

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ И СВОЙСТВ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ КАЛЬЦИЙАКТИВИРУЕМЫХ ПРОТЕИНАЗ У БЕСПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ

Н. П. Канцерова, Л. А. Лысенко, Н. Н. Немова

Учреждение Российской академии наук

Институт биологии Карельского научного центра РАН, г. Петрозаводск, Россия,

e-mail: nkantserova@yandex.ru

Кальпаины (КФ 3.4.22.17; клан СА, семейство С2) – кальций-зависимые протеиназы, ответственные за селективную деградацию белков в цитозоле клеток всех организмов – от прокариот до млекопитающих.

Исследование кальпаинов началось в 1976 году, когда из цитозоля мозга крысы был выделен первый белок этого семейства (Dayton et al., 1976), позднее названный *m*-кальпаином. Вскоре было показано присутствие в тканях его гомолога – *μ*-кальпаина (степень гомологии аминокислотной последовательности свыше 90%) (Suzuki, 1990). Термины *μ*-кальпаин и *m*-кальпаин впервые применили в 1989 году (Cong et al., 1989) для указания на микромолярную (*μ*-кальпаин) и миллимолярную (*m*-кальпаин) концентрации Ca^{2+} , необходимые для активации этих протеиназ *in vitro*. К настоящему времени известны их доменная организация, нуклеотидные последовательности кодирующих их генов, структура активного центра, механизм связывания с Ca^{2+} с последующим конформационным переходом полноразмерной молекулы (механизм активации). С учетом структурных особенностей *μ*- и *m*-кальпаины называют «классическими», а в силу широкой тканевой локализации – «повсеместными». Также охарактеризован кальпастатин, третий важнейший белок-регулятор кальпаиновой системы. Этот ингибитор специфично угнетает протеолитическую активность *μ*- и *m*-кальпаинов, но не влияет на активность других известных протеиназ.

В нативной форме *μ*- и *m*-кальпаины позвоночных имеют гетеродимерную структуру. Их каталитические субъединицы 80 кДа – продукты разных генов (у человека *CAPN1* и *CAPN2*), тогда как регуляторная субъединица 28 кДа (*CPNS1*) одина для обеих форм (Aoki et al., 1986;

Imajoh et al., 1988). Каталитическая 80 кДа субъединица *m*-кальпаина, или кальпаин 2 – типичный полипептид семейства С2 (Rawlings et al., 2010), который подразделяют на основании аминокислотной последовательности на четыре домена (Suzuki, 1990) (рис. 1). По данным кристаллографического анализа, домен II состоит из двух субдоменов, а между доменами III и IV обнаруживается линкерная область (Hosfield et al., 1999; Strobl et al., 2000).

Последовательность *N*-концевого домена I, или пропептида, не имеет гомологов среди известных полипептидов. Каталитический домен II содержит аминокислотный остаток (а.о.) Cys в положении 105 (субдомен IIa), который наряду с а.о. His262 и Asn286 (субдомен IIb), формирует типичную каталитическую триаду цистеиновых протеиназ. Последовательность домена III не имеет гомологов среди известных полипептидов, а функционально классифицируется как С2-подобный (Sorimachi et al., 1997; Nata et al., 2001). Домен III обеспечивает сопряжение каталитического домена II и Ca^{2+} -связывающего домена IV и усиление Ca^{2+} -индуцированных конформационных изменений, а также ассоциацию кальпаинов с фосфолипидами мембран (Tompa et al., 2001). В его последовательности можно выделить два потенциальных Ca^{2+} -связывающих EF-hand-фрагмента, однако, у млекопитающих они функционально неактивны в отличие от кальпаина плоского червя *Schistosoma mansoni* (Andresen et al., 1991). Последовательность домена IV сходна с кальмодулином и содержит пять предполагаемых Ca^{2+} -связывающих EF-hand-мотивов (Strobl et al., 2000; Goll et al., 2003).

