

*Барковский Евгений Викторович, Ачинович Ольга Владимировна*  
**РЕГУЛЯЦИЯ МЕМБРАНОСВЯЗАННЫХ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗ  
МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

В обзоре представлены данные о регуляции мембраносвязанных аденилатциклаз млекопитающих.

Ключевые слова: аденилатциклаза, кальций, кальмодулин, G белки, фосфорилирование/дефосфорилирование.

E.V.Barkovsky, O.V.Achinovich

**REGULATION OF MAMMALIAN TRANSMEMBRANE-SPANNING  
ADENYLYL CYCLASES**

The present review focuses on the regulation of various isoforms of mammalian transmembrane-spanning adenylyl cyclase.

Key words: adenylyl cyclase, calcium, calmodulin, G proteins, phosphorylation/dephosphorylation.

Клонирование комплементарных ДНК девяти различных изоформ мембраносвязанной аденилатциклазы млекопитающих дало возможность изучать каждую изоформу независимо. Многочисленные исследования показали, что нет двух изоформ, регулируемых одинаковым способом. Существует большое разнообразие регуляторов ферментативной активности аденилатциклазы: от концентрации простых ионов до различных протеинкиназ. Картина регуляции может отличаться даже для одной и той же изоформы, когда ее экспрессия происходит в различных типах клеток, между сплайсированными вариантами изоформ аденилатциклазы, в ответе на различные регуляторные компоненты.

В соответствии с топологией мембраносвязанных аденилатциклаз млекопитающих в плазматической мембране клеток, мы считали оправданным рассмотрение регуляции их активности на уровне цитоплазматических доменов и трансмембранных доменов отдельно.

Регуляция активности мембраносвязанных аденилатциклаз млекопитающих на уровне цитоплазматических доменов

Регуляция субъединицами Gs и Gi белков. Gs и Gi подсемейства G белков выступают в качестве сопрягающего звена между активированным рецептором и аденилатциклазой, ответственной за изменение концентрации цАМФ в клетке. Гормональные рецепторы, связанные с Gs и Gi подсемействами G белков, могут изменять аденилатциклазную активность через взаимодействие высвобождаемых  $\alpha$ - и  $\beta\gamma$ -субъединиц с циклазой. Изоформы мембраносвязанной аденилатциклазы млекопитающих по-разному отвечают на различные субъединицы G белков: одни и те же субъединицы G белка могут стимулировать некоторые изоформы, ингибировать другие и быть индифферентными к остальным изоформам. Все многообразие данных о регуляции мембраносвязанных аденилатциклаз млекопитающих субъединицами G белков, представленных в ряде фундаментальных обзоров [14,19,28], можно суммировать следующим образом.

1. Основным механизмом активации мембраносвязанных аденилатциклаз млекопитающих осуществляется путем их взаимодействия с Gsa-субъединицей Gs белка. Все девять изоформ мембраносвязанной аденилатциклазы млекопитающих активируются ГТФ-связанной формой Gsa.

При Gsa стимуляции АЦ I, связанной с мембранами клеток насекомых (Sf9 или Ni-5), выявляется единственный сайт связывания. В то же время Gsa стимуляция АЦ II и АЦ VI (в тех же условиях) лучше объяснялась моделью двух не взаимодействующих между собой и сайтов связывания. Поскольку мембраносвязанные аденилатциклазы млекопитающих содержат только один сайт связывания Gsa, то для объяснения этих данных было выдвинуто предположение о возможной димеризации аденилатциклаз в мембране. Исходя из этого, можно полагать, что АЦ I имеет очень низкую способность к образованию гомодимеров, в то время как у АЦ II и АЦ VI эта способность резко выражена. Эти различия могут служить для объяснения разнообразных ответов различных клеток и тканей на гормоны, которые повышают уровень цАМФ.

2. Регуляция аденилатциклазной активности гормональными рецепторами, связанными с Gi-подсемейством G белков, является более сложной. Gia-субъединица вызывает заметное ингибирование Gsa- и форсколинстимулируемой активности АЦ V и АЦ VI. Gia-субъединица ингибирует также АЦ I. Следует отметить, что этот эффект отсутствовал в том случае, когда исследовалось Gsa-стимулирующее действие; ингибирование в значительной степени связано с активностью, наблюдаемой в присутствии кальмодулина или форсколина.

Показано, что Gia-субъединица связывается с АЦ V в полости, сформированной  $\alpha 2$  и  $\alpha 3$  спиралью C1 домена, которая является аналогичной для Gsa-связывающего сайта на C2 домене. Gia-субъединица уменьшает аффинность между C1 и C2 доменами и поэтому нарушает образование каталитического сайта аденилатциклазы. Мутанты, которые повышают аффинность C1 и C2 доменов друг к другу, понижают способность Gia-субъединицы к ингибированию фермента. Кроме того, Gia может оказывать влияние на связывание различных молекул с активным центром аденилатциклазы. Так, АЦ V может связывать аналоги АТФ в присутствии Gia, но не может одновременно связывать Gia и аналоги переходного состояния ( $2^{\prime} \alpha 3^{\prime}$ -АМФ). Gia не может также ингибировать АЦ V в присутствии ионов  $Mn^{2+}$ , которые повышают аффинность аденилатциклазы к АТФ и аналогам субстрата.

Наряду с Gia, активность АЦ I, АЦ V и АЦ VI также ингибируется Gza-субъединицей. G0a-субъединица ингибирует только активность АЦ I. Активность АЦ II и АЦ III, стимулированная хорионическим гонадотропином в COS-7 клетках, также может ингибироваться Gia-субъединицей.

