

УДК 577.352.465

Регуляция депо-управляемых кальциевых каналов белками семейства Homer в клетках A431

А. В. Шалыгин¹, М. А. Рязанцева¹, Л. Н. Глушанкова¹, И. Б. Безпрозванный², Г. Н. Можяева¹, Е. В. Казначеева^{1*}

¹ Учреждение Российской академии наук Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий просп., 4, Россия

² Юго-Западный медицинский центр Техасского университета, 75235, Даллас, США

*E-mail: evkzn@hotmail.com

Поступила в редакцию 29.08.2010 г.

РЕФЕРАТ Адаптерные белки семейства Homer играют важную роль в кальциевой сигнализации в различных типах клеток. В данной работе в экспериментах по регистрации одиночных каналов на изолированных фрагментах плазматической мембраны (inside-out) разобщение белков Homer с их белками-мишенями специфически активировало каналы I_{\min} , но не каналы I_{\max} . В аналогичных условиях инозитол-1,4,5-трисфосфат может активировать оба типа каналов. Короткие (1a) и длинные (1c) изоформы белков Homer по-разному влияют на каналы I_{\min} . Белок Homer 1a, в отличие от белка Homer 1c, активировал каналы I_{\min} . Таким образом, нами показано, что в клетках A431 депо-управляемые каналы I_{\min} регулируются белками Homer.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА депо-управляемые каналы, Homer, A431, IP_3R , кальциевая сигнализация.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ SOC – депо-управляемые каналы (store-operated channels); mGluR – метаботропный глутаматный рецептор; IP_3 – инозитол-1,4,5-трисфосфат; IP_3R – рецептор инозитол-1,4,5-трисфосфата; RyR – рианодинновый рецептор; UTP – уридинтрифосфат; GST – глутатион-S-трансфераза.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время большое внимание уделяется исследованиям кальциевой сигнализации в электроневоозбудимых клетках, так как изменения концентрации Ca^{2+} в цитоплазме регулируют огромное количество внутриклеточных процессов. Концентрация Ca^{2+} в цитоплазме может увеличиться как за счет выброса Ca^{2+} из внутриклеточных кальциевых депо, так и за счет входа Ca^{2+} из внеклеточной среды. В электроневоозбудимых клетках вход Ca^{2+} в основном происходит через депо-управляемые каналы (store-operated channels, SOC) [1]. Депо-управляемые каналы активируются в ответ на опустошение кальциевых депо. В разных тканях были описаны депо-управляемые каналы с различными биофизическими характеристиками, что предполагает различный молекулярный состав таких каналов [1]. Несмотря на то что основные белки, участвующие в депо-управляемом входе Ca^{2+} , известны, непонятным остается механизм колокализации этих белков.

В нервных клетках описаны адаптерные белки семейства Homer, которые связывают в единый макромолекулярный комплекс метаботропный глутаматный рецептор (mGluR) плазматической мембраны с

рецептором инозитол-1,4,5-трисфосфата (IP_3R) эндоплазматического ретикулума [2]. Позже было показано, что Homer может взаимодействовать с белками TRPC [3, 4], кальциевой АТФазой, рианодинновым рецептором (RyR) и другими белками [5]. Более того, в нервных клетках адаптерные белки Homer и Shank образуют сетеподобную структуру, которая организует постсинаптические белки [6]. На N-конце белков Homer расположен домен EVH1, позволяющий им узнавать свои мишени, а именно аминокислотную последовательность PPXXF (пролин, пролин, две любые аминокислоты, фенилаланин). Существуют длинные и короткие изоформы белков Homer (рис. 1A). Длинная изоформа на C-конце имеет домен coil-coiled, позволяющий образовывать олигомеры. У короткой изоформы, образующейся при альтернативном сплайсинге, этот домен отсутствует [5]. Длинные изоформы образуют тетрамеры с параллельной укладкой C-концов и четырьмя доменами EVH1; такая структура позволяет им колокализовать белки кальциевой сигнализации [7]. Поскольку короткие изоформы не могут олигомеризоваться, то они являются негативными регуляторами функции длинных Homer. Также было показано, что Homer не только

регулирует колокализацию белков, но и может модулировать активность mGluR [8], ионных каналов RyR [9] и TRPC [3, 4].