У млекопитающих помимо «повсеместных» кальпаинов также обнаружены тканеспецифич-

ные, мРНК которых обнаруживается, главным образом, в клетках скелетных (кальпаин 3а, или р94) (Sorimachi et al., 1989) или гладких мышц (кальпаин 8а, кальпаин 8b) (Sorimachi et al., 1993), в плаценте (кальпаин 6) (Dear et al., 1997), в пищеварительном тракте (кальпаин 9) (Suzuki et al., 2004), в яичках (кальпаин 11) (Dear and Boehm, 1999) или волосяных фолликулах и коже в течение первых 16 дней после рождения (кальпаин 12) (Suzuki et al., 2004). Более широкая тканевая экспрессия характерна для кальпаина 5 (Matena et al., 1998), кальпаина 7 (Futai et al., 2001), кальпаина 10 (Horikawa et al., 2000), кальпаина 13 (Dear and Boehm, 2001) и кальпаина 15 (Suzuki et al., 2004).

На основании сходства доменной организации с 80 кДа субъединицей m-кальпаина и по наличию EF-hand-мотивов в C-концевом домене выделяется группа типичных кальпаинов, другие относятся к атипичным. Замещающие кальмодулинподобный домен вспомогательные домены T, SOH и PWH позволяют разделить атипичные кальпаины на группы гомологов TRA-3, SOL и PalB, соответственно (Бондарева, Немова, 2008).

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

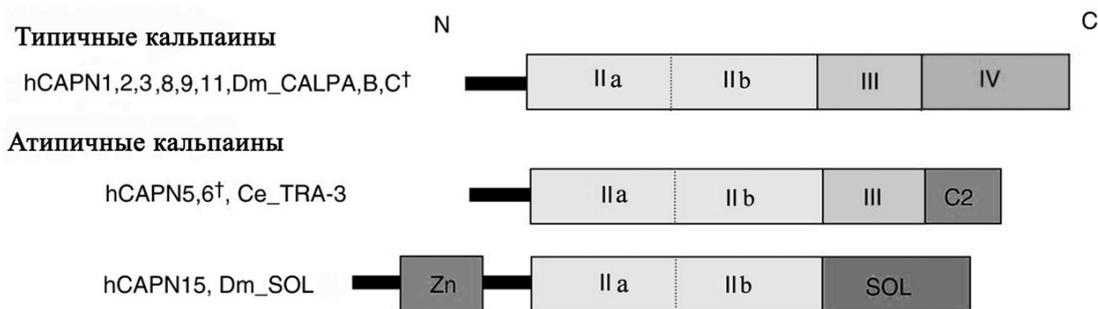
К настоящему моменту кальпаин-кальпастиновая система млекопитающих достаточно хорошо изучена, хотя и в этой области остается ряд нерешенных проблем; так, например, не до конца остается выясненным вопрос о механизмах регуляции активности кальпаинов в живых клетках (Goll et al., 2003; Бондарева и др., 2006). Сведения о кальций-зависимых протеиназах у беспозвоночных ограничиваются, главным образом, идентификацией кодирующих их нуклеотидных последовательностей.

Скрининг библиотеки кДНК плоского червя *Schistosoma mansoni* показал, что в геноме этого

паразитического организма кодируется 768-членный полипептид (86,9 кДа), обладающий сходством с μ -кальпаином человека (сходных а.о. 62%, идентичных а.о. 42%). В структуре этого белка выделяют четыре домена и EF-hand-мотивы, характерные для μ - и m-кальпаинов (Andresen et al., 1991); он однозначно идентифицирован как член семейства кальпаинов, хотя содержит в домене IV только три EF-hand-мотива.

Скрининг библиотеки кДНК дрозофилы *Drosophila melanogaster* выявил четыре последовательности, гомологичные кальпаинам (Delany et al., 1991; Emori and Saigo, 1994; Theopold et al., 1995; Jékely and Friedrich, 1999). Полипептиды CALPA и CALPB содержат четыре типичных для 80 кДа субъединицы m-кальпаина домена, включая четыре EF-hand-мотива в домене IV и на границе доменов II и III, и, следовательно, относятся к типичным кальпаинам. Каталитические а.о. в белке CALPC замещены на а.о. Arg/Ile/Asp, поэтому, вероятно, CALPC не обладает протеолитической активностью. Полипептид SOL (белок малых оптических бугров, или small optic lobes) вместо кальмодулинподобного домена содержит C-концевой домен SOH, а также N-концевой Zn-finger-подобный домен (рис.).