Доказано, что Gbg-комплекс непосредственно взаимодействует с АЦ I. C1a домен АЦ I (остатки 236-471) является достаточным для наблюдаемого bg-опосредованного ингибирования ферментативной активности, стимулированной Gsa или  $Ca^{2+}$ /кальмодулином. Интересно отметить, что в присутствии C1b области и C2 домена в молекуле АЦ I формируется второй

сайт связывания Gbg. Ингибирование АЦ I может быть приписано взаимодействию bg-субъединиц с любым из этих двух сайтов. Для АЦ I, которая преимущественно экспрессируется в мозге, где G0 белок составляет около 1% от всех мембранных белков, активность фермента при стимуляции рецептора, связанного с G0 белком, преимущественно ингибируется Gbg-комплексом, а  $\alpha$ -субъединица G0 белка способствует этому ингибированию.

Контрансфекция в клетках COS-7 АЦ V или АЦ VI с g2- и различными b-субъединицами приводит к значительному ингибированию активности обеих аденилатциклаз. Кроме того, показано, что b1 и b5 субъединицы различаются по ингибирующей активности. Так, Gb1 значительно ингибирует АЦ V и АЦ VI, в то время как Gb5 вызывает слабое ингибирование этих ферментов.

В мозге и других тканях, которые экспрессируют АЦ II, АЦ IV и АЦ VII, в результате активации рецепторов, связанных с Gi и G0 белками, происходит высвобождение Gbg-комплексов, которые потенцируют Gsa-стимулируемую активность этих изоформ.

Сайт связывания в Gbg в АЦ II находится в области  $\alpha 3$  спирали C2 домена. Вероятно, Gbg модулирует активность АЦ II, связываясь только с одним доменом (C2a), что приводит к такому изменению его конформации, которое вызывает оптимальное ориентационное упорядочение активного центра фермента. Сайт связывания Gbg в АЦ I отличается от такового в АЦ II, поскольку области  $\alpha 3$ -спиралей АЦ I и АЦ II значительно различаются между собой.

Gbg-комплексы не оказывают непосредственного влияния на ферментативную активность АЦ III, АЦ VIII и АЦ IX.

Регуляция ионами  $Ca^{2+}$  и кальмодулином. Аденилатциклазная система и система обмена  $Ca^{2+}$  - это две основные сигнальные системы, имеющиеся во всех клетках животных. Их функционирование взаимосвязано. Взаимодействие кальциевой и аденилатциклазной систем проявляется как на уровне регуляции или активности друг друга, так и посредством скоординированного влияния на биохимические процессы, происходящие в клетке.

Кальций-чувствительные аденилатциклазы, обеспечивают быстрый ответ цАМФ - генерирующей системы на повышение внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  (положительный или отрицательный в зависимости от типа экспрессируемых аденилатциклаз).

Из девяти клонированных к настоящему времени изоформ аденилатциклаз млекопитающих пять изоформ оказались чувствительными к ионам  $Ca^{2+}$  в условиях *in vitro*; АЦ I, АЦ III и АЦ VIII стимулируются  $Ca^{2+}$ , в то время как АЦ V и АЦ VI ингибируются  $Ca^{2+}$  [19]. Многочисленные данные свидетельствуют о том, что эти изоформы фермента регулируются транзиторным изменением концентрации внутриклеточного  $Ca^{2+}$  -  $[Ca^{2+}]_i$ . Так, в клетках НЕК 293, экспрессирующих АЦ I и АЦ VI, емкостный вход  $Ca^{2+}$  (capacitative  $Ca^{2+}$  entry - CCE) вызывает стимуляцию и ингибирование, соответственно, синтеза цАМФ [7]. В клетках НЕК 293, экспрессирующих АЦ VIII, активация пуриnergических рецепторов (которая повышает  $[Ca^{2+}]_i$ ) приводит к стимуляции аденилатциклазной активности [30]. Было также показано, что в клетках С6 - 2В АЦ VI селективно ингибируется CCE в гораздо

большей степени, чем  $\text{Ca}^{2+}$ , высвобождаемым из внутриклеточных депо [12]. Интересно отметить, что АЦ I и АЦ VIII, экспрессируемые в клетках НЕК 293, также заметно стимулируются ССЕ, в то время

как ионофоропосредованное высвобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо не оказывает влияния на их активность [12].

АЦ III полностью рефрактерна к любому физиологическому повышению  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в клетках НЕК 293. При исследовании чувствительности к  $\text{Ca}^{2+}$  этих аденилатциклаз в условиях *in vitro* была продемонстрирована значительная стимуляция АЦ I и АЦ VIII низкими микромолярными концентрациями  $\text{Ca}^{2+}$ . Наоборот,

АЦ III активируется только очень высокими супрамикромольными концентрациями  $\text{Ca}^{2+}$ , которые являются ингибирующими для всех остальных аденилатциклаз млекопитающих [4]. Обнаружение того, что АЦ III рефрактерна к физиологически значимым подъемам концентрации внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ , а также ее активация чрезвычайно высокими концентрациями  $\text{Ca}^{2+}$  в условиях *in vitro* предполагает ограниченную пригодность этой изоформы как интегратора кальциевых сигналов. Уникальность АЦ III заключается в том, что она активируется при тех концентрациях  $\text{Ca}^{2+}$ , при которых ингибируются все остальные изоформы аденилатциклазы [4]. Это свойство АЦ III может играть важную роль в тех случаях, когда синтез цАМФ должен осуществляться в присутствии высоких концентраций внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ . Предпочтение, которое отдают кальцийстимулируемые аденилатциклазы I и VIII емкостному входу  $\text{Ca}^{2+}$  перед высвобождением  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо, предполагает дискретную локализацию аденилатциклаз в тех областях мембраны, где может поддерживаться достаточно высокий уровень  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  [12]. Иными словами, предполагается колокализация  $\text{Ca}^{2+}$  - чувствительных аденилатциклаз с каналами емкостного входа  $\text{Ca}^{2+}$  в плазматической мембране клеток.