Было выдвинуто предположение, что белки Homer могут участвовать и в регуляции SOC. Предыдущие исследования, подтверждающие эту гипотезу, проводились с помощью техники patch clamp в конфигурации whole-cell или флуоресцентных измерений внутриклеточной концентрации кальция [3, 4]. Однако эти методы позволяют оценить лишь суммарный вход кальция в клетку. Поскольку в клетках сосуществуют различные типы депо-управляемых кальциевых каналов, то оставалось неизвестным, какие конкретно типы депо-управляемых каналов регулируются белками семейства Homer. Цель настоящей работы заключалась в исследовании роли белков семейства Homer в регуляции депо-управляемых кальциевых каналов в клетках A431.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клетки

Клетки эпидермоидной карциномы человека A431 (из коллекции клеточных культур Института цитологии РАН) культивировали в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотиков (100 мкг/мл пенициллина, 100 ед./мл стрептомицина). За 2–4 сут до начала эксперимента клетки высевали на фрагменты покровных стекол (3 × 3 мм).

Материалы

Для культивирования клеток использовали среду DMEM (ICN), сыворотку крови эмбрионов телят (FCS, GIBCO BRL, США), сыворотку крови эмбрионов крупного рогатого скота (FBS, GIBCO BRL, США), генетицин G-418 (Geneticin, GIBCO BRL, США). В работе также применяли глутатион-сефарозу (Pharmacia, Швеция); 1,5-изопропилтио-β-D-галактозид (1,5 isopropylthio-β-D galactoside, IPTG, Pharmacia, Швеция); инозитол-1,4,5-трисфосфат (IP₃) (LC Laboratories, США); уридинтрифосфат (UTP, Calbiochem, Германия); HEPES, Тритон X-100 (Sigma, США), EGTA (Fluka, Швейцария); антитела к GST (Sigma, США), вторичные антитела (кроличьи и мышиные) (Sigma, США); антитела к Homer 1bc (Santa Cruz, США). Поликлональные антитела (pAb) к IP₃R первого типа T443 были описаны ранее [10]. Синтез пептидов РРККFR и РРККRR был заказан в фирме «Диафарм» (Россия).

Метод локальной фиксации потенциала (patch clamp)

Во всех экспериментах потенциал внеклеточного раствора принимали за нулевой.

В конфигурации inside-out внутриклеточный раствор (камера) содержал (в mM): 140 К-глутамат, 5 NaCl, 1 MgCl₂, 10 HEPES-K, pH 7.4, 2 EGTA-K и 1.13 CaCl₂ (pCa 7). Раствор пипетки содержал (в mM): 105 BaCl₂, 10 Tris-HCl (pH 7.3). Присутствие ионов Ba²⁺ способствовало предотвращению активации кальцийзависимых и блокированию потенциалзависимых калиевых каналов. Электрическое сопротивление заполненных раствором пипеток составляло 8–20 МОм.

В конфигурации whole-cell внутривнутриклеточный раствор содержал (в mM): 145 NMDG аспартата, 10 Cs-EGTA, 10 Cs-HEPES, pH 7.3, 1.5 MgCl₂ и 4.5 CaCl₂ (pCa 7.0). Внеклеточный раствор содержал (в mM): 140 NMDG аспартата, 10 BaCl₂, 10 Cs-HEPES, pH 7.3. Для конфигурации whole-cell вытягивались пипетки, сопротивление которых после оплавления составляло 3–5 МОм. Во всех опытах whole-cell на мембране поддерживался потенциал, равный 0 мВ. С периодом в 5 с управляющий потенциал менялся по следующей схеме. Сначала подавался потенциал -100 мВ в течение 60 мс, затем следовало пилообразное изменение потенциала (voltage ramp) от -100 до 100 мВ в течение 600 мс, после чего потенциал возвращался к 0 мВ. Токи whole-cell нормализовались относительно емкости клетки, которая отражает клеточный размер. Среднее значение клеточной емкости составляло 21 ± 4 пФ (общее число опытов *n* = 25).

