінголіпідами, холестерином, фосфатидилсерином, та є стійкими до дії детергентів [70]. Оскільки ці сполуки підвищують активність Ca^{2+} -помпи ПМ, то локалізація помпи в кавеолах підвищує загальний викид Ca^{2+} , хоча ці результати не підтверджуються *in vitro* [70]. Локалізація помпи в кавеолах має функціональне значення, так як кавеоли (наприклад, у ГМ) знаходяться в тісному контакті із СР і підсилюють викид Ca^{2+} , спричинений ним [72], та містять рецептори, транспортери, інші протеїни, які залучені в передачу сигналу, пов'язаного зі зміною локальної концентрації Ca^{2+} : NOS [73], Ca^{2+} -чутливі рецеп-

тори, ізоформи ПК [46]. Таким чином, кавеоли можуть слугувати ініціаторними точками Ca^{2+} -хвиль, що дозволяє припустити важливу роль цих структур в сигнальній трансдукції [46].

Спільна локалізація Ca^{2+} -помпи та фосфоліпази С у кавеолах дозволяє припустити існування можливого механізму регуляції помпи в зв'язку з тим, що внаслідок гідролізу IP_3 фосфоліпазою зменшується загальний пул кислого фосфоліпіду, що інгібує активність помпи. Окрім того, можливий незалежний механізм інгібування помпи продуктом гідролізу – IP_3 , що призводить до зростання $[\text{Ca}^{2+}]_c$ [46, 70].

Все-таки більша частина молекул Ca^{2+} -помпи не локалізована в кавеолах, оскільки під час очищення протеїн помпи виділяється у фракції, розчиненій детергентом, тоді як кавеоли знаходяться у нерозчинній детергентом фракції [2, 13]. Але помпа у мембрані не розташована випадковим чином. Участь у локальній орієнтації Ca^{2+} -помпи ПМ можуть відігравати члени MAGUK родини та PISP. Відома взаємодія багатьох протеїнів вказаних родин [74] із PDZ-доменом Ca^{2+} -помпи 2b та 4b у ГМ із різним ступенем спорідненості (значення K_D коливається від 1,6 нМ до 1,2 мкМ). Зважаючи на те, що PDZ-вмісні протеїни відіграють важливу роль у встановленні та підтриманні апікобазолатеральної полярності в епітелії, можна припустити, що взаємодія Ca^{2+} -помпи ПМ та MAGUK [75, 76], NHERF2 [77] (апикально) або PISP [78] (базолатерально) дозволяє регулювати локалізацію помпи та утримувати окремі її ізоформи в необхідних ділянках мембрани або цитоскелета. Хоча фрагмент Ca^{2+} -помпи ПМ, одержаний внаслідок дії каспази-3, тобто без С-кінця, зберігає специфічне розташування у базолатеральній мембрані [79]. Локальний вміст окремих ізоформ Ca^{2+} -помпи ПМ на різних ділянках мембрани забезпечує необхідні властивості Ca^{2+} сигналу [5].

Отже, вивчення структурної організації, функціональної активності та функції Ca^{2+} -помпи ПМ ГМК вже протягом кількох десятиріч знаходиться у фокусі уваги дослідників. Було використано різноманітні методи та підходи, які незалежно підтверджують результати один одного: Ca^{2+} -помпа ПМ відіграє різнопланову та широкомасштабну роль у функціонуванні ГМК; це і підтримання цитоплазматичної концентрації Ca^{2+} на фізіологічному рівні, регуляція процесу скорочення/розслаблення і

контроль базових клітинних процесів, наприклад, проліферативної активності. Беручи до уваги важливий внесок помпи у функціонування клітин, необхідно розглянути порушення її функціонування за різноманітних патологічних станів гладеньких м'язів. Також, зважаючи на це, важливим аспектом є питання регуляції її активності, в першу чергу ендогенними сполуками, а також пошук специфічних ефекторів, які можна було б спрямовано використовувати для зміни активності Ca^{2+} -помпи ПМ та корекції дисфункцій її активності за різних патологій. Тому в наступній частині нашого огляду будуть розглянуті питання регуляції та модифікації активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ ГМК.

