

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КАЛЬЦИЙ-ЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ ИНФУЗОРИИ *TETRAHYMENA PYRIFORMIS*

© К. В. Деркач,¹ А. О. Шпаков,¹ З. И. Успенская,² А. Л. Юдин²

¹ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН

и ² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

электронный адрес: alex_shpakov@list.ru

Чувствительные к кальцию формы аденилатциклизы (АЦ) выявлены у большинства позвоночных и беспозвоночных животных, а также у некоторых представителей одноклеточных организмов, в том числе инфузорий. Нами впервые обнаружено, что в присутствии катионов кальция меняется активность АЦ инфузории *Tetrahymena pyriformis*. В концентрации 0.2—20 мкМ катионы кальция стимулировали активность фермента, причем максимум стимулирующего эффекта наблюдали при 2 мкМ Ca^{2+} . В концентрации 100 мкМ и выше катионы кальция ингибировали активность АЦ. Антагонисты кальмодулина W-5 и W-7 в концентрации 20—100 мкМ ингибировали стимулирующий эффект 5 мкМ Ca^{2+} , а в более высоких концентрациях полностью блокировали его. Другой антагонист кальмодулина — хлорпромазин — снижал стимулированную Ca^{2+} активность АЦ только в концентрации 200—1000 мкМ. Стимулирующее влияние серотонина, ЭФР и цАМФ на активность АЦ усиливалось в присутствии 5 мкМ Ca^{2+} . Стимулирующее действие ЭФР, цАМФ и инсулина на АЦ снижалось в присутствии 100 мкМ Ca^{2+} , а эффект цАМФ — еще и в присутствии антагонистов кальмодулина (500 мкМ). В то же время стимулирующее действие D-глюкозы в присутствии Ca^{2+} и антагонистов кальмодулина не изменялось. Полученные данные указывают на то, что у инфузории *T. pyriformis* присутствуют кальций-чувствительные формы АЦ, которые опосредуют стимуляцию фермента при действии ЭФР, цАМФ, инсулина и серотонина.

Ключевые слова: аденилатциклизаза, антагонист кальмодулина, инфузория, кальций, серотонин, циклический аденоzinмонофосфат, эпидермальный фактор роста, *Tetrahymena pyriformis*.

Принятые сокращения: АЦ — аденилатциклизаза, ЭФР — эпидермальный фактор роста.

Аденилатциклизы (АЦ) представляют собой широкораспространенную группу ферментов, катализирующих превращение АТФ во вторичный посредник цАМФ, который осуществляет регуляцию широкого спектра цАМФ-зависимых эффекторных систем клетки и контролирует такие фундаментальные клеточные процессы, как рост, метаболизм, дифференцирование, апоптоз, агрегация и движение. По структурно-функциональной организации и локализации в клетке АЦ делятся на два больших суперсемейства — мембранные и цитозольные (растворимые) формы. Мембранные АЦ в свою очередь подразделяются на две группы — Ca^{2+} -чувствительные и Ca^{2+} -нечувствительные формы фермента. У млекопитающих к группе Ca^{2+} -чувствительных мембранных форм фермента относятся АЦ 1, 3, 5, 6 и 8-го типов (Taussig, Gilman, 1995; Sunahara, Taussig, 2002). Катионы кальция ингибируют активность АЦ 5-го и 6-го типов и стимулируют активность АЦ 1-го и 8-го типов, причем ключевую роль в процессе стимуляции последних катионами кальция играет Ca^{2+} -связывающий белок кальмодулин, вследствие чего АЦ 1-го и 8-го типов относят к Ca^{2+} -кальмодулин зависимым формам АЦ.

Кальций-чувствительные формы АЦ выявлены также у одноклеточных эукариот — инфузорий *Paramecium tetraurelia* и *Dileptus anser* (Gustin, Nelson, 1987; Шпаков и др., 2007), трипаносом *Trypanosoma brucei* и *T. cruzi* (Pain-

davoin et al., 1992; D'Angelo et al., 2002) и гриба *Neurospora crassa* (Reig et al., 1984). Показано, что антагонисты кальмодулина ингибируют стимулированную Ca^{2+} активность АЦ у представителей одноклеточных эукариот, что позволяет высказать предположение об участии кальмодулина или родственных ему Ca^{2+} -связывающих белков в механизмах регуляторного влияния катионов кальция на активность фермента (Gustin, Nelson, 1987; D'Angelo et al., 2002; Шпаков и др., 2007). Нами обнаружено, что в культурах инфузории *D. anser* некоторые гормональные агенты реализуют свое действие через кальций-чувствительные формы АЦ. На это указывает снижение стимулирующих эффектов эпидермального фактора роста (ЭФР) и релаксина в присутствии сравнительно высоких (100 мкМ) концентраций Ca^{2+} и после обработки мембранных фракций комплексообразователями.

