

Л. И. КОЛЧИНСКАЯ¹, И. О. ТРИКАШ², В. П. ГУМЕНЮК²,
М. К. МАЛЫШЕВА¹

ВЛИЯНИЕ ЛИПИДОВ НА АКТИВНОСТЬ КАЛЬПАИНА В СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

Поступила 15.12.08

Исследовано влияние липидов на активность нейтральной цистеиновой протеиназы – кальпаина – в субклеточных фракциях головного мозга крыс. Удаление из грубой митохондриальной фракции мозга до 23 % мембранного холестерина не привело к изменению удельной активности кальпаина в этой фракции. Детергенты дигитонин и Тритон X-100 в концентрации 0.3 % повышали активность кальпаина в грубой митохондриальной фракции. Результаты исследования влияния препаратов различных фосфолипидов на активность кальпаина в цитоплазме мозга показали, что только фосфатидилхолин, но не фосфатидилсерин и кардиолипин незначительно увеличивал активность кальпаина (независимо от размера и структуры фосфолипидных везикул). Высказано предположение, что механизмы взаимодействия кальпаина с липидами не универсальны: в нативной клетке и модельных опытах они могут заметно различаться и изменяться в зависимости от условий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: кальпаин, холестерин, фосфолипиды, активация фермента.

ВВЕДЕНИЕ

Кальпаины – семейство широко распространенных нейтральных цистеиновых протеиназ, которые в большинстве случаев представлены двумя основными подгруппами (μ - и m -кальпаины). Для оптимальной активности ферментов, относящихся к этим подгруппам, необходимы соответственно микро- либо миллимолярные концентрации кальция. Результаты многочисленных исследований показали, что кальпаины играют важную роль в опосредовании кальциевых сигналов в клетках различных тканей [1–3]. Субстратами для указанных ферментов являются белки цитоскелета, различные иные ферменты (киназы, фосфатазы, фосфолипазы), белки мембранных рецепторов и транспортеров [4]. Кальпаины обнаруживаются как в цитоплазматической, так и в мембранных клеточных фракциях, однако данные об их количестве и соотношении в таких фракциях противоречивы; по-видимому, эти показатели в разных тканях различны [5–7]. Кальпаины задействованы во многие процессы, проходящие в клетках нервной

ткани в нормальных условиях (структурная и функциональная реорганизация синапсов, обусловленная длительной потенциацией синаптической передачи, регуляция выброса нейротрансмиттеров) [8, 9]. Изменения активности кальпаинов отмечаются и при различных патологиях нервной системы (болезнь Альцгеймера, рассеянный склероз, нейротоксикоз, церебральная ишемия) [2, 10–12]. В последние годы появились работы, посвященные возможному применению ингибиторов кальпаинов для коррекции ряда патологических состояний, в том числе для лечения заболеваний нервной системы [13, 14]. Необходимо, однако, признать, что механизмы действия протеолитических ферментов этой группы все еще недостаточно выяснены.

Известно, что концентрации кальция, необходимые для активации обеих основных форм кальпаина (3–50 и 400 – 800 мкМ для полумаксимальной активации μ - и m -кальпаина соответственно), многократно превышают концентрацию названного иона в цитоплазме клеток даже в моменты максимального повышения данного показателя, например при выбросе нейротрансмиттеров [4, 15]. Учитывая постоянное присутствие в клетках белкового ингибитора кальпаина – кальпастина, можно предположить, что активация кальпаина осуществляется достаточ-

¹ Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, Киев (Украина).

² Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев (Украина).
Эл. почта: luko@biph.kiev.ua (Л. И. Колчинская).

но сложным образом. По-видимому, соответствующий путь должен включать в себя разделение (постоянное или временное) фермента и ингибитора в клетке и либо наличие в последней компартментов с повышенной концентрацией кальция, достаточной для активации фермента, либо временное повышение его сродства к кальцию. Точный молекулярный механизм активации кальпаина до сих пор не ясен.