Регистрацию токов проводили с помощью усилителя Axopatch 200B (Axon Instruments, США). Сигнал оцифровывали на частоте 5000 Гц с помощью платы АЦП L 305 (L-Card, Россия). Для анализа и представления данных по измерениям токов одиночных каналов низкой проводимости осуществляли дополнительную фильтрацию (80–100 Гц). Амплитуды токов одиночных каналов определяли по записям токов и по амплитудным гистограммам. Для количественной оценки степени активности каналов использовали величину NP_0 , т.е. произведение количества проводящих каналов (*N*) в данном фрагменте записи на величину вероятности открытого состояния (P_0), которая определялась из соотношения $P_0 = I/Ni$, где *I* – среднее значение тока через мембранный фрагмент на данном временном интервале, *i* – амплитуда тока открытого канала.

Для оцифровки и анализа записей использовали программное обеспечение, написанное В.А. Алексеенко, и пакеты программ pClamp 6.0.4, Microcal Origin 6.0, Microsoft Excel.

Электрофорез и иммуноблоттинг (ИБ)

Белковые пробы разделялись с помощью электрофореза в 8% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. Гель либо окрашивали Кумасси, либо

переносили белки из него на мембрану, которую проявляли с помощью специфических антител на интересующие нас белки.

Экспрессия и очистка рекомбинантных белков GST-Homer 1c и GST-Homer 1a

Клетки *Escherichia coli* BL-21(DE3) трансформировали плазмидами pGEX-2T-Homer1A и pGEX-2T-Homer1C (любезно предоставленными М.М. Соловьевым из университета Оксфорда, Великобритания). Экспрессию рекомбинантных белков индуцировали 1 mM IPTG. Затем бактерии разрушали и очищали химерные белки GST-Homer на глутатион-сефарозе. Полученные белки хранили при 4°C. Степень очистки белка проверяли с помощью электрофореза и иммуноблоттинга с использованием поликлональных антител к GST и Homer.

Клеточный лизат

Клетки A431 в чашке диаметром 10 см лизировали в течение 10 мин при 4°C в 1 мл раствора, содержащего 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Тритон X-100, 0.5% NP40, 10% глицерин, 0.5 mM PMSF, с добавлением коктейля ингибиторов протеиназ (PIC, Hoffmann-La Roche AG, Швейцария). Лизат трижды пропускали через шприц, затем центрифугировали с ускорением 22000 g при 4°C в течение 30 мин и отбирали супернатант, который впоследствии использовали в опытах.

Эксперименты pull-down (PD)

К 25 мкл глутатион-сефарозы со связанными на ней химерными белками GST-Homer добавляли лизаты клеток A431 и инкубировали на переворотном шейкере при 4°C в течение 12–24 ч. Реакцию проводили в буфере PBS с 1% Тритоном X-100. В ряде экспериментов инкубацию проводили в присутствии IP_3 . После этого сефарозу промывали 3 раза по 1 мл PBS с 1% Тритоном X-100 (на сефарозе оставался белок GST-Homer и связавшиеся с ним белки). Наличие IP_3R в пробах проверяли методом иммуноблоттинга с использованием поликлональных антител к IP_3R .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разобщение белков Homer с белками-мишенями, вызванное пептидом PPKKFR, активирует вход кальция в клетках A431

Результаты иммуноблоттинга показали, что в клетках A431 экспрессируются длинные изоформы белков Homer (рис. 1Б). Домен EVH1 белков Homer узнает в белках-мишенях аминокислотную последовательность PPKKFR, где X – любая аминокислота (рис. 1А) [2]. Чтобы определить роль адаптерных

белков семейства Homer в регуляции кальциевых рецептор- или депо-управляемых каналов, мы использовали синтетический пептид PPKKFR. Ранее было показано, что аналогичный пептид вызывает диссоциацию комплекса, образованного белком Homer с метаботропным глутаматным рецептором [2].