Mg^{2+} , АТР-ЗАВИСИМЫЙ КАЛЬЦИЕВЫЙ НАСОС ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК. I. СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ И СВОЙСТВА

Т. А. Веклич, Ю. Ю. Мазур, С. А. Костерин

Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев;
e-mail: veklich@biochem.kiev.ua;
yuliya.vorona@gmail.com

Регуляция концентрации Ca^{2+} в цитоплазме имеет решающее значение в функционировании клеток. Смена концентрации Ca^{2+} играет фундаментальную роль в гладкомышечных клетках, поскольку это определяет процессы сокращения/расслабления. Одним из ключевых протеинов, участвующих в регуляции концентрации Ca^{2+} в цитоплазме, является Mg^{2+} , АТР-зависимый Ca^{2+} -насос плазматической мембраны. Поэтому вопросы регуляции активности и поиск препаратов, позволяющих целенаправленно изменять активность Ca^{2+} -насоса плазматической мембраны, актуальны в контексте современных биохимических исследований механизмов энерго- и фармакохимического сопряжения возбуждения и сокращения мышц. В обзоре обобщены данные литературы и результаты собственных исследований свойств Ca^{2+} -насоса плазматической мембраны клеток гладких мышц. Рассмотрены структурная организация, кинетические свойства и молекулярная биология этой транспортной системы.

Ключевые слова: Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы, плазматическая мембрана, гладкомышечные клетки, миоциты, каликс[4]арены.

Mg^{2+} , ATP-DEPENDENT PLASMA MEMBRANE CALCIUM PUMP OF SMOOTH MUSCLE CELLS. I. STRUCTURAL ORGANIZATION AND PROPERTIES

T. O. Veklich, Iu. Iu. Mazur, S. O. Kosterin

Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: veklich@biochem.kiev.ua;
yuliya.vorona@gmail.com

Tight control of cytoplasm Ca^{2+} concentration is essential in cell functioning. Changing of Ca^{2+} concentration is thorough in smooth muscle cells, because it determines relaxation/constraint process. One of key proteins which control Ca^{2+} concentration in cytoplasm is Mg^{2+} , ATP-dependent plasma membrane calcium pump. Thus, it is important to find compounds which allowed one to change Mg^{2+} , ATP-dependent plasma membrane calcium pump activity, as long as this topic is of current interest in biochemical research which regards energy and pharmacomechanical coupling mechanism of muscle excitation and contraction. In this article we generalized literature and own data about properties of smooth muscle cell plasma membrane Ca^{2+} -pump. Structural organization, kinetic properties and molecular biology are considered.

Key words: PMCA, plasma membrane, smooth muscle cell, myometrium, calyx[4]arene.