Первоначально было выдвинуто предположение, что кальпаин обычно находится в цитоплазме в неактивном состоянии и переходит в функционирующее состояние только после развития аутолиза (в результате чего значительно снижается концентрация кальция, необходимая для активации фермента [16]) и (или) связывания кальпаина с клеточными мембранными структурами [15, 17]. Однако в других работах [5, 18], было показано, что кальпаин активен и в растворимом состоянии. m-Кальпаин, выделенный из скелетных мышц, связывается с фосфолипидными везикулами в отсутствие кальция [19], а для μ -кальпаина присоединение к мембранам не приводит к снижению концентрации кальция, необходимой для активации [20]. Высказывается предположение, что связывание кальпаина с мембранами и его активация происходят за счет изменений конформации молекул фермента, благодаря которым гидрофобные участки в активном центре становятся более доступными для взаимодействия с мембранами [20].

При поисках факторов, способных влиять на сродство фермента к кальцию, возникло логичное предположение, что одним из таких факторов являются липиды, входящие в состав клеточных мембран [4, 15]. Однако изучение влияния на активность кальпаина различных фосфолипидов – основных компонентов биологических мембран – до сих пор не привело к однозначным выводам. Если, согласно данным одних авторов, необходимая для активации кальпаина концентрация кальция в присутствии фосфатидилинозитола, фосфатидилхолина и фосфатидилсерина снижалась [21], то в других работах эффект повышения сродства фермента к кальцию наблюдали в присутствии только фосфатидилинозитола [22], а также полифосфоинозитидов [23]. Как показали некоторые авторы, весьма эффективными в этом аспекте могут быть многокомпонентные смеси липидов, в состав которых входят ганглиозиды и фосфатидилинозитол, способные стимулировать активность кальпаина при концентрациях кальция, близких к нормальным внутриклеточным [24]. Недавно появились данные, свидетельствующие о том, что активность кальпаина в клетке регулируется связыванием фосфоинозитидов

с цитоскелетными белками, являющимися субстратами для указанного фермента [25].

Известно, что в структуре биологических мембран присутствуют отдельные нерастворимые в неионных детергентах микродомены, обогащенные холестерином и сфинголипидами, – так называемые рафты («плоты») [26]. Наличие таких доменов представляется очень существенным; вероятно, оно обеспечивает избирательную локализацию в мембране определенных клеточных белков, а также пространственное разделение и регуляцию различных процессов, происходящих в клетке, в том числе процессов клеточной сигнализации, мембранного транспорта и экзоцитоза. Было показано, что m-кальпаин локализован в обогащенных холестерином микродоменах мембран T-клеток [27], в кавеолах мышечных клеток [28]; он появляется в подобных участках мембран при хемотаксисе [29]. В то же время, как было обнаружено [30], кальпаин расщепляет аннексины гладких мышц именно в тех участках плазматической мембраны, где микродомены отсутствуют. Таким образом, сведения о роли мембранного холестерина в функционировании кальпаина, как и данные об активации этого фермента фосфолипидами, весьма противоречивы.

Ранее мы исследовали распределение активности кальпаина в субклеточных фракциях, которые были получены из ткани головного мозга крыс в условиях, близких к существующим в норме в нервных клетках, т. е. без отделения кальпаина от кальпастатина [18]. Было показано, что основная часть (87 %) суммарной ферментативной активности кальпаина выявлялась в цитоплазматической фракции; в то же время заметная активность этого фермента наблюдалась и в исследованных мембранных фракциях (грубой митохондриальной фракции, микросомах и миелине). Наиболее высокая удельная активность кальпаина, которая значительно возросла после его отделения от кальпастатина и подавлялась в присутствии ингибитора кальпаина I, регистрировалась в цитоплазматической фракции. Представляло очевидный интерес выяснить, влияет ли на активность кальпаина в указанной фракции присутствие фосфолипидов в среде для определения этой активности. В настоящей работе мы исследовали также действие детергентов на активность кальпаина и изучали влияние извлечения холестерина из мембран (и, как следствие, разрушения липидных рафтов) на активность кальпаина в мембранной (грубой митохондриальной) фракции из ткани головного мозга крыс.

МЕТОДИКА

Получение субклеточных фракций из ткани головного мозга крыс. Взрослых крыс-самцов декапитировали, выделяли головной мозг и помещали его на лед. Все дальнейшие процедуры проводили при 4 °С. Ткань измельчали скальпелем и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком в растворе А (1 г ткани в 10 мл раствора). В состав раствора входили (в миллимолях на 1 л): сахароза – 320, трис-Cl – 20 (pH 7.4), этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) – 2, дитиотреитол (ДТТ) – 2, фенилметилсульфонилфторид – 0.1.