Расшифровка генома нематоды *Caenorhabditis elegans* привела к идентификации 12 генов кальпаин-подобных последовательностей (*C. Elegans* Consortium, 1998), которые можно отнести к четырем группам. Наиболее изучен из них TRA-3, гомологи которого обнаружены у широкого круга организмов, от низших эукариот до млекопитающих. Ген *tra-3 C. elegans* кодирует кальпаин-подобный белок, состоящий из 648 а.о. (73,6 кДа) и обладающий высокой степенью сходства с μ - и m-кальпаинам млекопитающих в области доменов II и III. Однако, вместо кальмодулинподобного домена в белке присутствует T-домен – дополнительный C2-подобный C-концевой домен, представляющий собой Ca^{2+} -связывающий мембранный модуль, который участвует в передаче сигналов и трансмембранном трафике (рис.). Генетический анализ показал, что *tra-3* ген ассоциирован с половой детерминацией *C. elegans*. В эксперименте с трансгенными нематодами, характеризующимися сверхэкспрессией TRA-3, продемонстрирована способность этого белка к селективному Ca^{2+} -зависимому расщеплению белка мембраны TRA-2A, который связывает FEM-3 и тормозит его промоторную функцию в развитии *C. elegans* по мужскому типу (Sokol, Kuwabara, 2000; Sorimachi, Suzuki, 2001).



Модульная организация некоторых белков семейства кальпаинов (адаптировано из: Croall, Ersfeld, 2007)

Показана доменная структура кальпаинов *Drosophila melanogaster* (Dm) и *Caenorhabditis elegans* (Ce) и их гомологи среди кальпаинов человека (hCAPN). † – белки, в которых отсутствуют ключевые а.о. каталитической триады и, как следствие, лишены протеолитической активности. Обозначения доменов: C2 – дополнительный C2-подобный домен; SOL – домен малых оптических бугров (small optic lobe); Zn – Zn-finger домен.

У омара *Homarus americanus* была идентифицирована последовательность кДНК, кодирующая кальпаин-подобный белок, Ha-CalpM (Yu and Mykles, 2003), состоящий из 575 а.о. (предполагаемая молекулярная масса 66,3 кДа). Последовательность кодируемого белка имеет высокую степень сходства с другими кальпаинами в области доменов II и III, но его N-концевой домен I высоко дивергентен (Yu and Mykles, 2003). Поскольку последовательность кальпаина Ha-CalpM не содержит Ca²⁺-связывающий домен IV, его можно классифицировать как атипичный. Протеиназа Ha-CalpM была частично очищена (Yu and Mykles, 2003), и по ряду свойств (молекулярные массы изоформ, условия их соэлюции при гель-фильтрации и с анионообменника) установлена ее идентичность с ранее описанной CDP III (от англ. calcium-dependent proteases) омара (Mykles and Skinner, 1986). Высокий уровень экспрессии Ha-CalpM в мышцах и способность Ha-CalpM/CDP III к деградации миофибриллярных белков указывают на возможную роль этой протеиназы в функционировании мышечной ткани (Yu and Mykles, 2003). Так, установлено, что Ha-CalpM участвует в процессе дифференцировки мышц клешни омара по быстрому или медленному типу (Medler et al., 2007).

Данные о кальпаин-подобных белках, их структуре и свойствах получены лишь для трематоды *S. mansoni* (Andresen et al., 1991; Siddiqui et al., 1993), плодовой мушки *D. melanogaster*

(Pintèr et al., 1992), а также для ряда видов десятиногих ракообразных (Канцерова и др, 2010) и двустворчатых и головоногих моллюсков (Hatzizisis et al., 2000; Бондарева, 2002; Yu and Mykles, 2003; Kim et al., 2005).