Ранее нами была выявлена и функционально охарактеризована АЦ в культурах свободноживущих инфузорий *Tetrahymena pyriformis* (Деркач и др., 2003; Шпаков и др., 2003, 2004а, 2004б). Показано, что некоторые гормоны высших позвоночных животных (пептиды инсулиновой группы, глюкагон и биогенные амины) стимулируют активность фермента, причем их действие реализуется через посредство ГТФ-связывающих белков, сходных по некоторым характеристикам с гетеротримерными G-белками высших эукариот. Однако влияние катионов каль-

ция на функциональную активность АЦ инфузории *T. pyriformis* и их участие в регуляции фермента гормонами и гормоноподобными веществами в настоящее время не изучены. В то же время выяснение роли кальция и кальцийсвязывающих белков в регуляции аденилаткиназной сигнальной системы у одноклеточных эукариот необходимо для понимания молекулярных основ функционирования этой системы и сопряженных с ней цАМФ-зависимых каскадов, которые, согласно современным представлениям, контролируют жизненно важные процессы у низших эукариот (Shpakov, Pertseva, 2008).

Цель настоящей работы состояла в изучении чувствительности АЦ инфузории *T. pyriformis* к катионам кальция и роли Ca^{2+} и кальмодулина в регуляции активности фермента гормонами и гормоноподобными веществами. Исследовали участие Ca^{2+} в молекулярных механизмах влияния серотонина, инсулина, ЭФР, цАМФ и D-глюкозы на активность АЦ. Следует отметить, что стимулирующее влияние серотонина и инсулина на АЦ инфузории было обнаружено нами ранее (Шпаков и др., 2004а, 2004б), в то время как стимуляция фермента ЭФР, цАМФ и D-глюкозой выявлена в настоящей работе впервые.

Материал и методика

В экспериментах использовали динатриевую соль креатинфосфата, креатинфосфокиназу из мышц кролика (НФ 2.7.3.2), серотонин, инсулин свиньи, ЭФР человека, кальмодулин из сердца быка, АТФ, цАМФ, а также антагонисты кальмодулина — хлорпромазин, солянокислый N-(6-аминогексил)-1-нафталенсульфонамид (W-5) и солянокислый N-(6-аминогексил)-5-хлор-1-нафталенсульфонамид (W-7) (Sigma, США). Другие реагенты получены от фирм Sigma (США) и Reanal (Венгрия). Для радиоизотопных экспериментов использовали $[\alpha-^{32}\text{P}]$ АТФ (37 тБк/ммоль) производства ОАО «Институт реакторных материалов» (Россия).

Объектом служили культуры инфузорий *T. pyriformis* с плотностью 150—300 тыс. кл./мл. Для получения гомогената клеток инфузорий их сначала осаждали центрифугированием (600 g, 3 мин), после чего трижды отмывали 20 мМ буфером Tris-HCl, pH 7.5. Гомогенизирование проводили путем обработки клеток ультразвуком на приборе УЗДН-2Т при частоте 20 кГц в течение 1 мин при охлаждении. Доля разрушенных клеток составляла не менее 95 % от общего количества.

Определение активности АЦ (АТФ-пироfosфатлиаза циклизующая, НФ 4.6.1.1) в гомогенатах клеточных культур инфузорий проводили при 30 °C и времени инкубации 10 мин, как описано ранее (Деркач и др., 2003), в инкубационной среде следующего состава: 50 мМ Трис-HCl, pH 7.5, 1 мМ АТФ, 20 мМ креатинфосфата, 0.5 мг/мл креатинфосфокиназы, 5 мМ MgCl_2 , $[\alpha-^{32}\text{P}]$ АТФ добавляли из расчета 37 кБк на пробу. Общий объем пробы составлял 50 мкл. Реакцию начинали добавлением белка (50—100 мкг) и останавливали внесением в пробу 100 мкл 0.5 М HCl, после чего образцы помещали на 6 мин в кипящую водяную баню. Затем в каждую пробу вносили по 100 мкл 1.5 М имидазола и наносили образцы на колонку с окисью алюминия. Образовавшийся в ходе ферментативной реакции цАМФ элюировали с помощью 10 мл 10 мМ буфера имидазол-HCl, pH 7.4. Элюат помещали в сцинтилляционные флаконы и измеряли в них радиоактивность по методу Черенкова на счетчике Rackbeta

(LKB, Швеция). Активность АЦ выражали в пмоль цАМФ за 1 мин на 1 мг белка.

Преинкубацию гомогенатов инфузорий с антагонистами проводили в течение 15 мин при 4 °C. Нафтalenсульфонамиды W-5 и W-7 растворяли в ДМСО, в контрольные пробы также добавляли ДМСО в соответствующих концентрациях.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием компьютерной программы ANOVA. Каждый эксперимент был выполнен трехкратно. Данные представлены в виде средних значений и их стандартных ошибок из нескольких независимых экспериментов. Различия между контрольными пробами и пробами, подвергнутыми воздействию гормонов или негормональных агентов, оценивали как достоверные при $P < 0.05$.