Гомогенат центрифугировали 10 мин при 750g; осадок удаляли, а надосадочную жидкость (Н1) центрифугировали 20 мин при 12000g. Полученную после этого надосадочную жидкость (Н2) центрифугировали 60 мин при 100000g для получения фракции цитоплазмы. Осадок грубой митохондриальной фракции (О2), полученный после центрифугирования при 12000g, суспендировали в растворе А, получая так называемую мембранную фракцию. Удаление кальпастина и получение очищенного препарата m-кальпаина из растворимой фракции проводили по методу Такеучи и соавт. [5]. Содержание белка в препаратах определяли по методу Лоури [31].

Определение активности кальпаина в субклеточных фракциях. Активность кальпаина определяли, используя в качестве субстрата казеин, меченный флуоресцентной меткой (ФИТЦ). Мечение казеина осуществляли по ранее описанному методу [32], элюируя меченый субстрат с колонки Сефадекс G-50 раствором следующего состава (в миллимолях на 1 л): трис-Cl – 10 (pH 7.0), NaCl – 150. Активность кальпаина в субклеточных фракциях определяли в пробах объемом 100 мкл, содержащих в себе субстратный раствор следующего состава (в миллимолях на 1 л): трис-Cl – 50 (pH 7.4), дитиотреитол – 5, CaCl₂ – 5 (или ЭДТА – 5), а также 0.2 % ФИТЦ-казеина. Реакцию инициировали путем добавления 10–500 мкг белкового препарата и после инкубации при 30 °С (если не указано иначе) останавливали, добавляя в пробу 50 мкл бычьего сывороточного альбумина (5 мг/мл) и 50 мкл охлажденной 12 %-ной трихлоруксусной кислоты. Пробы выдерживали на льду 20 мин, после чего центрифугировали 8 мин при 5000g. 100 мкл надосадочной жидкости, содержащей в себе флуоресцирующие продукты гидролиза субстрата, добавляли к 2 мл 0.2 М трис-Cl (pH 8.5). Интенсивность флуоресценции проб измеряли при длинах волн 490 (возбуждение) и 525 (эмиссия) нм. Актив-

ность кальпаина определяли как кальцийзависимый прирост флуоресценции, который представляет собой разность между величиной флуоресценции пробы, содержащей в себе кальций, и величиной флуоресценции пробы, содержащей в себе ЭДТА.

Получение фосфолипидных везикул (липосом). Растворы фосфолипидов (3 мг фосфатидилхолина, фосфатидилсерина или кардиолипина) в хлороформ-метаноле высушивали в токе азота до полного удаления растворителя. Полученную пленку фосфолипидов суспендировали в 1 мл буферного раствора, содержащего в себе 50 мМ трис-НСl (pH 7.4). Крупные многослойные липосомы различного диаметра получали путем механического встряхивания суспензии фосфолипидов в течение 3 мин, а однослойные липосомы – посредством продавливания фосфолипидной суспензии через поликарбонатный фильтр с размером пор 100 нм.

Извлечение холестерина из мембранной фракции головного мозга крыс. К 100 мкл суспензии грубой митохондриальной фракции О2 (4 мг белка /мл) добавляли раствор метил-β-циклодекстрина до конечной концентрации 15 либо 30 мМ. В контрольную пробу добавляли дистиллированную воду. Пробы инкубировали 30 мин при 37 °С и постоянном перемешивании, затем центрифугировали 5 мин при 3000g; полученный осадок промывали 1 мл раствора, содержащего в себе (в миллимолях на 1 л): сахарозу – 320 и трис-Cl – 10 (pH 7.5). Содержание холестерина в полученном осадке определяли по методу Златкиса и соавт. [33].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