Это предположение находит подтверждение в иммунохимических исследованиях, которые указывают на то, что в нейронах аденилатциклазы сконцентрированы преимущественно в дендритических шипиках. Дендритические шипики являются областями с высокой концентрацией  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов и насосов, а также заякоренных цАМФ-зависимых протеинкиназ. Поэтому дендритические шипики можно рассматривать как области с независимой нейрональной активностью и гомеостазом  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  [13]. Все это выглядит таким образом, как если бы нейроны обладали способностью размещать аденилатциклазы там, где они являются больше всего подходящими для регуляции ионами  $\text{Ca}^{2+}$  и эффективного распространения кальциевых сигналов. Такой характер локализации предполагает, что структура аденилатциклаз содержит информацию для их расположения в строго определенных микродоменах плазматической мембраны.

Перейдем к рассмотрению роли ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в регуляции  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительных аденилатциклаз в возбудимых тканях, в которых они преимущественно экспрессируются.  $\text{Ca}^{2+}$ -стимулируемые АЦ I и АЦ VIII экспрессируются исключительно в нейрональных клетках [30], в то время как  $\text{Ca}^{2+}$ -

ингибируемые АЦ V и АЦ VI экспрессируются преимущественно в сердечной мышце [16]. Несмотря на значительное содержание в этих клетках потенциалзависимых кальциевых каналов (voltage-gated calcium channels-VGCCs), вызывает удивление полное отсутствие до последнего времени литературных данных о роли VGCC-опосредованного входа  $Ca^{2+}$  на аденилатциклазную активность. Исключением было исследование, показывающее, что вход кальция через VGCCs ингибирует аденилатциклазную активность в вентрикулярных миоцитах цыпленка [34]. И только в 2000 году было показано, что гетерологически экспрессируемая АЦ VIII в клетках опухоли передней доли гипофиза линии GH4C1, стимулируется входом  $Ca^{2+}$  через VGCCs L-типа [23]. В экспериментах с использованием нимодипина, который является эффективным блокатором VGCCs, оказалось, что емкостный вход кальция (CCE) вызывает эффективную стимуляцию АЦ VIII в клетках GH4C1, в то время как высвобождение кальция из внутриклеточных депо, вызываемое агонистами фосфолипазы C и ионофорами, не оказывало влияния на активность АЦ VIII [23]. Неэквивалентность в способности к подъему  $[Ca^{2+}]_i$  VGCC-опосредованного входа  $Ca^{2+}$  (повышение  $Ca^{2+}$  в цитозоле до 700 нМ) и CCE-опосредованного входа  $Ca^{2+}$  (повышение  $Ca^{2+}$  в цитозоле до 250 нМ) и равная эффективность активации АЦ VIII предполагает, что аденилатциклаза расположена гораздо ближе к CCE каналу, чем к VGCC в плазматической мембране.

Эти данные позволяют заключить, что близкие пространственные взаимоотношения в плазматической мембране между аденилатциклазой и CCE каналами, которые впервые были продемонстрированы в невозбудимых клетках, сохраняются и в возбудимых клетках, хотя аденилатциклаза является также чувствительной к значительному VGCC-опосредованному входу  $Ca^{2+}$  в возбудимых клетках.

Полумаксимальное ингибирование нативной АЦ V из сердца собаки и ее растворимого гетеродимера VC1. VC2 наблюдается при концентрациях  $Ca^{2+}$ , соответственно, 7 мМ и 5 мМ. В то же время ферментативная активность растворимого гетеродимера VC1a. VC2 не ингибируется  $Ca^{2+}$  вплоть до концентрации 27 мМ. Было также показано, что 113-и аминокислотная C1b область (Arg 571- Phe 683) VC1 была способна связывать  $Ca^{2+}$ . Эти данные указывают на то, что C1b область АЦ V связывает  $Ca^{2+}$  и делеция этой области в растворимом гетеродимере VC1. VC2 предотвращает ингибирование фермента ионами  $Ca^{2+}$ . Sholich и соавт. [8] полагают, что сайт связывания  $Ca^{2+}$  в C1b области находится на участке E 621 - D 652, в котором из 32 аминокислотных остатков 13 остатков несут кислотный характер. Большинство этих кислотных остатков являются высококонсервативными среди АЦ V и АЦ VI у животных разных видов. Поэтому предполагается, что эта 32-остаточная область в C1b является сайтом связывания  $Ca^{2+}$  в АЦ V и АЦ VI. Интересно, отметить, что эквивалентным остатком E 621 в АЦ V является D 602 в АЦ VI. Поскольку остатки аспарагиновой кислоты имеют более высокую аффинность для  $Ca^{2+}$ , чем остатки глутаминовой кислоты, возможно, что C1b область АЦ VI связывает  $Ca^{2+}$  с большей аффинностью по сравнению с аналогичной

областью в АЦ V. Это может объяснить большую чувствительность АЦ VI к ингибированию  $Ca^{2+}$  по сравнению с АЦ V.

АЦ V и АЦ VI являются основными изоформами, экспрессируемыми в сердце [16]. Поскольку в течение сердечного цикла наблюдаются осцилляции концентрации цАМФ [2], можно полагать, что ингибирование АЦ V и АЦ VI ионами  $Ca^{2+}$  может служить в качестве отрицательной обратной связи, понижая уровень цАМФ в процессе сокращения.