Показана высокая вариабельность структурной организации кальпаинов, выделенных из тканей разных видов беспозвоночных. Значительно различаются молекулярные массы субъединиц и образуемых ими полноразмерных ферментов. Нативные молекулярные массы варьируют от 59 кДа CDP III мускула омара (Mykles and Skinner, 1986) до 520 кДа CDP мускула осьминога (Hatzizisis et al, 1996). Так, у абсолютного большинства беспозвоночных (за исключением трематоды *S. mansoni*) отсутствует малая субъединица, подобная 28 кДа субъединице; кальпаины этих организмов могут существовать в виде мономеров или гомодимеров, но не гетеродимеров. Известно, что CDP IIa и CDP IIb мышцы омара – гомодимеры из субъединиц 60 и 95 кДа, соответственно (Mykles and Skinner, 1986); CDP гребешка и креветки – также гомодимеры (Mykles, 1998). Кальпаин-подобная протеиназа дрозофилы (280 кДа) состоит из нескольких субъединиц с молекулярной массой 94 кДа (Pinter and Friedrich, 1988; Pinter et al, 1992), а CDP мышцы осьминога (520 кДа), вероятно, содержит 8 субъединиц с молекулярной массой 65 кДа (Hatzizisis et al, 1996). Установлено, что кальпаин-подобная протеиназа трематоды *S. mansoni*, аналогично гетеродимерным кальпаинам позвоночных, состоит из двух субъединиц 78 и 28 кДа, при этом 28 кДа полипептид в очищенном препарате присутствует в избытке по отношению к полипептиду 78 кДа (Siddiqui et al., 1993). Двумерный электрофорез показал присутствие двух различных 78 кДа полипептидов и одного 28 кДа полипептида, что позволяет предположить наличие у *S. mansoni* двух гетеродимерных кальпаинов, подобных μ - и m -кальпаинам позвоночных (Siddiqui et al., 1993).

В тканях беспозвоночных до сих пор не обнаружена активность кальпастина; у организмов, геном которых полностью расшифрован, например, *D. melanogaster*, также не идентифицированы гены, кодирующие кальпастин или его гомологи (Laval and Pascal, 2002).

Физиологические субстраты, расщепляемые кальпаин-подобными протеиназами в тканях беспозвоночных, можно разделить на две группы: белки, ответственные за передачу сигналов, и белки цитоскелета. К первой группе белков относят родопсин, протеинкиназу А и протеинкиназу С. Миофибрилярные белки (актин, миозин, парамиозин, тропомиозин, тропонины Т и I) и белки нейрофиламентов принадлежат ко второй группе (Mykles, 1998).

Особенность субстратной специфичности кальпаинов низших животных, по-видимому, заключается в низкой селективности их действия по сравнению с гомологами из теплокровных. Они обладают не только более широкой субстратной специфичностью (Mykles, 1998, Мухин и др., 2000), но и осуществляют более полный гидролиз белков-субстратов до составляющих их коротких пептидов (по данным Mykles (Mykles, 1998), в мышцах ракообразных до 60% белков гидролизуются в цитозоле). Так, например, кальций-зависимые протеиназы из скелетной мышцы клешни омара *Homarus americanus* расщепляют миофибрилярные белки, включая актин и миозин (Mykles, 1998), кальпаин-подобная протеиназа осьминога *Octopus vulgaris* деградирует большинство белков интактных миофибрилл, в частности, миозин, парамиозин, актин (Hatzizisis et al., 2000). Вместе с тем, классические μ - и m -кальпаины млекопитающих не расщепляют ак-

тин, очень медленно гидролизуют миозин, а прочие миофибрилярные белки расщепляют по нескольким связям с образованием крупных фрагментов (Goll et al., 2003).

Для активации кальпаин-подобных протеиназ беспозвоночных требуются миллимолярные концентрации Ca^{2+} (Mykles, 1998; Бондарева и др., 2006; Канцерова и др., 2010), в то время как потребность в кальции у большинства из известных кальпаинов позвоночных животных лежит в микромолярном диапазоне (исключение – m -кальпаин). Для кальций-зависимых протеиназ беспозвоночных животных, как и для кальпаинов позвоночных животных, характерна способность к автолизу, однако его роль недостаточно ясна – у автолизированных кальпаинов беспозвоночных чувствительность к Ca^{2+} не изменяется (Beyette and Mykles, 1997).

