

УДК 577.352

А.В.Шалыгин (5 курс, каф. БФ), Е.В.Казначеева, д.б.н., зав. лаб. ИККМ (ИЦ РАН)

## РОЛЬ АДАПТЕРНЫХ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА НОМЕР В РЕГУЛЯЦИИ КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ В КЛЕТКАХ ЭПИДЕРМОИДНОЙ КАРЦИНОМЫ ЧЕЛОВЕКА

Кальциевый сигнал является ответом на внеклеточную стимуляцию и регулирует множество внутриклеточных процессов. Увеличение концентрации ионов кальция в цитозоле – кальциевый сигнал – может происходить двумя путями: либо за счет выброса кальция из внутриклеточных депо, либо за счет входа кальция через плазматическую мембрану в клетку.

Активация рецептора, связанного с фосфолипазой С (PLC) приводит к гидролизу фосфатидилинозитол 4,5-бисфосфата ( $PIP_2$ ) с образованием мембраносвязанного диацилглицерина и водорастворимого инозитол 1,4,5-трисфосфата ( $IP_3$ ). Рецептор  $IP_3$  ( $IP_3R$ ) – это катионный канал, который находится в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР), являющимся кальциевым депо клетки. После связывания  $IP_3$  с  $IP_3R$  канал открывается, и ионы кальция выходят из ЭР в цитозоль. Затем сигнал об опустошении  $Ca^{2+}$  депо передается к кальциевым каналам плазматической мембраны (ПМ), и активируется вход кальция из внеклеточной среды в клетку. В клетках эпидермоидной карциномы человека A431 для объяснения механизма передачи этого сигнала к кальциевым каналам ПМ с проводимостью 1,2 пСм (каналов  $I_{min}$ ) [1] была предложена модель конформационного сопряжения, и показано, что существует прямое белок-белковое взаимодействие PLC/ $PIP_2$ / $IP_3R$ -  $I_{min}$  [2]. Понижение концентрации кальция в  $Ca^{2+}$ -депо каким-то образом изменяет конформацию  $IP_3R$ , и посредством белок-белкового взаимодействия передается сигнал к открыванию канала  $I_{min}$ , в результате активируется вход кальция в клетку.

Столь близкая локализация элементов системы депо-управляемого входа возможна благодаря существованию адаптерных белков. Эти белки, помимо связывания с рецепторами и ионными каналами, взаимодействуют с белками цитоскелета и друг с другом. Белки семейства Номег являются адаптерными белками. Впервые белки семейства Номег были описаны как белки локализирующие  $IP_3R$  и метаболитные глутаматные рецепторы (mGluR) в нейронах [3]. На N конце белков Номег находится EVH домен, который узнает аминокислотную последовательность PPXXF (пролин, пролин, затем две любые аминокислоты и фенилаланин). EVH домен позволяет Номег белкам взаимодействовать с другими белками. На C конце у ряда белков Номег есть последовательность, благодаря которой они могут взаимодействовать друг с другом и олигомеризоваться. По наличию этой C-концевой последовательности белки Номег разделяют на два подсемейства: ее содержат "длинные" белки Номег, а в так называемых "коротких" белках Номег она отсутствует. Белок Номег 1a (Н1a) относится к "коротким" белкам и, как уже было сказано, не способен олигомеризоваться. В нейрональных клетках белки семейства Номег играют важную роль в системе  $Ca^{2+}$  гомеостаза, при этом они не только локализуют элементы этой системы, но и регулируют активность mGluR. Недавно были получены данные об участии белков семейства Номег в депо-управляемом входе кальция в клетках почечного эпителия эмбрионов человека [4].