References

- Burdyga T., Richard J. P. Chapter 86 – Calcium Homeostasis and Signaling in Smooth Muscle. Joseph Hill. Boston/ Waltham. 2012. P. 1155-1171.
- Pande J., Grover A. K. Plasma membrane calcium pumps in smooth muscle: from fictional molecules to novel inhibitors. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2005;83:743-754.
- Chalmers S., Olson M. L., MacMillan D., Rainbow R. D., McCarron J. G. Ion channels in smooth muscle: Regulation by the sarcoplasmic reticulum and mitochondria. *Cell Calcium.* 2007;42(4–5):447-466.
- Ng L. C., Gurney A. M. Store-operated channels mediate Ca^{2+} influx and contraction in rat pulmonary artery. *Circ. Res.* 2001;89:923-929.
- Strehler E. E., Adelaida G. F., Penniston J. T., Caride A. J. Plasma membrane Ca^{2+} -pumps: structural diversity as basis for functional versatility. *Biochem. Soc. Trans.* 2007;35(Pt 5):919-922.
- Matthew A., Shmygol A., Wray S. Ca^{2+} entry, efflux and release in smooth muscle. *Biol. Res.* 2004;37(4):617-624.
- Oloizia B., Paul R. J. Ca^{2+} Clearance and contractility in vascular smooth muscle: Evidence from gene-altered murine models. *J. Mol. Cellul. Cardiol.* 2008;45(3):347-362.
- Floyd R., Wray S. Calcium transporters and signalling in smooth muscles. *Cell Calcium.* 2007;42(4–5):467-476.
- Carafoli E. Mitochondrial Calcium Transport: Historical Aspects / Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition), Editors-in-Chief: William J. Lennarz and M. Daniel Lane, Waltham. 2013. P. 118-126.
- Shmygol A., Eisner D. A., Wray S. Carboxyeosin decreases the rate of decay of the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transient in uterine smooth muscle cells isolated from pregnant rats. *Pflugers Arch.* 1998;437:158-160.
- Carafoli E. Biogenesis: plasma membrane calcium ATPase: 15 years of work on the purified enzyme. *FASEB J.* 1994;13:993-1002.
- Strehler E. E., Zacharias D. A. Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. *Physiol. Rev.* 2001;81(1):21-50.
- Pande J., Mallhi K. K., Grover A. K. Role of third extracellular domain of plasma membrane Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase based on novel inhibitor caloxin 3A1. *Cell Calcium.* 2005;37(3):245-250.
- Olson S., Wang M. G., Carafoli E., Strehler E. E., McBride O. W. Localization of two genes encoding plasma membrane Ca^{2+} transporting ATPases to human chromosomes 1q25–32 and 12q21–23. *Genomics.* 1991;9:629-641.
- Wang M. G., Yi H., Hilfiker H., Carafoli E., Strehler E. E., McBride O. W. Localization of two genes encoding plasma membrane Ca^{2+} ATPases isoform 2 (ATP2B2) and 3 (ATP2B3) to human chromosomes 3p26→p25 and Xq28, respectively. *Cytogenet. Cell Genet.* 1994;67:41-45.
- Kuzmin I., Stackhouse T., Latif F., Duh F. M., Geil L., Gnarr J., Yao M., Li H., Tory K.,