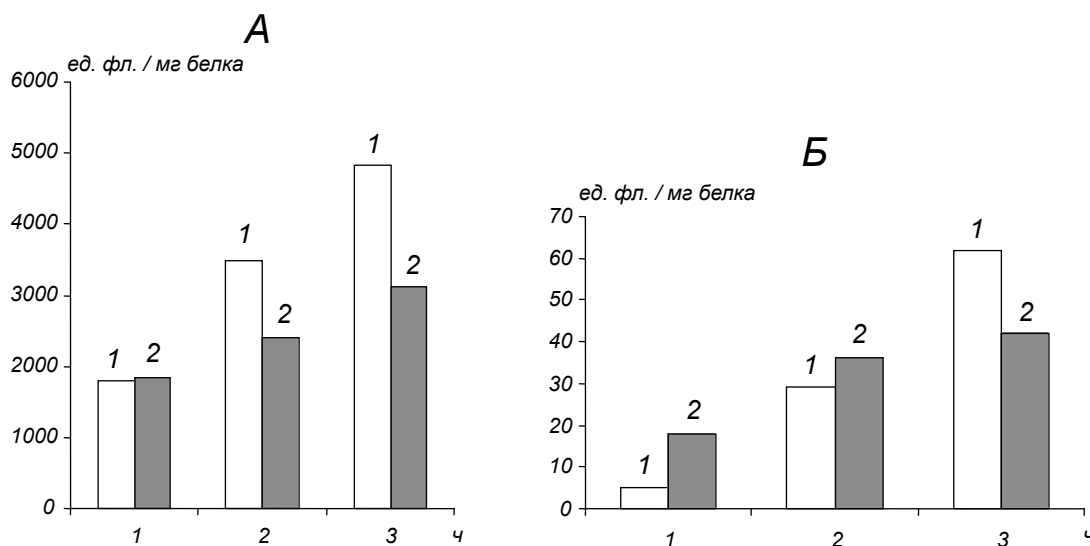
Определение активности кальпаина соответственно расщеплению флуоресцентного субстрата препаратами субклеточных фракций (в которых не проводилось отделения этого фермента от балластных белков и, более того, его отделения от постоянно присутствующего в клетке специфического белкового ингибитора кальпаина – кальпастина) требует длительной (в течение нескольких часов) инкубации фермента с субстратом при наличии в среде кальция в миллимолярных концентрациях. Известно, что такая длительная инкубация кальпаина в присутствии ионов кальция может приводить к инактивации фермента [4]. Исследуя зависимость активности кальпаина от температуры, мы установили, что инкубация при 30 °С в наших условиях является оптимальной. Так, из рисунка, А видно,

что количество образовавшихся флуоресцирующих продуктов расщепления ФИТЦ-казеина препаратами цитоплазмы из клеток головного мозга крыс в течение 1 ч было одинаковым в условиях температур 37 и 30 °С, но в случае более длительной инкубации скорость образования продуктов гидролиза при 37 °С снижалась по сравнению с наблюдаемой при 30 °С. Близкая тенденция обнаруживалась и в процессе определения активности в мембранной фракции из клеток головного мозга крыс (Б). В этих препаратах количество образовавшихся флуоресцирующих продуктов за 1 ч инкубации при 30 °С было меньшим, чем при 37 °С, и практически одинаковым при обеих температурах в условиях инкубации на протяжении 2 ч. В случае инкубации в течение 3 ч количество образовавшихся продуктов флуоресценции при 37 °С оказывалось значительно меньшим, чем при 30 °С. Таким образом, определение активности кальпаина в препаратах субклеточных фракций в условиях длительной инкубации наиболее корректно проводить при температуре 30 °С.

Результаты исследования распределения активности кальпаина в субклеточных фракциях головного мозга крыс показали, что удельная активность кальпаина в растворимой фракции головного мозга почти на два порядка превышает удельную активность этого фермента во всех изученных нами мембранных фракциях головного мозга [18]. Ранее было обнаружено [6], что активность кальпаина в присутствии Тритона X-100 увеличивается только

в нервной ткани и не изменяется во всех остальных исследованных тканях крыс. В наших опытах Тритон X-100 и дигитонин в концентрации 0.3 % не оказывали влияния на активность кальпаина в цитоплазматической фракции головного мозга крыс и заметно повышали данную активность (Тритон X-100 – на 23, а дигитонин – на 20 %) в мембранной фракции. По-видимому, исследованные нами неионные детергенты в относительно небольших количествах не оказывают ингибирующего влияния на фермент (на это указывает отсутствие подавления его активности в цитоплазматической фракции). Возможно, однако, что активный центр молекулы кальпаина в присутствии «мягких» детергентов становится более доступным для субстрата.