В контрольных экспериментах мы использовали пептид PPKKRR, где замена фенилаланина на аргинин отменяла узнавание пептида доменом EVH1. Для выяснения роли белков Homer в регуляции входа кальция в клетки A431 мы использовали метод локальной фиксации потенциала в конфигурации whole-cell. Интегральный вход Ca^{2+} , регистрируемый в условиях внутриклеточного диализа PPKKFR- или PPKKRR-содержащими растворами, сравнивали с интегральным депо-управляемым входом кальция, активированным уридинтрифосфатом.

Внутриклеточный диализ раствором, содержащим 1 мкМ PPKKFR, приводил к активации селективного кальциевого тока со средней максимальной амплитудой в 1.3 ± 0.1 пА/пФ ($n = 5$) (рис. 2А). Если раствор в пипетке содержал пептид PPKKRR, ток не развивался ($n = 10$). Последующее добавление 100 мкМ УТР к таким клеткам приводило к развитию тока ($n = 5$) (рис. 2А). Амплитуда тока, вызванного УТР, составля-

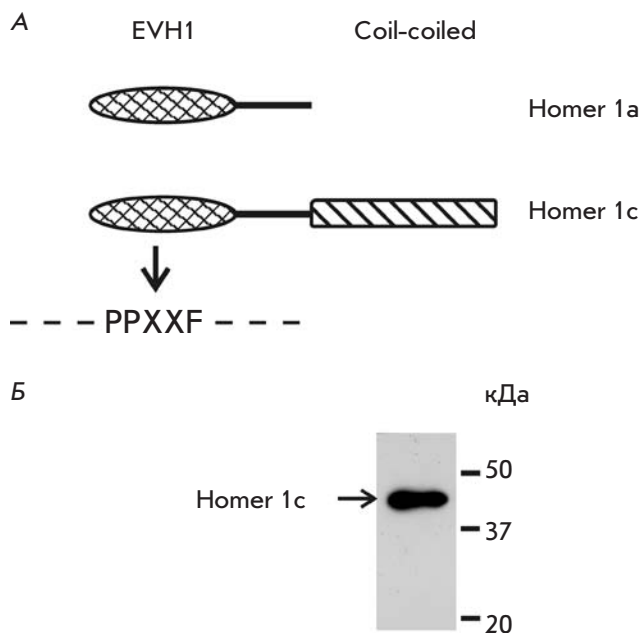


Рис. 1. В клетках A431 экспрессируются длинные изоформы белков семейства Homer. А – Схема структуры белков семейства Homer. Б – Иммуноблоттинг лизата клеток A431, проявленный моноклональными антителами к Homer 1bc. Справа отмечены положения молекулярных маркеров.

ла в среднем 1.8 ± 0.3 пА/пФ, то есть была больше, чем амплитуда тока, активированного пептидом РРККFR (рис. 2Б). Потенциал реверсии токов, активированных пептидом РРККFR, был выше, чем у токов в ответ на УТР. Таким образом, каналы, активированные пептидом РРККFR, были селективнее для ионов Ca^{2+} , чем каналы, активированные УТР (рис. 2Б).

Полученные нами данные согласуются с опубликованными ранее работами других авторов, предположивших взаимосвязь между белками Homer и депо-управляемым входом Ca^{2+} в электронеозбудимые клетки [3, 4].