- Le Paslier D., Chumakov I., Cohen D., Chinault A. C., Linehan W. M., Lerman M. I., Zbar B. One-megabase yeast artificial chromosome and 400-kilobase cosmid-phage contigs containing the von Hippel-Lindau tumor suppressor and Ca^{2+} -transporting adenosine triphosphatase isoform 2 genes. *Cancer Res.* 1994;54:2486-2491.
17. Burk S. E., Shull G. E. Structure of the rat plasma membrane Ca^{2+} -ATPase isoform 3 gene and characterization of alternative splicing and transcription products. *J. Biol. Chem.* 1992;267:19683-19690.
 18. Hilfiker H., Strehler-Page M. A., Stauffer T. P., Carafoli E., Strehler E. E. Structure of the gene encoding the human plasma membrane calcium pump isoform 1. *J. Biol. Chem.* 1993;268:19717-19725.
 19. Krebs J. The influence of calcium signaling on the regulation of alternative splicing. *BBA.* 2009;1793(6):979-984.
 20. Linde C. I., Di Leva F., Domi T., Tosatto S. C., Brini M., Carafoli E. Inhibitory interaction of the 14-3-3 proteins with ubiquitous (PMCA1) and tissue-specific (PMCA3) isoforms of the plasma membrane Ca^{2+} pump. *Cell Calcium.* 2008;43(6):550-561.
 21. Enyedi A., Verma A. K., Heim R., Adamo H. P., Filoteo A. G., Strehler E. E., Penniston J. T. The Ca^{2+} affinity of the plasma membrane Ca^{2+} -pump is controlled by alternative splicing. *J. Biol. Chem.* 1994;269(1):41-43.
 22. Caride A. J., Elwess N. L., Verma A. K., Filoteo A. G., Enyedi A., Bajzer Z., Penniston J. T. The rate of activation by calmodulin of isoform 4 of the plasma membrane Ca^{2+} -pump is slow and is changed by alternative splicing. *J. Biol. Chem.* 1999;274(49):35227-35232.
 23. Caride A. J., Penheiter A. R., Filoteo A. G., Bajzer Z., Enyedi A., Penniston J. T. The plasma membrane calcium pump displays memory of past calcium spikes. Differences between isoforms 2b and 4b. *J. Biol. Chem.* 2001;276(43):39797-39804.
 24. Kosterin S. O. Calcium transport in smooth muscles. Kiev: Naukova dumka, 1990. 216 p. (In Russian).
 25. Lyubakovska L. A., Slinchenko N. M., Burchynska N. F., Kurskij M. D. Catalytic properties of purified Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase of myometrium sarcolem. *Biochemistry (M).* 1990;55(7):1237-1243. (In Russian).
 26. Slinchenko N. M., Lyubakovska L. A., Kursky M. D., Sopel L. V. Isolation and purification of Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase from plasma membranes of the myometrium. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 1990;62(3):60-65. (In Russian).
 27. Veklich T. O., Shkrabak A. A., Mazur Yu. Yu., Rodik R. V., Boyko V. I., Kalchenko V. I., Kosterin S. O. Kinetic regularities of calixarene C-90 action on the myometrial plasma membrane Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity and on Ca^{2+} concentration in unexcited cells of the myometrium. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2013;85(4):20-29. (In Ukrainian).
 28. Wuytack F., De Schutter G., Casteels R. Partial purification of Ca^{2+} , Mg^{2+} -dependent ATPase from pig smooth muscle and reconstitution of the ATP-dependent Ca^{2+} -transport system. *Biochem. J.* 1981;198(2):265-271.
 29. Veklich T. O., Shkrabak A. A., Slinchenko N. N., Mazur I. I., Rodik R. V., Boyko V. I., Kalchenko V. I., Kosterin S. O. Calix[4]arene C-90 selectively inhibits Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase of myometrium cell plasma membrane. *Biochemistry (M).* 2014;79(5):417-424.
 30. Labyntseva R. D., Slinchenko N. M., Veklich T. O., Rodik R. V., Cherenok S. O., Boiko V. I., Kalchenko V. I., Kosterin S. O. Comparative investigation of calixarenes influence on Mg^{2+} -dependent ATP-hydrolase enzymatic systems from smooth muscle cells of the uterus. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2007;79(3):44-54. (In Ukrainian).
 31. Kursky M. D., Slinchenko N. M., Lyubakovska L. A. Reconstitution of purified Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase of the myometrium sarcolemma into liposomes and its catalytic properties. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 1990;62(3):66-71. (In Russian).
 32. Kaplya A. A., Kosterin S. O., Kurskij M. D. ATPase activity and calcium uptake by rabbit myometrium plasma membrane fraction at functional rest and in pregnancy. *Biochemistry.* 1982;47(9):1499-1503. (In Russian).
 33. Veklich T. O., Shkrabak A. A., Mazur Yu. Yu., Rodik R. V., Kalchenko V. I., Kosterin S. O. Kinetics of inhibitory effect of calix[4]-arene c-90 on activity of transporting plasma membrane Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase of smooth muscle cells. *Ukr. Biochem. J.* 2014;86(5):37-46. (In Ukrainian).
 34. Veklich T. O., Shkrabak A. A., Mazur I. I. The effect of calixarene C-90 on Ca^{2+} , Mg^{2+} -