Результаты

Катионы кальция в концентрациях от 0.2 до 20 мКМ стимулировали базальную активность АЦ в культурах инфузорий *T. pyriformis* (рис. 1). Максимум стимулирующего эффекта (+387 %) достигался при концентрации Ca^{2+} 2 мКМ. В концентрациях 100 мКМ и выше выявлялось ингибирующее влияние катионов кальция на активность фермента. Антагонисты кальмодулина W-5 и W-7 в концентрации 20—100 мКМ отчетливо снижали стимулирующее действие 5 мКМ Ca^{2+} на активность АЦ, а в концентрациях выше 100 мКМ полностью его блокировали и даже снижали активность фермента ниже ее базального уровня (рис. 2). Так, в присутствии 1 мМ W-5 и W-7 активность АЦ снижалась ниже ее базального уровня на 44 %. Значения IC_{50} для ингибирующих эффектов W-5 и W-7 составили 102 и 128 мКМ соответственно. Ингибирующее влияние хлорпромазина, другого антагониста кальмодулина, выявлялось только в концентрации 200—1000 мКМ, причем если в концентрации 200 мКМ он снижал стимулирующий эффект 5 мКМ Ca^{2+} только на 37 %, то в концентрации 1 мМ блокировал его полностью (рис. 2). Кальмодулин из сердца быка не влиял на базальную и стимулированную 5 мКМ катионами кальция активность АЦ инфузории (данные не представлены).

Полученные данные свидетельствуют в пользу присутствия в клетках инфузорий *T. pyriformis* кальций-чув-

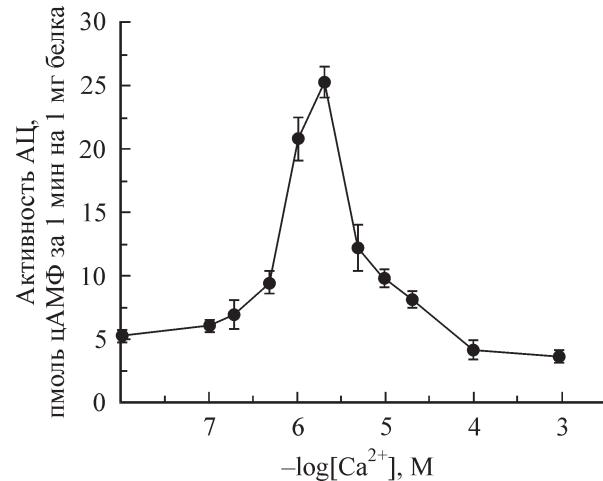


Рис. 1. Влияние катионов кальция на активность аденилаткиназы (АЦ) инфузории *Tetrahymena pyriformis*.

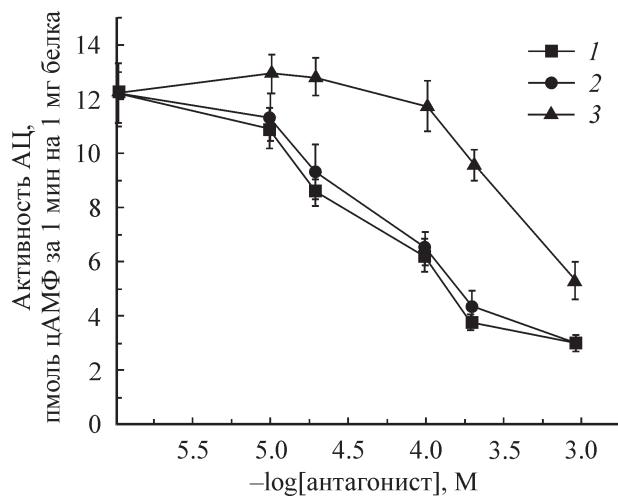


Рис. 2. Влияние антагонистов кальмодулина на стимуляцию активности АЦ инфузории *Tetrahymena pyriformis* катионами кальция (5 мкМ).

1 — W-5, 2 — W-7, 3 — хлорпромазин.

ствительных форм АЦ, которые стимулируются катионами кальция в концентрации 0.2—20 мкМ и ингибируются при более высоких концентрациях. Нельзя исключить, что в регуляторных эффектах катионов кальция на активность АЦ участвуют кальмодулин или родственные ему Ca^{2+} -связывающие белки, на что указывает снижение или даже полное блокирование стимулированной Ca^{2+} активности фермента в присутствии антагонистов кальмодулина W-5 и W-7, относящихся к классу нафталенсульфонамидов.

Далее исследовали влияние катионов кальция и антагонистов кальмодулина на стимуляцию АЦ инфузории *T. pyriformis* гормонами и гормоноподобными веществами. Сначала было изучено участие кальций-чувствительных форм АЦ в реализации стимулирующих эффектов гормонов позвоночных животных — серотонина и инсулина, обнаруженных ранее (Деркач и др., 2003; Шпаков и др., 2004а). Стимулирующий АЦ эффект серотонина (10^{-4} М), который составил 253 %, в значительной степени усиливается (потенцировался) в присутствии 5 мкМ Ca^{2+} (рис. 3). Потенцирование, которое рассчитывали как разность между стимулирующим совместным действием серотонина и 5 мкМ Ca^{2+} и арифметической суммой отдельных эффектов серотонина и 5 мкМ Ca^{2+} , составило 322 %. При этом эффект серотонина слабо менялся в присутствии 100 мкМ Ca^{2+} и антагонистов кальмодулина (рис. 3, 4). Стимулирующий АЦ эффект инсулина (10^{-8} М), который в отсутствие катионов кальция составил 78 %, сохранялся в присутствии антагонистов кальмодулина, но отчетливо снижался или блокировался в присутствии Ca^{2+} в обеих исследованных концентрациях. Так, в присутствии 100 мкМ Ca^{2+} эффект инсулина снижался до 28 %, а в случае влияния гормона на активность АЦ, стимулированную 5 мкМ Ca^{2+} , эффект инсулина не выявлялся. Полученные данные указывают на то, что серотонин и инсулин действуют на цАМФ-зависимые каскады *T. pyriformis* через Ca^{2+} -зависимые формы АЦ, которые различаются по чувствительности к катионам кальция.