Ранее в клетках А431 нами было описано несколько типов чувствительных к УТР кальциевых каналов, токи через которые имели разный потенциал реверсии [11]. Мы предположили, что различия в амплиту-

де токов и селективности каналов в ответ на пептид РРККFR и на УТР связаны с тем, что стимуляция клеток УТР активирует несколько типов кальциевых каналов, тогда как пептид РРККFR активирует не все типы каналов.

К отделению белков Homer от белков-мишеней, вызванному пептидом РРККFR, чувствительны каналы I_{\min} , но не каналы I_{\max}

Чтобы исследовать, какие кальциевые каналы, экспрессируемые в клетках А431, ответственны за токи, активируемые диссоциацией комплекса, образованного Homer с белками-мишенями, мы поставили эксперименты в конфигурации inside-out. В экспериментах inside-out на клетках А431 встречаются два типа депо-управляемых каналов: I_{\min} и I_{\max} [11]. Электрофизиологические характеристики этих каналов различны, что позволяет легко идентифицировать их по экспериментальным записям токов. Каналы I_{\min} обладают малой проводимостью (1.2 пСм) и высокой селективностью для двухвалентных катионов. Каналы I_{\max} обладают большей, чем I_{\min} , проводимостью (18 пСм), но при этом их селективность меньше.

В конфигурации inside-out добавление 100 нМ пептида РРККFR с цитоплазматической стороны мембранного фрагмента приводило к активации входящего тока (рис. 3А). Оказалось, что основные электрофизиологические свойства активируемых каналов (кинетика работы, проводимость и потенциал реверсии) совпадают с характеристиками каналов I_{\min} , описанными нами ранее [11–18]. Этот факт позволяет сделать вывод о том, что разъединение белков Homer с белками-мишенями, вызванное пептидом РРККFR, приводит к активации каналов I_{\min} в клетках А431, что согласуется с полученными ранее в нашей лаборатории данными на клетках НЕК293 [12]. Каналы I_{\min} активировались пептидом РРККFR в 43% случаев ($n = 60$) (рис. 3А). Контрольный пептид РРККRR (не приводящий к отделению молекул Homer от мишеней) не активировал каналы ни в одном из 36 опытов, причем последующее добавление РРККFR в том же эксперименте активировало каналы I_{\min} в 42% опытов ($n = 26$) (рис. 3Б). Пептид РРККFR не вызывал активацию каналов I_{\max} – другого типа депо-управляемых каналов в клетках А431 ($n = 60$).

В аналогичных экспериментах добавление 2.5 мкМ инозитол-1,4,5-трисфосфата (IP_3) с цитоплазматической стороны мембраны в экспериментах inside-out активировало каналы I_{\min} в 32% и каналы I_{\max} в 8% опытов ($n = 80$) (рис. 3В, Г), что согласуется с нашими предыдущими результатами [11]. При потенциале в -70 мВ амплитуды токов через каналы I_{\min} составляли 0.18 пА, тогда как амплитуды токов через каналы I_{\max} составляли 1.7 пА (рис. 3А–Г).