Таким образом, наличие у беспозвоночных животных внутриклеточных Ca^{2+} -зависимых протеолитических ферментов, сходных по свойствам с кальпаинами млекопитающих, свидетельствует об определенной эволюционной консервативности данного метаболического пути в белковом обмене. Однако, следует отметить, что кальпаинам беспозвоночных животных свойственны эволюционные особенности структурной организации, регуляции активности и выполняемых ими функций.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 08-04-01140-а, 09-04-90733-моб_ст), Программы Президента РФ «Ведущие научные школы» НШ-3731.2010.4 и проекта Программы Президиума РАН «Биологическое разнообразие».

Литература

- Бондарева Л.А., Немова Н. Н., 2008. Молекулярная эволюция внутриклеточных Ca^{2+} -зависимых протеиназ // Биоорганическая химия. Т. 34. № 3. С. 295–302.
- Бондарева Л. А., 2002. Ca^{2+} -активируемые протеолитические ферменты у рыб и водных беспозвоночных // Вестник молодых ученых. Сер. Науки о жизни. Т. 4. № 1. С. 52–57.
- Бондарева Л. А., Немова Н. Н., Кяйвярайнен Е. И., 2006. Внутриклеточная Ca^{2+} -зависимая протеолитическая система животных. М.: Наука. 294 с.
- Канцерова Н. П., Ушакова Н. В., Лысенко Л. А., Немова Н. Н. 2010. Кальций-зависимые протеиназы некоторых беспозвоночных и рыб // Журн. эволюц. биохим. физиол. Т. 46. № 6. С. 489–494.
- Мухин В. А., Немова Н. Н., Кяйвярайнен Е. И., Крупнова М. Ю., Оганесян С. А., 2000. Кальций-активируемая протеиназа в половых гаметах морского зеленого ежа (*Strongylocentrotus droebachiensis*) // Журн. эволюц. биохим. физиол. Т. 36. С. 3–6.
- Andresen K., Tom T.D.T., and Strand M., 1991. Characterization of cDNA clones encoding a novel calcium-activated neutral proteinase from *Schistosoma mansoni*. J. Biol. Chem. 266: 15085–15090.
- Aoki K., Imajoh S., Ohno S., Emori Y., Koike M., Kosaki G., and Suzuki K., 1986. Complete amino acid sequence of the large subunit of the low- Ca^{2+} -requiring form of human Ca^{2+} -activated neutral protease (μ -CANP) deduced from its cDNA sequence. FEBS Lett. 205: 313–317.
- Beyette J.R., Mykles D.L., 1997. Autolysis and biochemical properties of a lobster muscle calpain-like proteinase. J. Exp. Zool. 227. 106–119.
- C. *Elegans* Consortium. Genome sequence of the nematode, *C. elegans*: a platform for investigating biology., 1998. Science 282: 2012–2046.