Проведенный нами скрининг широкого спектра ростовых факторов, природных нуклеотидов, моно- и дисахаридов позволил установить, что ЭФР, цАМФ и Д-глюкоза стимулируют активность АЦ инфузории *T. pyriformis*.

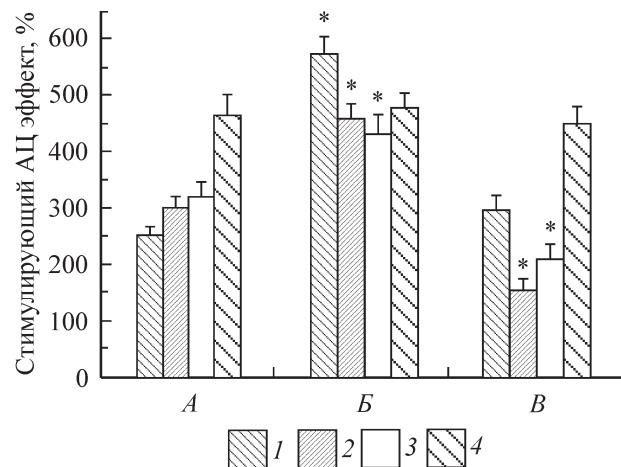


Рис. 3. Стимулирующее влияние гормонов и гормоноподобных веществ на активность АЦ в отсутствие (A) и в присутствии катионов кальция в концентрациях 5 (Б) и 100 (В) мкМ.

По вертикали — стимулирующее действие гормона или гормоноподобного вещества на АЦ, %, отнесенное к базальной активности фермента, принятой за 100 %; 1 — серотонин, 10^{-4} М; 2 — ЭФР, 10^{-8} М; 3 — цАМФ, 10^{-4} М; 4 — Д-глюкоза, 10^{-4} М. Стимулирующий эффект рассчитывали как разность между активностью фермента в отсутствие воздействия (базальной или преникнувшей с Ca^{2+}) и активностью фермента, стимулированного гормоном или гормоноподобным веществом. Звездочка — $P < 0.05$ по сравнению с контролем.

mis. Была изучена роль кальций-чувствительных форм фермента в этом процессе и получены следующие результаты. Стимулирующий АЦ эффект Д-глюкозы (10^{-4} М), который составил 465 %, слабо менялся в присутствии Ca^{2+} и антагонистов кальмодулина (рис. 3, 4). Стимулирующие эффекты ЭФР человека (10^{-8} М) и цАМФ (10^{-4} М), которые в отсутствие катионов кальция составили 301 и 321 % соответственно, усиливались в присутствии 5 мкМ Ca^{2+} на 158 и 113 % соответственно, но снижались в присутствии 100 мкМ Ca^{2+} в 1.5—2 раза (рис. 3). Антагонисты кальмодулина W-5, W-7 и хлорпромазин в концентрации 500 мкМ практически не влияли на стимулирующий

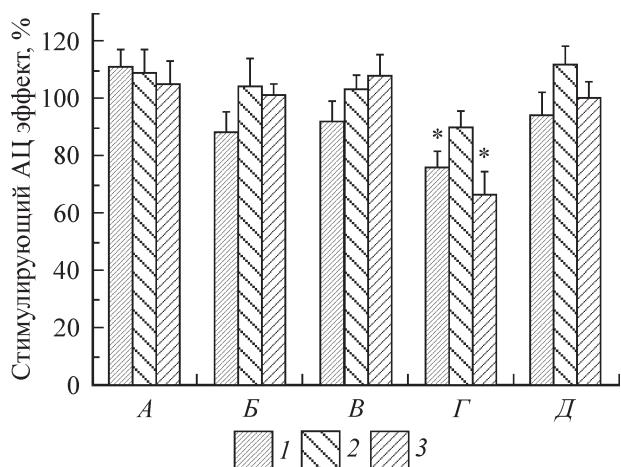


Рис. 4. Влияние антагонистов кальмодулина на стимулирующие АЦ эффекты гормонов и гормоноподобных веществ.

А — серотонин, 10^{-4} М; Б — инсулин, 10^{-8} М; В — ЭФР, 10^{-8} М; Г — цАМФ, 10^{-4} М; Д — Д-глюкоза, 10^{-4} М. 1 — W-5, 500 мкМ; 2 — W-7, 500 мкМ; 3 — хлорпромазин, 500 мкМ. Эффект гормона или гормоноподобного вещества в отсутствие антагониста принят за 100 %. Звездочка — $P < 0.05$ по сравнению с контролем.