Действительно, показано, что ионы  $Ca^{2+}$  ингибируют катехолстимулируемое накопление цАМФ в кардиомиоцитах [34]. Экспериментальные данные предполагают, что  $Ca^{2+}$ -ингибируемые аденилатциклазы локализованы с каналами емкостного входа  $Ca^{2+}$  [6] и, поэтому, могут быть подвергнуты действию высоких концентраций свободного  $Ca^{2+}$ . Это согласуется с наблюдениями, что локальная концентрация свободного  $Ca^{2+}$  в клетках может быть достаточно высокой, достигая значений 5 - 6 мМ [18]. Таким образом, АЦ V, которая полумаксимально ингибируется свободным  $Ca^{2+}$  в концентрациях 5 - 7 мМ, может регулироваться путем изменения внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$ .

Касаясь роли кальмодулина в регуляции  $Ca^{2+}$ -активируемых аденилатциклаз млекопитающих, следует отметить, что АЦ I,

АЦ III и АЦ VIII стимулируются  $Ca^{2+}$  и кальмодулином в условиях *in vitro*. В то же время, в отличие от АЦ I и АЦ VIII, которые непосредственно стимулируются  $Ca^{2+}$  и кальмодулином *in vitro*, АЦ III не стимулируется  $Ca^{2+}$  и кальмодулином в отсутствие форсколина и  $\alpha$ -субъединицы Gs белка [10]. Полумаксимальная стимуляция АЦ I и АЦ III наблюдается при концентрациях  $Ca^{2+}$  150 нМ и 5,0 мМ, соответственно. При исследовании регуляции АЦ III внутриклеточным  $Ca^{2+}$  и рецепторами, связанными с Gs белком, в условиях *in vivo* оказалось, что гормон-стимулированная АЦ III ингибируется внутриклеточным  $Ca^{2+}$ . Механизм ингибирования АЦ III ионами  $Ca^{2+}$  не зависит от активности цАМФ-зависимой протеинкиназы, протеинкиназы C или Gi белка. Поскольку ингибитор кальмодулин-зависимых киназ - KN 62 - блокирует этот эффект, можно полагать, что активированные  $Ca^{2+}$  кальмодулин-зависимые киназы (КМ киназы) могут прямо или опосредованно ингибировать активность АЦ III *in vivo*. Действительно, коэкспрессия в клетках НЕК 293 АЦ III и активированной кальмодулин зависимой киназы II полностью ингибировала изопротеренол-стимулируемую активацию АЦ III [31].

Регуляция фосфорилированием/дефосфорилированием. Внутриклеточные концентрации цАМФ, достигнутые в ответ на экзогенные регуляторы, сильно зависят от состояния фосфорилирования/дефосфорилирования различных компонентов гормон-чувствительных аденилатциклазных систем (рецептор/ G белок/аденилатциклаза). Это особенно очевидно в случае рецепторов, которые десенситизируются путем фосфорилирования различными киназами: цАМФ-зависимыми киназами (ПКА), протеинкиназой C (ПКС) и рецептор-специфическими киназами, для которых субстратами являются агонистсвязанные формы рецепторов. Исследованию фосфорилирования различных субъединиц G белков также уделяется значительное внимание. В

последние годы появились достаточно обширные данные о роли фосфорилирования/дефосфорилирования в регуляции аденилатциклаз.

Гормональная активация рецепторов, связанных с Gq и Gs белками, приводящая к активации ПКС и ПКА, соответственно, а также активация различных Ca<sup>2+</sup>/кальмодулин-зависимых киназ и тирозинкиназ могут оказывать влияние на активность различных изоформ аденилатциклазы. В этом контексте мы считали целесообразным рассмотреть регуляцию различными киназами и протеинфосфатазами каждой изоформы аденилатциклазы по отдельности.

Данные, касающиеся влияния ПКС на активность АЦ I, достаточно противоречивы. Так, одни авторы наблюдали увеличение форсколин- и кальмодулин-стимулированной активности АЦ I в ответ на активацию протеинкиназы C [27], а другие нет [33]. Фосфорилирование Ser 545 и Ser 552 C1в домена АЦ I Ca<sup>2+</sup>/кальмодулин-зависимой киназой IV влияет на Ca<sup>2+</sup>/кальмодулин-индуцируемую активацию АЦ I без изменения базальной и форсколин-стимулируемой каталитической активности. Замещение любого из этих двух остатков серина на аланин предотвращает ингибирование АЦ I Ca<sup>2+</sup>/кальмодулин-зависимой киназой IV. Эти данные предполагают, что Ca<sup>2+</sup>/кальмодулин-зависимая киназа IV может функционировать как регулятор отрицательной обратной связи для АЦ I, регулируя уровень цАМФ в клетках [25].

Обработка клеток НЕК 293, экспрессирующих АЦ II, форболовыми эфирами приводит к активации фермента почти в 10 раз. Стауроспорин (ингибитор ПКС) предотвращал действие форболовых эфиров на синтез цАМФ АЦ II. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что эта изоформа аденилатциклазы регулируется ПКС [33]. Обработка АЦ II ПКСа приводит к повышению базальной, форсколин - стимулируемой и bg-стимулируемой активностей, а также значительно повышает чувствительность к стимуляции α-субъединицей Gs белка [35]. Анализ *in vivo*, использующий химерные аденилатциклазы I/II, а также мутационный анализ позволили определить область в C2a АЦ II (1034-1068), которая содержит Thr 1057, фосфорилируемый ПКС [17]. Вместе с тем, следует отметить, что Taussig и Gilman [28] не сумели обнаружить фосфорилирования АЦ II, экспрессируемой в клетках Sf 9, при добавлении активированной ПКС.