- Cong J.Y., Goll D.E., Peterson A.M., and Kapprell H.P., 1989. The role of autolysis in activity of the Ca²⁺-dependent proteinases (μ -calpain and m-calpain). *J. Biol. Chem.* 264(17): 10096–10103.
- Croall D.E., Ersfeld K., 1997. The calpains: modular designs and functional diversity // *Gen. Biol.* 2007. V. 8. P. 218.
- Dayton W.R., Goll D.E., Zeece M.G., Robson R.M., and Reville W.J., 1976. A Ca²⁺-activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Purification from porcine muscle. *Biochemistry* 15: 2150–2158.
- Dear T.N. and Boehm T., 1999. Diverse mRNA expression patterns of the mouse calpain genes *Capn5*, *Capn6*, and *Capn 11* during development. *Mech. Dev.* 89: 201–209.
- Dear T.N. and Boehm T., 2001. Identification and characterization of two novel calpain large subunit genes. *Gene* 274: 245–252.
- Dear T.N., Matena K., Vingron M., and Boehm T., 1997. A new subfamily of vertebrate calpains lacking a calmodulin-like domain: implications for calpain regulation and evolution. *Genomics* 45: 175–184.
- Delany S.J., Hayward D.C., Barleben F., Fischbach K.-F., and Miklos G.L.G., 1991. Molecular cloning and analysis of SC optic lobes, a structural brain gene of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7214–7218.
- Emori Y. and Saigo K., 1994. Calpain localization changes in coordination with actin-related cytoskeletal changes during early embryonic development of *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* 269: 25137–25142.
- Futai E., Kubo T., Sorimachi H., Suzuki K., and Maeda T., 2001. Molecular cloning of PalB, a mammalian homologue of the *Aspergillus* atypical calpain PalB. *Biochim. Biophys. Acta.* 1517: 316–319.
- Goll D.E., Thompson V.F., Li H., Wei W., and Cong J., 2003. The calpain system. *Physiol. Rev.* 83(3): 731–801.
- Hata S., Nishi K., Kawamoto T., Lee H.-J., Kawahara H., Maeda T., Shintani Y., Sorimachi H., and Suzuki K., 2001. Both the conserved and the unique gene structure of stomach-specific calpains reveal processes of calpain gene evolution. *J. Mol. Evol.* 53: 191–203.
- Hatzizisis D., Gaitanaki C., and Beis I., 1996. Purification and properties of a calpain II-like proteinases from *Octopus vulgaris* arm muscle. *J. Comp. Physiol. B.* 113: 295–303.
- Hatzizisis D., Gaitanaki C., and Beis I., 2000. Degradation of myofibrillar proteins by a calpain-like proteinase in the arm muscle of *Octopus vulgaris*. *J. Comp. Physiol. B* 170(5–6): 447–456.
- Horikawa Y., Oda N., Cox N.J., Li X., Orholm-Melander M., Hara M., Hinori Y., Linder T.H., Mashima H., Schwarz P.E.H., Del Bosque-Plata L., Horikawa Y., Oda Y., Yoshiuchi I., Colilla S., Polonsky K.S., Wei S., Concannon P., Iwasaki N., Schulze J., Baier L.J., Bogardus C., Groop L., Boerwinkle E., Hanis C.L., and Bell G.I., 2000. Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nature Genet.* 26: 163–175.
- Hosfield C.M., Elce J.S., Davies P.L., and Jia Z., 1999. Crystal structure of calpain reveals the structural basis for Ca²⁺-dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation. *EMBO J.* 18: 6880–6889.
- Imajoh S., Aoki K., Ohno S., Emori Y., Kawasaki H., Sugihara H., and Suzuki K., 1988. Molecular cloning of the cDNA for the large subunit of the high-Ca²⁺-requiring form of human Ca²⁺-activated neutral protease. *Biochemistry* 27: 8122–8128.
- Jékely G. and Friedrich P., 1999. Characterization of two recombinant *Drosophila* calpains, CALPA and a novel homolog, CALPB. *J. Biol. Chem.* 274(34): 23893–23900.
- Kim H.W., Chang E.S., and Mykles D.L., 2005. Three calpains and ecdysone receptor in the land crab *Gecarcinus lateralis*: sequences, expression and effects of elevated ecdysteroid induced by eyestalk ablation. *J. Exp. Biol.* 208(Pt 16): 3177–3197.
- Laval M. and Pascal M., 2002. A calpain-like activity insensitive to calpastatin in *Drosophila melanogaster*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1570: 121–128.
- Matena K., Boehm T., and Dear T.N., 1998. Genomic organization of mouse *CAPN5* and *CAPN6* genes confirms that they are a distinct calpain family. *Genomics* 48: 117–120.
- Medler S., Chang E., Mykles D., 2007. Muscle-specific calpain is localized in regions near motor endplates in differentiating lobster claw muscles. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 148: 591–598
- Mykles D.L. and Skinner D.M., 1986. Four Ca²⁺-dependent proteinase activities isolated from crustacean muscle differ in size, net charge, and sensitivity to Ca²⁺ and inhibitors. *J. Biol. Chem.* 261(21): 9865–9871.
- Mykles D.L., 1998. Intracellular proteinases of invertebrates: calcium-dependent and proteasome/ubiquitin-dependent systems. *Int. Rev. Cytol.* 184: 157–289.
- Pintér M., Stierandova A., and Friedrich P., 1992. Purification and characterization of a Ca²⁺-activated thiol protease from *Drosophila melanogaster*. *Biochemistry* 31: 8201–8206.
- Rawlings N.D., Barrett A.J., and Bateman A., 2010. MEROPS: the peptidase database// *Nucleic Acids Res.* V. 38. P. D227-D233
- Siddiqui A.A., Zhou Y., Podesta R.B., Karcz S.B., Tognon C.E., Strejan G.H., Dekaban G.A., and Clarke M.W., 1993. Characterization of Ca²⁺-dependent neutral protease (calpain) from human blood flukes, *Schistosoma mansoni*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1181: 37–44.
- Sokol SB and Kuwabara PE., 2000. Proteolysis in *Caenorhabditis elegans* sex determination: cleavage of TRA-2A by TRA-3. *Genes Dev* 14: 901–906.
- Sorimachi H., Imajoh-Ohmi S., Emori Y., Kawasaki H., Ohno S., Minami Y., and Suzuki K., 1989. Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependent protease distinct from both m- and μ -types. Specific