эффект ЭФР, но заметно снижали соответствующий эффект цАМФ (рис. 4). Наиболее эффективным ингибитором стимулирующего влияния цАМФ на активность АЦ был хлорпромазин, который снижал его на 33 %. Полученные данные свидетельствуют о том, что стимулирующее действие ЭФР и цАМФ на АЦ (впервые показанное) реализуется при участии Ca^{2+} -чувствительных форм фермента, причем в случае цАМФ могут принимать участие кальмодулины или родственные ему белки.

Обсуждение

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что в клетках инфузорий *T. pyriformis* присутствуют кальций-чувствительные формы АЦ, которые стимулируются катионами кальция в низких концентрациях (0,2—20 мкМ), но ингибируются при более высоких концентрациях. По этому показателю они близки мембрально-связанным формам АЦ млекопитающих, которые стимулируются Ca^{2+} в субмикромолярных концентрациях (АЦ 1-го и 8-го типов) и ингибируются при более высоких, субмиллимолярных, концентрациях (АЦ 5-го и 6-го типов) (Taussig, Gilman, 1995; Sunahara, Taussig, 2002). Следует отметить, что стимулирующее влияние Ca^{2+} на активность АЦ *T. pyriformis* наиболее выражено при концентрациях Ca^{2+} 1—5 мкМ. Кальций в этих концентрации особенно эффективен в случае стимуляции АЦ млекопитающих и ряда других одноклеточных, в том числе инфузорий *P. tetraurelia* и *D. anser* (Reig et al., 1984; Gustin, Nelson, 1987; Paindavoine et al., 1992; D'Angelo et al., 2002; Шпаков и др., 2007).

Отчетливо выраженное ингибирующее влияние антагонистов кальмодулина нафтalenсульфонамидов W-5 и W-7 на стимулированную 5 мкМ Ca^{2+} активность АЦ позволяет предположить, что в регуляцию функциональной активности АЦ инфузорий *T. pyriformis* могут быть вовлечены Ca^{2+} -кальмодулин или родственные ему кальций-связывающие белки. W-5 и W-7 ингибируют активность АЦ в концентрациях, которые эффективны и для Ca^{2+} -кальмодулин-чувствительных АЦ млекопитающих (Ahlijanian, Cooper, 1987; Gross et al., 1987) и беспозвоночных животных (Bookbinder et al., 1990). Изучение функциональных свойств АЦ у других одноклеточных организмов — инфузории *P. tetraurelia*, гриба *N. crassa* и трипаносомы *T. cruzi* — указывает на то, что у них, так же как у многоклеточных организмов, имеются формы фермента, которые регулируются Ca^{2+} -кальмодулином (Reig et al., 1984; Gustin, Nelson, 1987; D'Angelo et al., 2002). Показано, что антагонисты кальмодулина W-7, трифтормеразин и кальмидазолин ингибируют базальную активность АЦ в мембранах инфузории *P. tetraurelia*, причем W-7 и трифтормеразин в концентрациях выше 500 мкМ и кальмидазолин в концентрациях выше 100 мкМ блокируют ее полностью (Gustin, Nelson, 1987). У трипаносомы *T. cruzi* антагонисты кальмодулина хлорпромазин, трифтормеразин и трифтормеразин дозависимым способом ингибируют как базальную, так и стимулированную катионами кальция активность фермента (D'Angelo et al., 2002). Выявленное в наших экспериментах отсутствие стимулирующего влияния кальмодулина из сердца быка на активность кальций-чувствительной формы АЦ *T. pyriformis*, как мы полагаем, связано с высокой специфичностью взаимодействия кальмодулинов из различных источников с регуляторными участками АЦ и не является веским аргументом в пользу отсутствия у *T. pyriformis* чувствительных к кальмодулину форм АЦ.

В пользу тесной функциональной взаимосвязи между кальмодулином и компонентами цАМФ-зависимых сигнальных путей, в первую очередь АЦ, свидетельствуют данные о том, что у низших эукариот, в том числе у инфузорий рода *Tetrahymena*, кальмодулин регулирует ряд жизненно важных процессов, контролируемых через аденилатциклазную сигнальную систему (Suzuki et al., 1982; Moser et al., 1997; Gonda et al., 1999; Numata, Gonda, 2001; Plattner, Klauke, 2001). Наряду с этим у инфузорий *T. pyriformis* и *P. tetraurelia* Ca^{2+} -кальмодулин стимулирует активность гуанилатциклаз, которые по своей структурно-функциональной организации близки мембрально-связанным формам АЦ (Gustin, Nelson, 1987; Kovacs et al., 1989). Предполагается, что молекулярные механизмы, лежащие в основе активации кальмодулином Ca^{2+} -чувствительных форм АЦ и гуанилатциклазы, являются сходными. Однако необходимы дальнейшие исследования, для того чтобы установить, регулируются ли выявленные нами кальций-чувствительные формы АЦ *T. pyriformis* Ca^{2+} -кальмодулином и другими кальцийсвязывающими белками.