АЦ III и Ca<sup>2+</sup>/кальмодулин-зависимая протеинкиназа II являются коэкспрессированными в цилиарных ресничках ольфакторных нейронов. Поэтому кальмодулин-зависимая протеинкиназа II потенциально может регулировать активность АЦ III в процессе ольфакторной сигнализации. Действительно, было показано, что фосфорилирование Ca<sup>2+</sup>/кальмодулин-зависимой протеинкиназой II Ser 1076 приводит к ингибированию АЦ III; мутация Ser 1076 на аланин превращает АЦ III в полностью нечувствительную к ингибированию протеинкиназой II. Фосфорилирование АЦ III по Ser 1076 Ca<sup>2+</sup>/кальмодулин-зависимой киназой II значительно усиливается в нейронах после стимуляции одорантами. Ингибиторы Ca<sup>2+</sup>/кальмодулин-зависимой протеинкиназы II, блокируя фосфорилирование АЦ III, предотвращают снижение повышенного уровня цАМФ, вызванного одорантами. Эти данные

устанавливают новый механизм для окончания альфакторной сигнализации, который может иметь важное значение в ответах на одоранты [21].

Обработка АЦ IV ПКСа оказывала незначительное увеличение базальной и форсколин-стимулируемой активности, однако значительно снижала Gsa-стимулируемую и bg-потенцирующую активность этой изоформы [35]. Эти данные указывают на то, что протеинкиназы могут изменять как активность различных изоформ аденилатциклазы, так и их чувствительность к регуляции различными субъединицами G белка.

Kawabe и соавт. [11] фосфорилировали АЦ V *in vitro*, используя ПКС, и продемонстрировали заметное увеличение ферментативной активности. Эффект был специфичен для *a* и *s* изоформ ПКС, предполагая перекрестную связь между этой изоформой аденилатциклазы и Gq - опосредованным (ПКСа), а также тирозинкиназными (ПКСs) сигнальными путями. Несмотря на достаточно сильный характер ответа, наблюдаемый *in vitro*, в условиях *in vivo* наблюдались достаточно умеренные эффекты активации АЦ V ПКС [27]. АЦ V фосфорилируется и ингибируется ПКА. Это ингибирование связано со снижением максимальной скорости фермента [24].

За исключением АЦ VI, остатки, фосфорилируемые в аденилатциклазах различными киназами, локализованы только в одном цитозольном домене (либо в C1в, либо в C2) [25]. Фосфорилирование множественных остатков АЦ VI ПКС уменьшает форсколин-индуцированную ферментативную активность [29,22]. Регуляции АЦ VI фосфорилированием представляет собой уникальный случай, так как эта изоформа может регулироваться тремя разными киназами, включая ПКА, ПКС и тирозинкиназу [1,29]. Особый интерес представляет тот факт, что ПКС и ПКА фосфорилируют один и тот же остаток Ser 674 в C1в домене АЦ VI [1,22]. Фосфорилирование АЦ VI ПКА уменьшает низкоаффинную стимуляцию Gsa субъединицей [1], в то время как фосфорилирование АЦ VI ПКС уменьшает ее каталитическую активность без изменения ее аффинности к форсколину и Gsa [29]. Это различие во влиянии ПКС- и ПКА-опосредованного фосфорилирования на ферментативные свойства АЦ VI может быть обусловлено тем, что ПКС в дополнение к Ser 674, который является также сайтом фосфорилирования ПКА, фосфорилирует еще, по меньшей мере, три остатка (Ser 10, N-концевой домен; Ser 568, C1в домен и Thr 931, C2 домен) [29,22]. Хотя одиночные мутации Ser 10, Ser 568 и Ser 674 лишь частично ослабляют ПКС-опосредованное ингибирование АЦ VI, одновременная мутация двух или всех трех этих остатков резко увеличивает нечувствительность мутантных форм АЦ VI к обработке ПКС [22].

Другим остатком существенным для ПКС-опосредованного ингибирования АЦ VI является Thr 931 (C2 домен). В противоположность эффектам, которые наблюдались для одиночных мутантов АЦ VI (АЦ VI - S10A, АЦ VI-S568A и АЦ VI S674A), замещение Thr 931 аланином приводило к полной функциональной нечувствительности АЦ VI к ПКС-опосредованному ингибированию [22]. Основываясь на этих результатах Lin и соавт. [22] предполагают, что три цитозольных домена АЦ VI формируют сложный регуляторный комплекс. Фосфорилирование различных сайтов этого регуляторного комплекса может индуцировать тонкую настройку

относительной ориентации каталитического ядра, приводящей к ингибированию ферментативной активности АЦ VI.

Интересно, что три другие изоформы аденилатциклазы (АЦ V, АЦ VIII и АЦ IX) содержат в позиции эквивалентной Thr 931 АЦ VI потенциальные сайты фосфорилирования ПКС [22]. Напомним, что АЦ V стимулируется ПКС [11]. Является ли сайт фосфорилирования АЦ V ПКС эквивалентным Thr 931 АЦ VI остается неизвестным. До сих пор неизвестны также протеинкиназы, оказывающие влияние на активность АЦ VIII и АЦ IX.

Поскольку каталитические ядра АЦ V и АЦ VI высокоомологичны между собой, значительный интерес представляет тот факт, что ПКС оказывает противоположные функциональные эффекты на эти изоформы. Как указывалось выше, по меньшей мере две различные изоформы ПКС могут фосфорилировать АЦ V и усиливать ее каталитическую активность [11]. Среди сайтов фосфорилирования АЦ V ПКС пять находятся в позициях, эквивалентных таковым в АЦ VI (Ser 145, Ser 325, Ser 489, Ser 568 и Thr 931).