- ATPase activity of smooth muscle cell plasma membrane. Abstracts of the Scientific-practical conference "Biologically active substances: basic and applied questions of production and application." Novyy Svit, Crimea, Ukraine. 2013;2:325-326.
35. Kosterin S. O., Bratkova N. F., Kurskij M. D., Zimina V. P. Properties of the ATP-dependent Ca^{2+} transport system in the plasma membrane fraction of the myometrium. *Biochemistry (M)*. 1983;48(2):244-253.
36. Kosterin S. O., Slinchenko N. M., Gergalova G. L. Energetic characterization of ATP-hydrolysing reaction which is catalized by solubilized plasma membrane Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase of smooth muscle cells. *Biochemistry (M)*. 1994;59(6):889-904.
37. Popescu L. M., Foril C. P., Hinescu M., Pănoiu C., Cintează M., Gherasim L. Nitroglycerin stimulates the sarcolemmal Ca^{2+} -extrusion ATPase of coronary smooth muscle cells. *Biochem. Pharmacol.* 1985;34(10):1857-1860.
38. Slinchenko N. M., Chernysh I. G., Kosterin S. O. Utilization of purified myometrium cell plasma membrane Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase for comparative estimation of efficacy of energy-dependent Ca^{2+} -transport inhibitors. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2003;75(2):33-38. (In Ukrainian).
39. Yatime L., Buch-Pedersen M. J., Musgaard M., Morth J. P., Winther A. L., Pedersen B. P., Olesen C., Andersen J. P., Vilsen B., Schiott B., Palmgren M. G., Moller J. V., Nissen P., Fedosova N. P-type ATPases as drug targets: Tools for medicine and science. *BBA*. 2009;1787:207-220.
40. Naderali E. K., Buttell N., Taggart M. J., Bullock A. J., Eisner D. A., Wray S. The role of the sarcolemmal Ca^{2+} -ATPase in the pH transients associated with contraction in rat smooth muscle. *J. Physiol. Lond. S*. 1997;505:329-336.
41. Furukawa K., Tawada Y., Shigekawa M. Protein kinase C activation stimulates plasma membrane Ca^{2+} -pump in cultured vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 1989;264:4844-4849.
42. Triphan J., Aumuller G., Brandenburger T., Wilhelm B. Localization and regulation of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase in bovine spermatozoa, *Europ. J. Cell Biol.* 2007;86:265-273.
43. Padanyi R., Paszty K., Penheiter A. R., Filoteo A. G., Penniston J. T., Enyedi A. Intramolecular interactions of the regulatory region with the catalytic core in the plasma membrane calcium pump. *J. Biol. Chem.* 2003;278:35798-35804.
44. Krebs. Calcium: A Matter of Life or Death. - Elsevier. The plasma membrane calcium pump. Ortega C., Ortolano S., Carafoli E. 2009. P. 179-197.
45. Gutierrez-Martin Y., Martin-Romero F. J., Henao F., Gutierrez-Merino C. Sytosomal plasma membrane Ca^{2+} pump activity inhibition by repetitive micromolar ONOO-pulses. *Free Radical Biol. Med.* 2002;32(1):46-55.
46. Monteith G. R., Wanigasekara Y., Roufogalis B. D. The plasma membrane calcium pump, its role and regulation: new complexities and possibilities. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*. 1998;40:183-190.
47. Oliveira V. H., Nascimento K. S. O., Freire M. M., Moreira O. C., Scofano H. M., Barrabin H., Mignaco J. A. Mechanism of modulation of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase by arachidonic acid. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2008;87:47-53.
48. Monteith G. R., Roufogalis B. D. The plasma membrane calcium pump a physiological perspective on its regulation. *Cell Calcium*. 1995;18:459-470.
49. Cartwright E. J., Oceandy D., Austin C., Neyses L. Ca^{2+} signalling in cardiovascular disease: the role of the plasma membrane calcium pumps. *Sci. China*. 2011;54(8):691-698.
50. Ishida Y., Paul R. J. Ca^{2+} clearance in smooth muscle: lessons from gene-altered mice. *J. Smooth Muscle Res.* 2005;41(5):235-245.
51. Gomez-Pinilla P. J., Pozo M. J., Akemishi B., Matsuda T., Camello P. J. Ca^{2+} extrusion in aged smooth muscle cells. *Biochem. Pharmacol.* 2007;74(6):860-869.
52. Liu L., Ishida Y., Okunade G., Shull G. E., Paul R. J. Role of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase in contraction-relaxation processes of the bladder: evidence from PMCA gene-ablated mice. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2006;290(4):C1239-47.
53. Pritchard T. J., Bowman P. S., Jefferson A., Tosun M., Lynch R. M., Paul J. P. Na^{+} - K^{+} -ATPase and Ca^{2+} clearance proteins in smooth muscle: a functional unit. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2010;299(2):548-556.
54. Liu L., Ishida Y., Okunade G., Pyne-Geithman G. J., Shull G. E., Paul R. J. Distinct