Ранее нами было установлено, что некоторые гормоны позвоночных животных (пептиды инсулиновой группы, глюкагон и серотонин) способны ГТФ- зависимым способом стимулировать активность АЦ инфузории *T. pyriformis* (Деркач и др., 2003; Шпаков и др., 2003, 2004а, 2004б). В ходе выполнения настоящей работы нами был проведен скрининг значительного числа ростовых факторов, природных нуклеотидов, моно- и дисахаридов и обнаружено, что ЭФР человека, цАМФ и D-глюкоза стимулируют активность АЦ *T. pyriformis*. В этой связи следует отметить, что стимулирующие АЦ эффекты ЭФР и цАМФ, который в этом случае выполняет функции не вторичного, а первичного посредника, были обнаружены нами ранее у инфузории *D. anser*, причем действие ЭФР реализуется через Ca^{2+} -чувствительные формы АЦ (Шпаков и др., 2007, 2009). Другими авторами было показано, что цАМФ выполняет функцию внешнего сигнала у амебы *Dictyostelium discoideum* и гриба *N. crassa* (Kim et al., 1998; Krystofova, Borkovich, 2006). Этот циклический нуклеотид специфично связывается с цАМФ-рецепторами, расположенными в плазматической мембране, и через них регулирует широкий спектр сигнальных систем, в том числе АЦ А-типа, которая осуществляет синтез цАМФ внутри клетки. Поскольку у *D. discoideum* внеклеточный цАМФ регулирует хемотаксис и агрегацию амеб в многоклеточное образование (Dornmann et al., 2001), можно предположить, что у инфузорий *T. pyriformis* этот циклический нуклеотид также вовлечен в процессы хемотаксиса и внутривидовой хемокоммуникации. Показано, что ЭФР в концентрациях, которые являются физиологическими для позвоночных животных, регулирует ростовые процессы у *T. pyriformis* (Шемарова и др., 2002). Обнаруженная нами стимуляция АЦ этим ростовым фактором, как мы полагаем, является одним из молекулярных механизмов его регуляторного влияния на клетки *T. pyriformis*, тем более что у позвоночных животных одной из мишений действия ЭФР является аденилатциклазная сигнальная система. Стимулирующее влияние D-глюкозы на активность мембрально-связанных форм АЦ выявлено у различных видов дрожжевых грибов (Kraakman et al., 1999; Welton, Hoffman, 2000). Эффект реализуется через рецепторы серпантинного типа, которые ГТФ- зависимым

способом сопряжены с АЦ. Предполагается, что чувствительные к глюкозе рецепторы имеются не только у грибов, но и у представителей царства животных, в частности у млекопитающих (Vigues et al., 2008). Обнаружение нами регулируемой глюкозой АЦ у инфузории *T. pyriformis* подтверждает это предположение.

Нами установлено, что стимулирующие эффекты ЭФР, цАМФ, инсулина и серотонина в клетках *T. pyriformis* реализуются через кальций-чувствительные АЦ, в то время как соответствующий эффект D-глюкозы осуществляется через нечувствительные к катионам кальция формы АЦ. При этом ЭФР и цАМФ действуют через Ca^{2+} -чувствительные формы АЦ, которые стимулируются низкими (5 мкМ) и ингибируются сравнительно высокими (100 мкМ) концентрациями катионов кальция. Можно предположить, что влияние ЭФР и цАМФ на активность цАМФ-зависимых каскадов у *T. pyriformis* осуществляется как через формы фермента, близкие по своим регуляторным свойствам АЦ 1-го и 8-го типов млекопитающих (стимулируются микромолярными концентрациями кальция), так и через формы АЦ, родственные АЦ 5-го и 6-го типов млекопитающих (ингибируются субмиллимолярными концентрациями кальция). Снижение стимулирующего эффекта цАМФ в присутствии антагонистов кальмодулина может указывать на вовлечение в стимуляцию Ca^{2+} -кальмодулин зависимых форм АЦ. Стимулирующий АЦ эффект серотонина заметно не меняется в присутствии 100 мкМ Ca^{2+} , но отчетливо усиливается в присутствии 5 мкМ Ca^{2+} , что может указывать на участие в действии гормона Ca^{2+} -чувствительных форм АЦ, сходных с АЦ 1-го и 8-го типов млекопитающих. Наиболее сложная картина выявлена при изучении влияния Ca^{2+} на стимулирующий АЦ эффект инсулина, который ингибируется Ca^{2+} как в субмикромолярных, так и субмиллимолярных концентрациях. Это позволяет сделать вывод об участии Ca^{2+} -чувствительных АЦ в действии гормона на аденилатцилазную систему инфузорий. В то же время для расшифровки молекулярных механизмов передачи инсулинового сигнала к АЦ через Ca^{2+} -чувствительные формы фермента требуются дальнейшие исследования.

Ранее нами было показано, что у инфузории *D. anser* ЭФР и релаксин стимулируют кальций-чувствительные формы АЦ, в то время как биогенные амины серотонин и октопамин оказывают стимулирующее действие через Ca^{2+} -нечувствительные формы АЦ (Шпаков и др., 2007). Следовательно, ЭФР у инфузорий *T. pyriformis* и *D. anser* действует через Ca^{2+} -чувствительные формы АЦ, в то время как серотонин, напротив, у *T. pyriformis* стимулирует Ca^{2+} -чувствительную АЦ, а у *D. anser* — Ca^{2+} -нечувствительную. Это указывает на то, что даже у сравнительно близких видов одноклеточных механизмы действия гормонов на АЦ могут различаться. Необходимо отметить, что сведения об участии кальций-чувствительных форм АЦ в реализации регуляторного влияния гормонов и гормоноподобных молекул на активность аденилатцилазной системы у других представителей одноклеточных организмов в настоящее время отсутствуют, несмотря на имеющиеся об участии кальцийсвязывающих белков в цАМФ-зависимых сигнальных каскадах у амебы *D. discoideum*, жгутиконосцев и грибов (Shpakov, Pertseva, 2008).