Два же основных сайта фосфорилирования ПКС в АЦ VI (Ser 10 и Ser 674) отсутствуют в АЦ V. Важность Ser 674 является очевидной, поскольку этот остаток может фосфорилироваться как ПКС, так и ПКА в АЦ VI [1,22], а в АЦ V он может фосфорилироваться только ПКА, вызывая ингибирование фермента [24]. Возникновение отрицательных зарядов, обусловленное фосфорилированием Ser 674 в АЦ VI и эквивалентного сайта в АЦ V, может угнетать каталитическую активность этих изоформ. Отсутствие ПКС-опосредованного фосфорилирования Ser 674 в АЦ V, по-видимому, способствует отсутствию негативного эффекта ПКС на АЦ V. Кроме того, в N-концевом домене АЦ VI ПКС фосфорилирует Ser 10, а в АЦ V такой сайт фосфорилирования ПКС отсутствует.

Имеются единичные сведения о том, что обработка АЦ VII протеинкиназой С сопровождается увеличением циклазной активности [15].

По-видимому, АЦ VIII является единственной изоформой мембраносвязанных аденилатциклаз млекопитающих, активность которой не зависит от процессов фосфорилирования/дефосфорилирования. Так, ее активность не изменяется под влиянием ПКС [14] и Ca<sup>2+</sup>/кальмодулин-зависимых протеинкиназ II и IV [25]. Данных о влиянии ПКА на активность АЦ VIII нами не обнаружено.

АЦ IX ингибируется ионами Ca<sup>2+</sup> и этот эффект селективно блокируется циклоспорином А и FR 506, то есть специфическими блокаторами Ca<sup>2+</sup>/кальмодулин-зависимой протеинфосфатазы 2В - кальцинейрина. Кальцинейрин, являясь сенсором внутриклеточного кальция, опосредует отрицательную обратную связь влияния внутриклеточного кальция на рецептор-стимулируемое образование цАМФ в различных клетках [9]. Значительная экспрессия АЦ IX в гиппокампе и жизненно важная роль регуляции цАМФ кальциевым сигналом в синаптической пластичности свидетельствуют о том, что АЦ IX может быть важной физиологической мишенью для протеинкиназного и протеинфосфатазного каскадов, которые поддерживают долговременную модуляцию синаптической передачи [3].

Регуляция активности мембраносвязанных аденилатциклаз млекопитающих на уровне мембранных доменов M1 и M2

Обнаружение того факта, что цитоплазматические домены С1 и С2 аденилатциклаза, экспрессируемые в бактериях, могут образовывать активную каталитическую форму фермента *in vitro*, которая подвержена регуляторному влиянию многих агентов, образно говоря, отодвинуло исследование роли мембранных доменов на второй план. Тем не менее, можно выдвинуть ряд соображений относительно того, что функция мембранных доменов М1 и М2 не ограничивается только заякориванием аденилатциклазы в мембране. Во-первых, размеры мембранных доменов, составляющие около 30% от величины всего фермента, намного превышают необходимые для заякоривания аденилатциклазы в мембране. Иными словами, для заякоривания фермента в мембране достаточно одного/двух трансмембранных сегментов, а не двенадцати. Во-вторых, домены М1 и М2 сильно отличаются друг от друга по аминокислотной последовательности и все попытки сравнить между собой эти домены окончились неудачей из-за их низкой консервативности. Так, сравнительный анализ аминокислотных последовательностей М1 и М2 АЦ V кролика показывает только 12% их идентичности [26]. Кроме того, домены М2 на 54-87 аминокислот длиннее, чем изоформа-соответствующие домены М1. Дополнительные аминокислотные остатки доменов М2 участвуют в формировании более длинных последовательностей внутри- и экстраклеточных петель с неизвестной функцией. В третьих, независимо от классификации девяти мембраносвязанных аденилатциклаз млекопитающие на четыре сходно регулируемые группы (типы I, III, VIII; II, IV, VII; V, VI; IX) их мембранные домены указывают на почти полное отсутствие консервативности. Это ставит вопрос о том, обусловлены ли эти различия последовательностей мембранных доменов отсутствием эволюционного давления на сохранение функциональной специфичности или непознанными до сих пор функциональными требованиями. В четвертых, сравнительный анализ аденилатциклаз любой индивидуальной изоформы, полученных от животных, находящихся на различных уровнях эволюционного развития, указывает на высокую степень гомологии соответствующих мембранных доменов. Например, при сравнении АЦ V кролика и крысы наблюдается идентичность их последовательностей на 99% в областях цитоплазматических доменов С1 и С2 и на 92% в мембранных якорях. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей АЦ V кролика и АЦ VII крупного рогатого скота указывает на снижение идентичности до 53% для каталитических доменов и до 24% для соответствующих мембранных якорей [26]. Это является доказательством отчетливых изофермент-специфических функций доменов М1 и М2. В пятых, структурные ограничения, проявляемые доменами М1 и М2, по-видимому, влияют на взаимодействие между цитоплазматическими доменами С1 и С2, поскольку мутации внутри мембранных якорей приводят к уменьшению или вообще к полному отсутствию аденилатциклазной активности [17].

Первые биохимические свидетельства возможной изоформа-специфической функции аденилатциклазных мембранных доменов в образовании каталитически активного псевдогетеродимера были представлены в 2001 году [26].