- roles of PMCA isoforms in Ca^{2+} homeostasis of bladder smooth muscle: evidence from PMCA gene-ablated mice. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2007;292(1):C423-431.
55. Okunade G. W., Miller M. L., Pyne G. J., Sutliff R. L., O'Connor K. T., Neumann J. C., Andringa A., Miller D. A., Prasad V., Doetschman T., Paul R. J., Shull G. E. Targeted ablation of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase (PMCA) 1 and 4 indicates a major housekeeping function for PMCA1 and a critical role in hyperactivated sperm motility and male fertility for PMCA4. *J. Biol. Chem.* 2004;279(32):33742-33750.
 56. Usachev Y. M., DeMarco S. J., Campbell C., Strehler E. E., Thayer S. A. Bradykinin and ATP accelerate Ca^{2+} efflux from rat sensory neurons via protein kinase C and the plasma membrane Ca^{2+} pump isoform 4. *Neuron.* 2002;33:113-122.
 57. Noble D., Herchuelz A. Role of Na/Ca exchange and the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase in cell function. *EMBO Reports.* 2007;8(3):228-232.
 58. Prasad V., Okunade G. W., Miller M. L., Shull G. E. Phenotypes of SERCA and PMCA knockout mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004;322:1192-1203.
 59. Chen Y. F., Cao J., Zhong J. N., Chen X., Cheng M., Yang J., Gao Y. D. Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase regulates Ca^{2+} signaling and the proliferation of airway smooth muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.* 2014;740:733-741.
 60. Abramowitz J., Aydemir-Koksoy A., Helgason T., Jemelka S., Odeunmi T., Seidel C. L., Allen J. C. Expression of plasma membrane calcium ATPases in phenotypically distinct canine vascular smooth muscle cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2000;32(5):777-789.
 61. Pande J., Mallhi K. K., Grover A. K. A novel plasma membrane Ca^{2+} -pump inhibitor: caloxin 1A1. *Eur. J. Pharmacol.* 2005;508(1-3): 1-6.
 62. Armesilla A. L., Williams J. C., Buch M. H., Pickard A., Emerson M., Cartwright E. J., Oceandy D., Vos M. D., Gillies S., Clark G. J., Neyses L. Novel functional interaction between the plasma membrane Ca^{2+} -pump 4b and the proapoptotic tumor suppressor Ras-associated factor 1 (RASSF1). *J. Biol. Chem.* 2004;279(30):31318-31328.
 63. Sasamura S., Furukawa K., Shiratori M., Motomura S., Ohizumi Y. Antisense-inhibition of plasma membrane Ca^{2+} pump induces apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Jpn. J. Pharmacol.* 2002;90(2):164-172.
 64. Schuh K., Uldrijan S., Gambaryan S., Roethlein N., Neyses L. Interaction of the plasma membrane Ca^{2+} pump 4b/CI with the Ca^{2+} /calmodulin-dependent membrane-associated kinase CASK. *J. Biol. Chem.* 2003;278(11):9778-9783.
 65. Schuh K., Uldrijan S., Telkamp M., R  thlein N., Neyses L. The plasmamembrane calmodulin-dependent calcium pump a major regulator of nitric oxide synthase I. *J. Cell Biol.* 2001;155(2):201-205.
 66. Hammes A., Oberdorf-Maass S., Rother T., Nething K., Gollnick F., Linz K.W., Meyer R., Hu K., Han H., Gaudron P., Ertl G., Hoffmann S., Ganten U., Vetter R., Schuh K., Benkwitz C., Zimmer H. G., Neyses L. Overexpression of the sarcolemmal calcium pump in the myocardium of transgenic rats. *Circ. Res.* 1998;83(9):877-888.
 67. Strehler E. E. Plasma membrane calcium ATPase proteins as novel regulators of signal transduction pathways. *World J. Biol. Chem.* 2010;1(6):201-208.
 68. Kosterin S. O. Kinetics and energetics of Mg^{2+} , ATP-dependent Ca^{2+} transport in the plasma membrane of smooth muscle cells. *Neurophysiol.* 2003;35(3/4):215-228.
 69. Leva F. D., Domi T., Fedrizzi L., Lim D., Carafoli E. The plasma membrane Ca^{2+} -ATPase of animal cells: Structure, function and regulation. *Arch. Biochem. Biophys.* 2008;476(1):65-74.
 70. Zhang J., Xiao P., Zhang X. Phosphatidylserine externalization in caveolae inhibits Ca^{2+} efflux through plasma membrane Ca^{2+} -ATPase in ECV304. *Cell Calcium.* 2009;45:177-184.
 71. Pang Y., Zhu H., Wu P., Chen J. The characterization of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase in rich sphingomyelin-cholesterol domains. *FEBS Lett.* 2005;579(11):2397-2403.
 72. Brini M., Carafoli E. Calcium pump in health and disease. *Physiol. Rev.* 2009;89:1341-1378.
 73. Giacomello M., Mario A., Scarlatti C., Primerano S., Carafoli E. Plasma membrane calcium ATPase and related disorders. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2012;45(3):753-762.
 74. Schuh K., Quaschnig T., Knauer S., Hu K., Kocak S., Roethlein N., Neyses L. Regulation of vascular tone in animals overexpressing the sarcolemmal calcium pump. *J. Biol. Chem.* 2003;278(42):41246-41252.