Таким образом, в клетках свободноживущих инфузорий *T. pyriformis* выявлены кальций-чувствительные формы АЦ, которые стимулируются катионами кальция в низких, микромолярных, концентрациях и ингибируются

при более высоких, а также антагонистами кальмодулина. Через посредство Ca^{2+} -чувствительных форм АЦ свое влияние на аденилатцилазную систему инфузорий *T. pyriformis* оказывают ЭФР, цАМФ, инсулин и серотонин, в то время как D-глюкоза активирует нечувствительные к кальцию формы фермента.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00692).

Список литературы

- Деркач К. В., Шпаков А. О., Кузнецова Л. А., Ирлина И. С., Плеснева С. А., Перцева М. Н. 2003. Регуляция аденилатцилазной системы инфузории *Tetrahymena pyriformis* гормональными и негормональными агентами и ее зависимость от уровня базальной активности аденилатцилазы. Журн. эволюц. биохим. физиол. 39 (4) : 332—338.
- Шемарова И. В., Селиванова Г. В., Власова Т. Д. 2002. Влияние эпидермального фактора роста и инсулина на пролиферацию и синтез ДНК у инфузории *Tetrahymena pyriformis*. Цитология. 44 (11) : 1097—1103.
- Шпаков А. О., Деркач К. В., Успенская З. И., Кузнецова Л. А., Плеснева С. А., Перцева М. Н. 2003. Регуляция биогенными аминами и пептидными гормонами активности аденилатцилазы и протеинкиназы А у инфузорий *Dileptus anser* и *Tetrahymena pyriformis*. Докл. РАН. 388 (2) : 275—277.
- Шпаков А. О., Деркач К. В., Успенская З. И., Перцева М. Н. 2009. Стимуляция аденилатцилазы циклическим аденоzinмонофосфатом в клеточной культуре инфузории *Dileptus anser*. Докл. РАН. 424 (2) : 270—272.
- Шпаков А. О., Деркач К. В., Успенская З. И., Шпакова Е. А., Кузнецова Л. А., Плеснева С. А., Перцева М. Н. 2004а. Регуляция пептидами инсулинового суперсемейства аденилатцилазной сигнальной системы в клеточных культурах инфузорий *Dileptus anser* и *Tetrahymena pyriformis*. Журн. эволюц. биохим. физиол. 40 (4) : 290—297.
- Шпаков А. О., Деркач К. В., Успенская З. И., Шпакова Е. А., Кузнецова Л. А., Плеснева С. А., Перцева М. Н. 2004б. Молекулярные механизмы регуляторного влияния агонистов адренергических рецепторов на функциональную активность аденилатцилазной сигнальной системы инфузорий *Dileptus anser* и *Tetrahymena pyriformis*. Цитология. 46 (4) : 317—325.
- Шпаков А. О., Успенская З. И., Деркач К. В., Кузнецова Л. А., Плеснева С. А., Перцева М. Н. 2007. Регуляторное влияние кальция на функциональную активность аденилатцилазы инфузории *Dileptus anser*. Журн. эволюц. биохим. физиол. 43 (2) : 109—115.
- Ahlijanian M. K., Cooper D. M. 1987. Antagonism of calmodulin-stimulated adenylate cyclase by trifluoperazine, calmidazolium and W-7 in rat cerebellar membranes. J. Pharmacol. Exp. Ther. 241 : 407—414.
- Bookbinder L. H., Moy G. W., Vasquier V. D. 1990. Identification of sea urchin sperm adenylate cyclase. J. Cell Biol. 111 : 1859—1866.
- D'Angelo M. A., Montagna A. E., Sanguineti S., Torres H. N., Flavia M. M. 2002. A novel calcium-stimulated adenylyl cyclase from *Trypanosoma cruzi*, which interacts with the structural flagellar protein paraflagellar rod. J. Biol. Chem. 277 : 35 025—35 034.
- Dornmann D., Kim J. Y., Devreotes P. N., Weijer C. J. 2001. cAMP receptor affinity controls wave dynamics, geometry and morphogenesis in *Dictyostelium*. J. Cell Sci. 114 : 2513—2523.
- Gonda K., Katoh M., Hanyu K., Watanabe Y., Numata O. 1999. Ca^{2+} /calmodulin and p85 cooperatively regulate an initiation of cytokinesis in *Tetrahymena*. J. Cell Sci. 112 : 3619—3626.
- Gross M. K., Toscano D. G., Toscano W. A. 1987. Calmodulin-mediated adenylate cyclase from mammalian sperm. J. Biol. Chem. 262 : 8672—8676.