Чтобы выяснить роль холестерина в регуляции активности кальпаина, мы использовали такой агент, как метил-β-циклодекстрин (МЦД), который связывает холестерин и экстрагирует его из мембран. Известно, что в результате такого удаления структура микродоменов мембраны нарушается. Это, в свою очередь, приводит к нарушению функционирования мембранных белков [34]. Для удаления холестерина из мембранной фракции головного мозга крыс мы использовали МЦД в концентрациях 15 или 30 мМ. В табл. 1 представлены данные о количестве холестерина и удельной активности кальпаина в мембранной фракции мозга, обработанной упомянутым агентом в различных концентрациях. Видно, что с увеличением концентрации



Влияние температуры на активность кальпаина в цитоплазматической (А) и мембранной (Б) фракциях головного мозга крыс. По оси абсцисс – время определения активности кальпаина, ч; по оси ординат – нормированная интенсивность флуоресценции, ед. фл./мг белка. 1 – при температуре 30, 2 – 37 °С.

Вплив температури на активність кальпаїну в цитоплазматичній (А) та мембранній (Б) фракціях головного мозку щурів.

МЦД количество удаленного холестерина возрастает; соответственно, его концентрация в мембранах снижается. Из этих данных следует, что удаление порядка 23 % мембранного холестерина не влияло на величину удельной активности кальпаина в мембранах нервных клеток; она практически не изменялась по сравнению с соответствующим значением в контрольных препаратах. Таким образом, можно предположить, что нарушение структуры и целостности липидных рафтов не является критичным для активности кальпаина в мембранах нервных окончаний.

Ранее было показано [30], что в гладких мышцах кальпаин локализован в тех участках мембраны, где отсутствуют микродомены, обогащенные холе-

стеринном. В некоторых же других клетках кальпаин обнаруживали только в этих микродоменах [27–29, 35]. Возможно, что локализация кальпаина в обогащенных холестерином микродоменах мембраны не является постоянной; указанная локализация зависит от типа, функции и состояния клетки [29, 36].

Фосфолипиды рассматривают как один из возможных факторов, обеспечивающих активацию кальпаина *in vivo* [4, 15], тем не менее данные о влиянии отдельных фосфолипидов и их смесей на активность фермента *in vitro* немногочисленны и противоречивы [21–24]. Мы изучали воздействие отрицательно заряженных фосфолипидов (кардиолипина и фосфатидилсерина), нейтрального липида фосфатидилхолина, а также их смесей на актив-

Т а б л и ц а 1. Влияние удаления холестерина на активность кальпаина в мембранной (грубой митохондриальной) фракции головного мозга крыс

Т а б л и ц я 1. Вплив видалення холестерину на активність кальпаїну в мембранній (грубій мітохондріальній) фракції головного мозку щурів

Концентрация метил-β-циклодекстрина (МЦД), мМ	Содержание холестерина		Удельная активность кальпаина	
	мкМ/мг белка	% относительно контроля	ед. фл./мг белка/ч	% относительно контроля
0 (контроль)	0.519	100	31.0	100
15	0.440	85	28.3	91
30	0.400	77	32.9	106

П р и м е ч а н и я. Из грубой митохондриальной фракции головного мозга крыс удаляли холестерин путем воздействия МЦД (подробности см. в Методике). Активность кальпаина определяли путем инкубации проб в течение 3 ч при 30 °С. Удельную активность рассчитывали как кальцийзависимый прирост флуоресценции на 1 мг белка за 1 ч инкубации. За 100 % принимали соответственно содержание холестерина и удельную активность кальпаина в пробах, не обработанных МЦД.

Т а б л и ц а 2. Влияние фосфолипидов на активность кальпаина в цитоплазматической фракции головного мозга крыс

Т а б л и ц я 2. Вплив фосфоліпідів на активність кальпаїну в цитоплазматичній фракції головного мозку щурів

Препарат	Концентрация кальция, мМ	Добавленные липид/смесь липидов	Относительная активность кальпаина, %
Кальпаин в цитоплазматической фракции	0.25	–	68
–”–	1.0	–	89
–”–	4.5	–	100
–”–	0.25	фосфатидилхолин	90
–”–	1.0	–“–	113
–”–	4.5	–“–	90
–”–	0.25	кардиолипин	37
–”–	1.0	фосфатидилхолин + кардиолипин	56
–”–	4.5	кардиолипин	87
–”–	0.25	фосфатидилсерин	81
Очищенный m-кальпаин	1.0	–	80
–”–	4.5	–	100
–”–	1.0	фосфатидилхолин	105
–”–	4.5	–“–	80

П р и м е ч а н и я. Пробы инкубировали 2 ч при 30 °С с добавлением соответствующих фосфолипидов (массовое соотношение белок/липид в пробе составляло 1:3) в присутствии кальция в различных концентрациях (в таблице указана концентрация свободного кальция, которую рассчитывали по программе “CaBuf”). За 100 % принимали активность кальпаина в пробе, содержащей в себе 4.5 мМ Ca²⁺_{свобод.} без добавления фосфолипидов.