Авторы использовали каталитические домены (С1 и С2) из АЦ V и мембранные домены (М1 и М2) из аденилатциклаз V и VII типов для конструирования ферментов с дублированными, инвертированными, полностью замененными и химерными мембранными якорями. Все разновидности этих ферментов были экспрессированы в клетках НЕК 293. Полученные данные показали, что ферментативная активность была обнаружена только в том случае, когда оба мембранных домена М1 и М2 были получены из какой либо одной изоформы, то есть либо из АЦ V, либо из АЦ VII. Более того, мембранные домены М1 и М2 из АЦ VII были столь же эффективны для сохранения аденилатциклазной активности каталитических доменов АЦ V, как и мембранные домены М1 и М2 из АЦ V. Конструкции аденилатциклаз с химерными мембранными доменами, то есть М1 из АЦ V, а М2 из АЦ VII (или, наоборот) были существенно инактивированными, и не активировались форсколином и Gsa, хотя уровни экспрессии и мембранная локализация в клетках этих ферментов была нормальной. Эти данные указывают на функционально важную роль мембранных доменов аденилатциклаз. Мембранные домены М1 и М2, по-видимому, взаимодействуют, спариваясь специфически, только в пределах данной изоформы аденилатциклазы, то есть изоформа-специфическим способом. Это взаимодействие непосредственно связано с образованием каталитической поверхности раздела между цитоплазматическими доменами С1 и С2 аденилатциклазы. Предполагается, что белок-белковые взаимодействия аденилатциклазных мембранных доменов могут составлять новый, все еще не изученный уровень регуляции аденилатциклазы.

На наш взгляд, еще одним механизмом регуляции аденилатциклазной активности, осуществляемым через влияние на М1/М2 взаимодействие, является гликозилирование экстраклеточных петель аденилатциклаз. У всех мембраносвязанных аденилатциклаз млекопитающих потенциальные сайты N-гликозилирования локализованы в области экстраклеточных петель 5 и/или 6 [20]. Действительно, некоторые изоформы аденилатциклазы ( АЦ II, АЦ III, АЦ VI, АЦ VIII) являются гликозилированными [20,5]. Гликозилирование АЦ VIII влияет на каталитическую активность без изменения значения  $K_m$  и ее чувствительности к кальмодулину [5]. Интересно отметить, что только полностью гликозилированная форма АЦ III (в отличие от негликозилированной формы) может быть фосфорилирована  $Ca^{2+}$ /кальмодулин-зависимой киназой II [32]. Wu и соавторы [20] показали, что АЦ VI является гликозилированной *in vivo*. Обработка клеток НЕК 293, экспрессирующих АЦ VI, туникамицином, который блокирует N-гликозилирование, приводит к значительному снижению стимуляции АЦ VI форсколином, но не Gsa по сравнению с гликозилированной формой фермента. Кроме того, было показано, что гликозилирование АЦ VI не только влияет на ее каталитическую активность активатор-зависимым способом, но также изменяет способность к регуляции протеинкиназой C и рецептором, связанным с Gi белком [20].

## Литература

1. Adenylyl cyclase 6 is selectively regulated by protein kinase A phosphorylation in a region involved in Gas stimulation. Chen Y., Harry A., et a. //Proc. Natl. Acad. Sci. USA.-1997.-Vol.94.-P.14100-14104.
2. Brooker G. Oscillation of cyclic adenosine monophosphate concentration during the myocardial contraction cycle // Science.-1973.-Vol. 182.-P. 933-934.
3. Ca<sup>2+</sup>- calcineurin-inhibited adenylyl cyclase, highly abundant in forebrain regions, is important for learning and memory Antoni F.A., Palkovits M., Simpson J. et a. //J. Neurosci.-1998.-Vol.18.-P.9650-9661.
4. Caldwell K.K., Boyajian C.L., Cooper D.M.F. The effects of Ca<sup>2+</sup> and calmodulin on adenylyl cyclase activity in plasma membranes derived from neural and non-neural cells // Cell Calcium.-1992.-Vol. 13.-P. 107-121.
5. Cali J.J., Parekh R.S., Krupinski J. Splice variants of type VIII adenylyl cyclase // J. Biol. Chem.-1996.-Vol. 271.-P. 1089-1095.
6. Capacitative Ca<sup>2+</sup>-entry exclusively inhibits cAMP synthesis in C6-2B glioma cells; evidence that physiologically evoked Ca<sup>2+</sup> entry regulates Ca<sup>2+</sup>-inhibitable adenylyl cyclase in non-excitabile cells. Chiono M., Mahey R., Tate G., Cooper D.M.F. //J. Biol. Chem.-1995.-Vol. 270.-P. 1149-1155.
7. Capacitative Ca<sup>2+</sup>-entry regulates Ca<sup>2+</sup>-sensitive adenylyl cyclases. Cooper D.M.F., Yoshimura M., Zhang Y. et a. // Biochem. J.-1994.-Vol. 297.-P. 437-440.
8. Characterization of soluble forms on nonhimerie type V adenylyl cyclases. Scholich K., Barbier A. J., Mullenix J.B., Patel T.B. //Proc. Natl. Acad. Sci. USA.-1997.-Vol.94.-P. 2915-2920.
9. Characterization of human adenylyl cyclase IX reveals inhibition by Ca<sup>2+</sup>/calcineurin and differential mRNA polyadenylation. Paterson J.M., Smit S.M., Simpson J. et a. //J. Neurochem.-2000.-Vol.75.-P.1358-1367.
10. Choi E.J., Xia Z., Storm D.R. Stimulation of the type III olfactory adenylyl cyclase by calcium and calmodulin // Biochemistry.-1992.-Vol.31.-P.6492-6498.
11. Differential activation of adenylyl cyclase by protein kinase C isoenzymes Kawabe J., Iwami G., Ebina T. et a. //J. Biol.Chem.-1994.-Vol. 269.-P. 16554-16558.
12. Fagan K. A., Mahey R., Cooper D.M.F. Functional co-localization of transfected Ca<sup>2+</sup>- stimuable adenylyl cyclases with capacitative Ca<sup>2+</sup> entry sites // J.Biol. Chem.-1996.-Vol. 271.-P.12438-12444.
13. Guthrie P.B., Segal M., Kater S.B. Independent regulation of calcium revealed by imaging dendritic spines // Nature.-1991.-Vol.354.-P.76-80.
14. Hanoune J., Defer N. Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms //Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.-2001.-Vol.41.-P.145-174.
15. Ishikawa Y. Regulation of cAMP signaling by phosphorylation // Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.-1998.-Vol. 32.-P. 99-120.
16. Isolation and characterization of a novel cardiac adenylyl cyclase c DNA. Ishikawa Y., Katsushika S., Chen L. et a. // J.Biol. Chem.-1992.-Vol. 267, № 19.-P. 13553-13557.
17. Levin L.R., Reed R.R. Identification of functional domains of adenylyl cyclase using in vivo chimeras //J.Biol. Chem.-1995.-Vol.270.-P.7573-7579.