75. DeMarco S. J., Strehler E. E. Plasma membrane Ca^{2+} -atpase isoforms 2b and 4b interact promiscuously and selectively with members of the membrane-associated guanylate kinase family of PDZ (PSD95/Dlg/ZO-1) domain-containing proteins. *J. Biol. Chem.* 2001;276(24):21594-21600.
76. Kim E., DeMarco S. J., Marfatia S. M., Chishti A. H., Sheng M., Strehler E. E. Plasma Membrane Ca^{2+} ATPase Isoform 4b Binds to Membrane-associated Guanylate Kinase (MAGUK) Proteins via Their PDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1) Domains. *J. Biol. Chem.* 1998;273(3):1591-1595.
77. DeMarco S. J., Chicka M. C., Strehler E.E. Plasma Membrane Ca^{2+} -ATPase Isoform 2b Interacts Preferentially with Na^+/H^+ Exchanger Regulatory Factor 2 in Apical Plasma Membranes. *J. Biol. Chem.* 2002;277:10506-10511.
78. Goellner G. M., DeMarco S. J., Strehler E. E. Characterization of PISP, a novel single-PDZ protein that binds to all plasma membrane Ca^{2+} -ATPase b-splice variants. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2003;986:461-471.
79. Pászty K., Antalffy G., Penheiter A.R., Homolya L., Padányi R., Iliás A., Filoteo A. G., Penniston J. T., Enyedi A. The caspase-3 cleavage product of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase 4b is activated and appropriately targeted. *Biochem. J.* 2005;391(Pt 3):687-692.

Отримано 08.09.2014