ность кальпаина во фракции цитоплазмы нервных клеток из головного мозга крыс. Фосфолипиды применяли в виде суспензий многослойных или однослойных (диаметром до 100 нм) липосом.

Результаты наших опытов, представленные в табл. 2, свидетельствуют о том, что активность кальпаина незначительно увеличивалась только в присутствии фосфатидилхолина и в пробах, содержащих в себе кальций в субмаксимальных концентрациях. В присутствии кальция в максимальных количествах, необходимых для действия фермента, фосфатидилхолин обуславливал небольшой ингибирующий эффект. Кардиолипид и фосфатидилсерин не только не приводили к усилению активности кальпаина в цитоплазматической фракции головного мозга крыс, но даже подавляли эту активность. Все наблюдаемые эффекты не зависели от способа получения фосфолипидных везикул и (по предварительным данным) не различались в случаях применения однослойных (до 100 нм) и многослойных крупных липосом. Можно предположить, что в присутствии кальция в субмаксимальных концентрациях происходит взаимодействие фосфатидилхолиновых липосом с гидрофобной частью белковой молекулы кальпаина, приводящее к его активации. Такое взаимодействие может быть очень существенным для активации кальпаина в условиях нативных клеток [15, 20].

Используя ионообменную хроматографию, можно выделить фракции, содержащие в себе преимущественно μ -кальпаин и кальпаастатин в среде 0.15 М КСl либо m -кальпаин в среде 0.3 М КСl [5]. Ранее мы показали [18], что такое разделение увеличивает активность кальпаина в цитоплазматической фракции нервных клеток в несколько раз. В настоящей работе выяснилось, что в очищенных препаратах m -кальпаина из всех исследованных фосфолипидов только фосфатидилхолин очень незначительно увеличивал активность фермента при субмаксимальных концентрациях кальция (табл. 2). Другие фосфолипиды (данные не иллюстрируются) оказывали на активность m -кальпаина действие, аналогичное описанному для препаратов цитоплазмы.

Таким образом, результаты наших опытов не подтверждают высказанного ранее мнения, согласно которому отрицательно заряженные фосфолипиды являются наиболее эффективными активаторами кальпаина [22, 23]. Вместе с тем есть основания полагать, что активация кальпаина фосфолипидами *in vitro* может осуществляться по-разному – в зависимости от расщепляемого субстрата [37]. В

настоящее время представляется все более вероятным, что широкая распространенность и многообразие функций этого фермента связаны с наличием разнообразных конкретных механизмов его активации. Данные механизмы, скорее всего, не являются универсальными и зависят как от типа ткани, так и от локализации кальпаина в той или иной субклеточной структуре, реализующей определенную функцию в клетке.

Л. И. Колчинська¹, И. О. Трикаш², В. П. Гуменюк²,
М. К. Малышева¹

ВПЛИВ ЛІПІДІВ НА АКТИВНІСТЬ КАЛЬПАЇНУ В СУБКЛІТИННИХ ФРАКЦІЯХ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЦУРІВ

¹ Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ (Україна).

² Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ (Україна).