Работа посвящена изучению роли белков семейства Номег в регуляции каналов  $I_{min}$  в клетках A431. Так как в структуре  $IP_3R$  есть аминокислотная последовательность PPXXF, то он является мишенью для взаимодействия с белками Номег. Мы предположили, что для предотвращения спонтанной активации каналов  $I_{min}$  клеток A431 требуются олигомерные комплексы длинных белков Номег. Для проверки этой гипотезы использовали короткий

белок H1a, добавленный к цитоплазматической стороне ПМ, где он должен был вытеснить длинные белки Homer. Поскольку белок H1a сам не способен образовывать олигомеры, то отсутствие олигомерных комплексов должно было привести к активации  $I_{\min}$  каналов в отсутствие агониста.

Белки GST-Homer 1a экспрессировали в клетках E.coli BL21, затем клетки разрушали ультразвуком. Лизат клеток инкубировали с глутатион сефарозными гранулами, которые затем промывали. Белок GST-Homer 1a элюировали буфером, содержащим глутатион. Полученный супернатант диализировали, чтобы избавиться от глутатиона. Качество очистки проверяли с помощью электрофореза и иммуноблоттинга с использованием поликлональных антител к GST. При окрашивании полученного геля раствором Кумасси видно, что белок GST-Homer 1a выделяется с небольшим количеством продуктов протеолиза. Основной полосе соответствовала молекулярная масса 48700 Дальтон, именно эта полоса окрашивалась антителами к GST. Данный метод выделения позволил получить 0,5 мг белка GST-Homer 1a из 100 мл бактериальной культуры.

В опытах использован метод локальной фиксации потенциала на мембране (patch-clamp method) в конфигурации, при которой регистрируются токи через изолированный фрагмент мембраны клетки, обращенный внутриклеточной поверхностью в раствор экспериментальной камеры (inside-out configuration). Добавление 200 нМ GST-Homer 1a в раствор, омывающий цитоплазматическую сторону мембранного фрагмента, в 22 из 36 экспериментов приводило к появлению активности каналов в отсутствие агониста. Активация каналов наблюдалась не мгновенно, а с задержкой – через  $150 \pm 70$  секунд. Проводимость каналов составила 1,2 пСм. Потенциал реверсии более 50 мВ указывает на высокую селективность канала для двухвалентных катионов относительно калия. Вольтамперная характеристика зарегистрированных каналов совпадала с вольтамперной характеристикой каналов  $I_{\min}$ . Поэтому можно утверждать, что белок GST-Homer 1a вызывает активацию каналов  $I_{\min}$  в клетках A431. Последующее добавление  $IP_3$  к внутренней стороне ПМ не вызывало дальнейшего увеличения активности каналов  $I_{\min}$ .

Активация каналов входа кальция в клетках A431 происходит путем прямого белок-белкового взаимодействия канала ПМ  $I_{\min}$  с  $IP_3R$  ЭР. Можно предположить следующий механизм участия белков Homer в регуляции каналов  $I_{\min}$ . В неактивных клетках существует олигомерный комплекс длинных белков Homer, который является своеобразной "распоркой" между  $IP_3R$  и каналом  $I_{\min}$ . После активации клеток этот комплекс диссоциирует, что приводит к сближению  $IP_3R$  с каналом  $I_{\min}$ , обеспечивая им возможность прямого белок-белкового взаимодействия, что приводит к активации входа кальция в клетку.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 04-04-49057, 04-04-49053), программы исследований ведущих научных школ (проект НШ-2178.2003.4), программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Kiselyov K.I., Semyonova S.B., Mamin A.G., Mozhayeva G.N.. Pflugers Arch., v.437, p.305 (1999).
2. Kaznacheeva E., Zubov A., Gusev K., Bezprozvanny I., Mozhayeva G.. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v.98, p.148 (2001).
3. Brakeman P. R., Lanahan A. A., O'Brien R., Roche K., Barnes C. A., Huganir R. L., Worley P. F. Nature 386, p.284 (1997).
4. Николаев А.В., Скопин А.Ю., Казначеева Е.В.. Биологические мембраны. Т. 21(6), с.451 (2004).