expression of the mRNA in skeletal muscle. *J Biol Chem* 264: 20106–20111.

Sorimachi H., Ishiura S., and Suzuki K., 1993. A novel tissue-specific calpain species expressed predominantly in the stomach comprises two alternative splicing products with and without Ca²⁺-binding domain. *J. Biol. Chem.* 268: 19476–19482.

Sorimachi H., Ishiura S., and Suzuki K., 1997. Structure and physiological function of calpains. *Biochem. J.* 328: 721–732.

Sorimachi H and Suzuki K., 2001. The structure of calpain. *J Biochem* 129: 653–664.

Strobl S., Fernandez-Catalan C., Braun M., Huber R., Masumoto H., Nakagawa K., Irie A., Sorimachi H., Bourenkow G., Bartunik H., Suzuki K., and Bode W., 2000. The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 588–592.

Suzuki K., 1990. The structure of the calpains and the calpain gene. In: *Intracellular Calcium-Dependent*

Proteolysis, edited by Mellgren R.L. and Murachi T. Boca Raton, FL: CRC, p. 25–35.

Suzuki K., Hata S., Kawabata Y., and Sorimachi H., 2004. Structure, activation, and biology of calpain. *Diabetes* 53 (Suppl 1): S12–S18.

Theopold U., Pintér M., Daffre S., Tryselius Y., Friedrich P., Naessel D.R., and Hultmark D., 1995. Calp A, a *Drosophila* calpain homology specifically expressed in a SC set of nerve, midgut, and blood cells. *Mol. Cell. Biol.* 15: 824–834.

Tompa P., Emori Y., Sorimachi H., Suzuki K., and Friedrich P., 2001. Domain III of calpain is a Ca²⁺-regulated phospholipid-binding domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280: 1333–1339.

Yu X. and Mykles D.L., 2003. Cloning of a muscle-specific calpain from the American lobster *Homarus americanus*: expression associated with muscle atrophy and restoration during moulting. *J. Exp. Biol.* 206(Pt 3): 561–575.

STRUCTURE AND PROPERTIES PECULIARITIES OF INTRACELLULAR CALCIUM-ACTIVATED PROTEASES IN INVERTEBRATE ANIMALS

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

*Institute of Biology, Karelian Research Centre Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russia,
e-mail: nkantserova@yandex.ru*

The presence of intracellular calcium-dependent proteases (calpains) in invertebrates similar with mammalian calpains suggests that this metabolic pathway in protein turnover is conservative. Some

evolutionary-related peculiarities observed in invertebrate calpains concern their structural organization, substrate specificity, activity regulation and biological roles.