Резюме

Досліджено вплив ліпідів на активність нейтральної цистеїнової протеїнази кальпаїну в субклітинних фракціях головного мозку щурів. Видалення з грубої мітохондріальної фракції мозку до 23 % мембранного холестерину не призводило до зміни питомої активності кальпаїну в цій фракції. Детергенти дигітонін та Тритон Х-100 у концентрації 0.3 % підвищували активність кальпаїну в грубій мітохондріальній фракції. Результати дослідження впливу препаратів різних фосфоліпідів на активність кальпаїну в цитоплазмі мозку показали, що тільки фосфатидилхолін, але не фосфатидилсерін і кардіоліпін незначно підвищував активність кальпаїну (незалежно від розміру та структури фосфоліпідних везикул). Висловлено припущення, що механізми взаємодії кальпаїну з ліпідами не є універсальними; у нативній клітині та модельних дослідах вони можуть помітно розрізнятися і змінюються залежно від умов.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. G. Lynch and M. Baudry, "The biochemistry of memory: a new and specific hypothesis," *Science*, **224**, No. 4653, 1057-1063 (1984).
2. Т. Кастрикина, М. Малышева, "Кальпаин – один из медиаторов кальциевого сигнала в клетке", *Нейрофизиология/Neurophysiology*, **32**, № 2, 142-156 (2000).
3. L. Casaletti, S. Tauhata, J. Moreira, and R. Larson, "Myosin-Va proteolysis by Ca²⁺/calpain in depolarized nerve endings from rat brain," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **308**, No. 1, 159-164 (2003).
4. D. Goll, V. Thompson, H. Li, et al., "The calpain system," *Physiol. Rev.*, **83**, No. 3, 731-801 (2003).