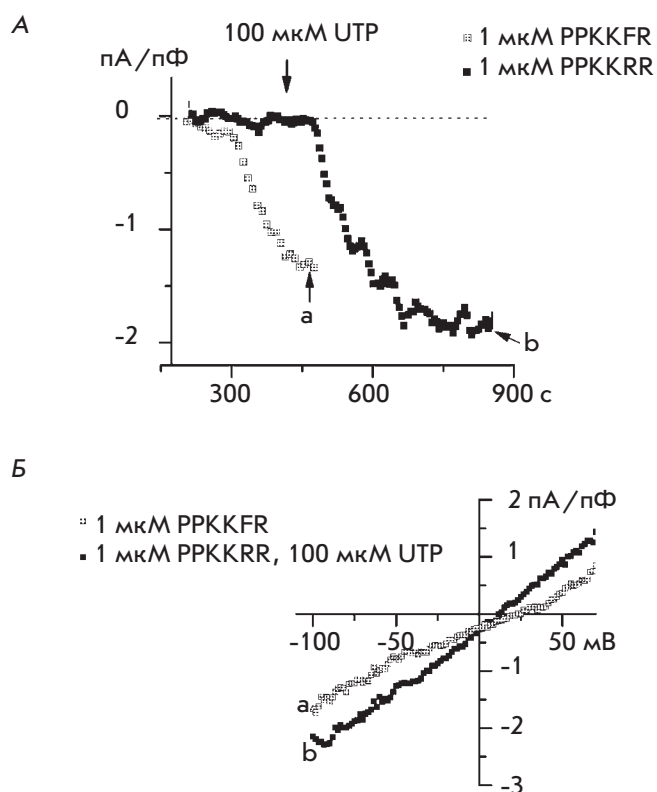


Рис. 2. Записи токов, индуцированных пептидами РРККFR или РРККRR в экспериментах whole-cell. А – Развитие во времени токов при потенциале -80 мВ, в присутствии пептида РРККFR (серые квадраты) или РРККRR (черные квадраты) в регистрирующей пипетке. Момент добавления УТР отмечен стрелкой сверху. Стрелками а и б отмечены максимальные значения токов. Б – Усредненные вольт-амперные характеристики токов, индуцированных пептидом РРККFR или УТР. Усреднение проводилось для максимального значения токов whole-cell, которые отмечены стрелками а и б на панели А.