- Gustin M. C., Nelson D. L. 1987. Regulation of ciliary adenylyl cyclase by Ca^{2+} in *Paramecium*. *Biochem. J.* 246 : 337—345.
- Kim J. Y., Borleis J. A., Devreotes P. N. 1998. Switching of chemoattractant receptors programs development and morphogenesis in *Dictyostelium*: receptor subtypes activate common responses at different agonist concentrations. *Develop. Biol.* 197 : 117—128.
- Kovacs P., Csaba G., Nagao S., Nozawa Y. 1989. The regulatory role of calmodulin-dependent guanylate cyclase in association with hormonal imprinting in *Tetrahymena*. *Microbios.* 59 : 123—128.
- Kraakman L., Lemaire K., Ma P., Teunissen A. W., Donaton M. C., Van Dijck P., Winderickx J., de Winde J. H., Thevelein J. M. 1999. A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. *Mol. Microbiol.* 32 : 1002—1012.
- Krystofova S., Borkovich K. A. 2006. The predicted G-protein-coupled receptor GPR-1 is required for female sexual development in the multicellular fungus *Neurospora crassa*. *Eukaryot. Cell.* 5 : 1503—1516.
- Moser M. J., Flory M. R., Davis T. N. 1997. Calmodulin localizes to the spindle pole body of *Schizosaccharomyces pombe* and performs an essential function in chromosome segregation. *J. Cell Sci.* 110 : 1805—1812.
- Numata O., Gonda K. 2001. Determination of division plane and organization of contractile ring in *Tetrahymena*. *Cell Struct. Funct.* 26 : 593—601.
- Paindavoine P., Rolin S., Van Assel S., Geuskens M., Jauniux J. C., Dinsart C., Huet G., Pays E. 1992. *Mol. Cell. Biol.* 12 : 1218—1225.
- Plattner H., Klauke N. 2001. Calcium in ciliated protozoa: sources, regulation, and calcium-regulated cell functions. *Int. Rev. Cytol.* 201 : 115—208.
- Reig J. A., Tellez-Inon M. T., Flavia M. M., Torres H. N. 1984. Activation of *Neurospora crassa* soluble adenylyl cyclase by calmodulin. *Biochem. J.* 221 : 541—543.
- Shpakov A. O., Pertseva M. N. 2008. Signaling systems of lower eukaryotes and their evolution. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 269 : 151—282.
- Sunahara R. K., Taussig R. 2002. Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: Multiplicities of signaling. *Mol. Interv.* 2 : 168—184.
- Suzuki Y., Ohnishi K., Hirabayashi T., Watanabe Y. 1982. *Tetrahymena* calmodulin: characterization of an anti-*Tetrahymena* calmodulin and the immunofluorescent localization in *Tetrahymena*. *Exp. Cell Res.* 137 : 1—14.
- Taussig R., Gilman A. G. 1995. Mammalian membrane-bound adenylyl cyclases. *J. Biol. Chem.* 270 : 1—4.
- Vigues S., Dotson C. D., Munger S. D. 2008. The receptor basis of sweet taste in mammals. *Results Probl. Cell. Differ.* 2 : DOI: 10.1007/400.
- Welton R. M., Hoffman C. S. 2000. Glucose monitoring in fission yeast via the gpa2 $\text{G}\alpha$, the git5 $\text{G}\beta$ and the git3 putative glucose receptor. *Genetics.* 156 : 513—521.

Поступила 25 II 2010

FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF CALCIUM-SENSITIVE ADENYLYL CYCLASE OF CILIATE *TETRAHYMENA PYRIFORMIS*

K. V. Derkach,¹ A. O. Shpakov,¹ Z. I. Uspenskaya,² A. L. Yudin²

¹ Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS
and ² Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
e-mail: alex_shpakov@list.ru

Calcium-sensitive forms of adenylyl cyclase (AC) were revealed in most vertebrates and invertebrates and also in some unicellular organisms, in particular ciliates. We have shown for the first time that calcium cations influence the AC activity of ciliate *Tetrahymena pyriformis*. These cations at the concentrations of 0.2—20 μM stimulated the enzyme activity, and maximum of catalytic effect was observed at 2 μM Ca^{2+} . Calcium cations at a concentrations of 100 μM or higher inhibited the AC activity. Calmodulin antagonists W-5 and W-7 at the concentrations of 20—100 μM inhibited the catalytic effect induced by 5 μM Ca^{2+} and blocked the effect at higher concentrations of Ca^{2+} . Chloropromazine, another calmodulin antagonist, reduced Ca^{2+} -stimulated AC activity only at the concentrations of 200—1000 μM . AC stimulating effects of serotonin, EGF and cAMP increased in the presence of 5 μM Ca^{2+} . AC stimulating effects of EGF, cAMP and insulin decreased in the presence of 100 μM Ca^{2+} , and AC stimulating effect of cAMP decreased also in the presence of calmodulin antagonists (1 mM). At the same time, stimulating effect of D-glucose in the presence of Ca^{2+} and calmodulin antagonists did not change essentially. The data obtained speak in favor of the presence of calcium-sensitive forms of AC in ciliate *T. pyriformis* which mediate enzyme stimulation by EGF, cAMP, insulin, and serotonin.

Ключевые слова: adenylyl cyclase, calmodulin antagonist, ciliate, calcium, serotonin, cyclic adenosine monophosphate, epidermal growth factor, *Tetrahymena pyriformis*.