5. K. Takeuchi, K. Saito, and R. Nixon, "Immunoassay and activity of calcium-activated neutral proteinase (mCANP): distribution in soluble and membrane-associated fractions in human and mouse brain," *J. Neurochem.*, **58**, No. 4, 1526-1532 (1992).
6. N. Banik, A. Chakrabarti, and E. Hogan, "Effects of detergents on Ca-activated neural proteinase (calpain) in neural and non-neural tissue: a comparative study," *Neurochem. Res.*, **17**, No. 8, 797-802 (1992).
7. F. Zalewska, B. Zablocka, T. Saido, et al., "Dual response of calpain to rat brain postdecapitative ischemia," *Mol. Chem. Neuropathol.*, **33**, No. 3, 185-197 (1998).
8. G. Broutman and M. Baudry, "Involvement of the secretory pathway for AMPA receptors in NMDA-induced potentiation in hippocampus," *J. Neurosci.*, **21**, No. 1, 27-34 (2001).
9. U. Zimmerman, S. Malek, L. Liu, and H. Li, "Proteolysis of synaptobrevin, syntaxin, and SNAP-25 in alveolar epithelial type II cells," *IUBMB Life*, **48**, No. 4, 453-458 (1999).
10. K. Blomgren, A. McRae, A. Elmerd, et al., "The calpain proteolytic system in neonatal hypoxic ischemia," *Ann. New York Acad. Sci.*, **825**, 104-119 (1997).
11. G. DiRosa, T. Odrijin, R. Nixon, and O. Arancio, "Calpain inhibitors: a treatment for Alzheimer's disease," *J. Mol. Neurosci.*, **19**, Nos. 1/2, 135-141 (2002).
12. H. Wu, K. Tomizawa, Y. Oda, et al., "Critical role of calpain-mediated cleavage of calcineurin in excitotoxic neurodegeneration," *J. Biol. Chem.*, **279**, No. 6, 4929-4940 (2004).
13. K. Wang, S. Lamer, G. Robinson, and R. Hayes, "Neuroprotection targets after traumatic brain injury," *Current Opin. Neurol.*, **19**, No. 6, 514-519 (2006).
14. R. Sinjoanu, S. Kleinschmidt, R. Bitner, et al., "The novel calpain inhibitor A-705253 potently inhibits oligomeric betaamyloid-induced dynamin 1 and tau cleavage in hippocampal neurons," *Neurochem. Int.*, **53**, Nos. 3/4, 79-88 (2008).
15. M. Molinari and E. Carafoli, "Calpain: a cytosolic proteinase active at the membranes," *J. Membrane Biol.*, **156**, No. 1, 1-8 (1997).
16. T. Yoschizawa, H. Sorimachi, S. Tomioka, et al., "Calpain dissociates into subunits in the presence of calcium ions," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **208**, No. 1, 376-383 (1995).
17. H. Kawasaki and S. Kawashima, "Regulation of the calpain-calpastatin system by membranes," *Mol. Membrane Biol.*, **13**, No. 4, 217-224 (1996).
18. Л. Колчинская, М. Малышева, "Активность кальпаина в субклеточных фракциях головного мозга крыс", *Нейрофизиология/Neurophysiology*, **36**, № 4, 265-271 (2004).
19. C. Garret, P. Cottin, J. Dufourcq, and A. Ducastaing, "Evidence for a Ca²⁺-independent association between calpain II and phospholipids vesicles," *FEBS Lett.*, **227**, No. 2, 209-214 (1988).
20. A. Fernandez-Montalvan, I. Assflag-Machleidt, D. Pfeiler, et al., "mu-Calpain binds to lipid bilayers via the exposed hydrophobic surface of its Ca²⁺-activated conformation," *J. Biol. Chem.*, **387**, No. 5, 617-627 (2006).
21. S. Pontremoli, E. Melloni, B. Sparatore, et al., "Role of phospholipids in the activation of the Ca²⁺-dependent neutral proteinase of human erythrocytes," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **129**, No. 2, 389-395 (1985).
22. S. Coolican and D. Hathaway, "Effect of L-alpha-phosphatidylinositol on a vascular smooth muscle Ca²⁺-dependent protease. Reduction of the Ca²⁺ requirement for autolysis," *J. Biol. Chem.*, **259**, No. 19, 11627-11630 (1984).
23. T. Saido, M. Shibata, T. Takenawa, et al., "Positive regulation of mu-calpain action by polyphosphoinositides," *J. Biol. Chem.*, **267**, No. 34, 24585-24590 (1992).
24. A. Chakrabarti, S. Dasgupta, R. Gadshen, et al., "Regulation of brain m-calpain Ca²⁺ sensitivity by mixtures of membrane lipids: activation by intracellular Ca²⁺ level," *J. Neurosci. Res.*, **44**, No. 4, 374-380 (1996).
25. C. Sprague, T. Traley, H. Jang, et al., "Phosphoinositide binding to the substrate regulates susceptibility to proteolysis by calpain," *J. Biol. Chem.*, **283**, No. 14, 9217-9223 (2008).
26. D. Brown and E. London, "Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts," *J. Biol. Chem.*, **275**, No. 23, 17221-17224 (2000).
27. L. Morford, K. Forrest, B. Logan, et al., "Calpain II colocalizes with detergent-insoluble rafts on human and Jurkat T-cells," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **295**, No. 2, 540-546 (2002).
28. S. Goudenege, E. Darqelos, S. Claverol, et al., "Comparative proteomic analysis of myotube caveolae after milli-calpain deregulation," *Proteomics*, **7**, No. 18, 3289-3298 (2007).
29. P. Nuzzi, M. Senetar, and A. Huttenlocher, "Asymmetric localization of calpain 2 during neutrophil chemotaxis," *Mol. Biol. Cell*, **18**, No. 3, 795-805 (2007).
30. E. Babiychuk, K. Monastyrskaya, F. Burkhard, et al., "Modulating signaling events in smooth muscle: cleavage of annexin 2 abolishes its binding to lipid rafts," *FASEB J.*, **16**, No. 10, 1177-1184 (2002).
31. O. Lowry, N. Rosenberg, A. Farr, et al., "Protein measurement with the Folin phenol reagent," *J. Biol. Chem.*, **193**, No. 1, 265-275 (1951).
32. H. Maeda, "Assay of proteolytic enzymes by the fluorescence polarization technique," *Anal. Biochem.*, **92**, No. 1, 222-227 (1979).
33. A. Zlatkis, B. Zak, and A. Boyle, "A new method for the direct determination of serum cholesterol," *J. Lab. Clin. Med.*, **41**, No. 3, 486-492 (1953).
34. P. Yancey, W. Rodriguez, E. Kilsdonk, et al., "Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. Demonstration of kinetic pools and mechanism of efflux," *J. Biol. Chem.*, **271**, No. 27, 16026-16034 (1996).
35. J. Hood, B. Logan, P. Sinai, et al., "Association of the calpain/calpastatin network with subcellular organelles," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **310**, No. 4, 1200-1212 (2003).
36. K. Haim, I. Ben-Aharon, and R. Shalgi, "Expression and immunolocalization of the calpain-calpastatin system during parthenogenetic activation and fertilization in the rat egg," *Reproduction*, **131**, No. 1, 35-43 (2006).
37. A. Kishimoto, N. Kajikawa, M. Shiota, and Y. Nishizuka, "Proteolytic activation of calcium-activated, phospholipids-dependent protein kinase by calcium-dependent neutral protease," *J. Biol. Chem.*, **258**, No. 2, 1156-1164 (1983).