18. Microdomains with high Ca<sup>2+</sup> close to IP<sub>3</sub>-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. Rizzuto R., Brini M., Murgia M., Pozzan T. // *Science*.-1993.-Vol.262.-P.744-747.
19. Molecular biological approaches to unravel adenylyl cyclase signaling and function. Patel T.B., Du Z., Pierre S. et. a. // *Gene*.-2001.-Vol.269.-P.13-25.
20. N-Glycosylation and residues Asn805 u Asn890 are involved in the functional properties of type VI adenylyl cyclase. Wu G-C., Lai H-L., Lin Y-W et a. // *J. Biol.Chem*.-2001.-Vol. 276.-P.35450-35457.
21. Phosphorylation and inhibition of olfactory adenylyl cyclase by CaM kinase II in neurons: a mechanism for attenuation of olfactory signals. Wei J., Zhao A.Z., Chan G.C. et a. // *Neuron*.-1998.-Vol.21.-P.495-504.
22. Protein kinase C inhibits type VI adenylyl cyclase by phosphorylating the regulatory N domain and two catalytic C1 and C2 domains. Lin T.-H., Lai H.-L., Kao Y.-Y. et a. // *J. Biol.Chem*.-2002.-Vol.277.-P.15721-15728.
23. Regulation of a Ca<sup>2+</sup>-sensitive adenylyl cyclase in an excitable cell; role of voltage-gated versus capacitative Ca<sup>2+</sup>-entry. Fagan K.A., Graf R.A., Tolman S. et a. // *J. Biol. Chem*.-2000.-Vol. 275.-P. 40187-40194.
24. Regulation of Adenylyl Cyclase by Protein Kinase A. Iwami G., Kawabe J., Ebina T. et a. // *J. Biol.Chem*.-1995.-Vol.270.-P.12481-12484.
25. Regulation of type I adenylyl cyclase by calmodulin kinase IV in vivo. Wayman G.A., Wei J., Wong S., Storm D.R. // *Mol. Cell. Biol*.-1996.-Vol. 16.-P. 6075-6082.
26. Seebacher T., Linder J.U., Schulz J.E. An isoform-specific interaction of the membrane anchors affects mammalian adenylyl cyclase type V activity // *Eur. J. Biochem*.-2001.-Vol. 268.-P.105-110.
27. Stimulation of specific types of Gs-stimulated adenylyl cyclases by phorbol ester treatment Jacobowitz O., Chen J., Premont R.T., Iyengar R. // *J. Biol. Chem*.-1993.-Vol. 268.-P. 3829-3832.
28. Taussig R., Gilman A.G. Mammalian membrane-bound adenylyl cyclases // *J. Biol.Chem*.-1995.-Vol.270.-P.1-4.
29. The N terminus domain of type VI adenylyl cyclase mediates its inhibition by protein kinase C. Lai H.-L., Lin T.-H., Kao Y.-Y. et a. // *Mol. Pharmacol*.-1999.-Vol.56.-P.644-650.
30. Type VIII adenylyl cyclase. A Ca<sup>2+</sup> /calmodulin-stimulated enzyme expressed in discrete regions of rat brain. Cali J.J., Zwaagstra J.C., Mons N. et a. // *J.Biol. Chem*.-1994.-Vol. 269, № 16.-P. 12190-12195.
31. Wayman G. A., Imprey S., Storm D.R. Ca<sup>2+</sup>- inhibition of type III adenylyl cyclase in vivo // *J.Biol. Chem*.-1995.-Vol.270.-P.21480-21486.
32. Wei J. Wayman G., Storm D.R. Phosphorylation and inhibition of type III adenylyl cyclase by calmodulin-dependent protein kinase II in vivo // *J.Biol.Chem*.-1996.-Vol. 271.-P.24231-24235.
33. Yoshimura C.M., Cooper D.M.F. Type specific stimulation of adenylyl cyclase by protein kinase C // *J.Biol. Chem*.-1993.-Vol. 268.-P. 4604-4607.
34. Yu H.J., Ma H., Green R.D. Calcium entry via L-type calcium channels acts as a negative regulator of adenylyl cyclase activity and cyclic AMP levels in cardiac myocytes // *Mol. Pharmacol*.-1993.-Vol.44.-P.689-693.

35. Zimmermann G., Taussig R. Protein kinase C alters the responsiveness of adenylyl cyclases to G protein  $\alpha$  and  $\beta\gamma$  subunits //J. Biol.Chem.-1996.-Vol. 271.-P. 27161-27166.