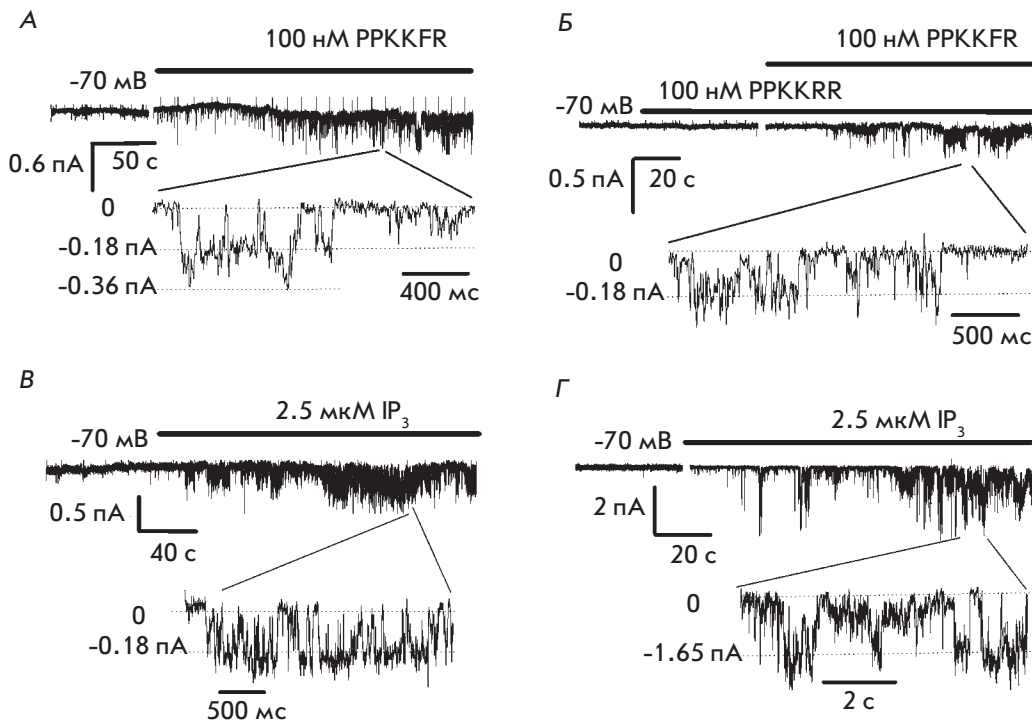


Рис. 3. Пептид PPKKFR активирует каналы I_{\min} , но не I_{\max} . А – Добавление 100 нМ PPKKFR с цитоплазматической стороны мембранного фрагмента (конфигурация inside-out, потенциал на мембране -70 мВ) приводит к активации каналов I_{\min} . Внизу показан фрагмент записи тока в развернутом временном масштабе. Б – Добавление 100 нМ контрольного пептида PPKKRR не активирует токи, тогда как последующее добавление 100 нМ пептида PPKKFR активирует каналы I_{\min} . В, Г – Добавление 2.5 мкМ IP_3 активирует каналы I_{\min} (В) и каналы I_{\max} (Г). Примеры записей токов через одиночные каналы на изолированном фрагменте мембраны при потенциале, равном -70 мВ.

Таким образом, нарушение связи белков Homer с белками-мишенями, вызванное пептидом PPKKFR, приводит к активации каналов I_{\min} , тогда как каналы I_{\max} в клетках A431 не чувствительны к этому пептиду. Мы не знаем, регулируются ли белками Homer два других типа депо-управляемых каналов клеток A431 – I_{NS} и I_{CRAC} , поскольку эти каналы не встречаются (или не различимы) в конфигурации inside-out.

Данные по регистрации активности одиночных каналов хорошо согласуются с результатами экспериментов whole-cell. Поскольку UTP активирует все типы депо-управляемых каналов у клеток A431, а пептид PPKKFR не активирует по крайней мере каналы I_{\max} , это означает, что пептид вызывает частичную активацию кальциевых каналов в конфигурации whole-cell. Этот факт объясняет разницу в величинах зарегистрированных интегральных токов. Поскольку каналы I_{\max} менее селективны, чем каналы I_{\min} , то UTP-вызванный интегральный ток проявляет меньшую селективность.

Каналы I_{\min} активируются изоформой Homer 1a, но не Homer 1c

Среди белков Homer есть две принципиально разные группы [5]. У длинных изоформ белка (таких, как Homer 1c) на С-конце находится домен coil-coiled, который позволяет им образовывать гомоолигомеры. Отсутствие домена coil-coiled у коротких изоформ (таких, как Homer 1a) не позволяет им формировать олигомерные комплексы (рис. 1А). Чтобы исследовать действие коротких и длинных изоформ на активность депо-управляемых каналов в A431, мы использовали

рекомбинантные белки Homer, полученные из бактерий *E. coli*, трансформированных плазмидой GST-Homer. Функциональную активность выделенных таким образом белков Homer 1a и Homer 1c мы проверяли по их способности связывать IP_3R1 в экспериментах pull-down.

Мономерная изоформа белков Homer 1a в концентрации 100 нМ активировала кальциевые каналы в 30% экспериментов inside-out ($n = 101$) (рис. 4А). Вольт-амперная характеристика каналов, активированных белком Homer 1a, совпадала с вольт-амперной характеристикой каналов I_{\min} , активированных UTP, опустошением депо или IP_3 в клетках A431 или НЕК293 [11, 13–18]. Проводимость каналов, активированных белком Homer 1a, составила 1.3 пСм. Длинная изоформа Homer 1c в концентрации 100 нМ не активировала каналы ($n = 58$), в то время как последующее добавление Homer 1a приводило к активации каналов I_{\min} в 27% экспериментов ($n = 44$) (рис. 4Б). Ни Homer 1a, ни Homer 1c не активировали каналы I_{\max} .

Из полученных данных можно сделать вывод о том, что разные изоформы Homer неодинаково действуют на каналы I_{\min} в A431, причем мономерные белки Homer 1a активируют, а длинные изоформы Homer 1c не активируют каналы. Аналогичное действие различные изоформы белков Homer оказывают на mGluR [8] и каналы TRPC [3, 4], но не на каналы RyR [19, 20], которые активируются как длинными, так и короткими изоформами Homer, причем длинные изоформы активируют RyR первого типа даже сильнее, чем короткие изоформы.

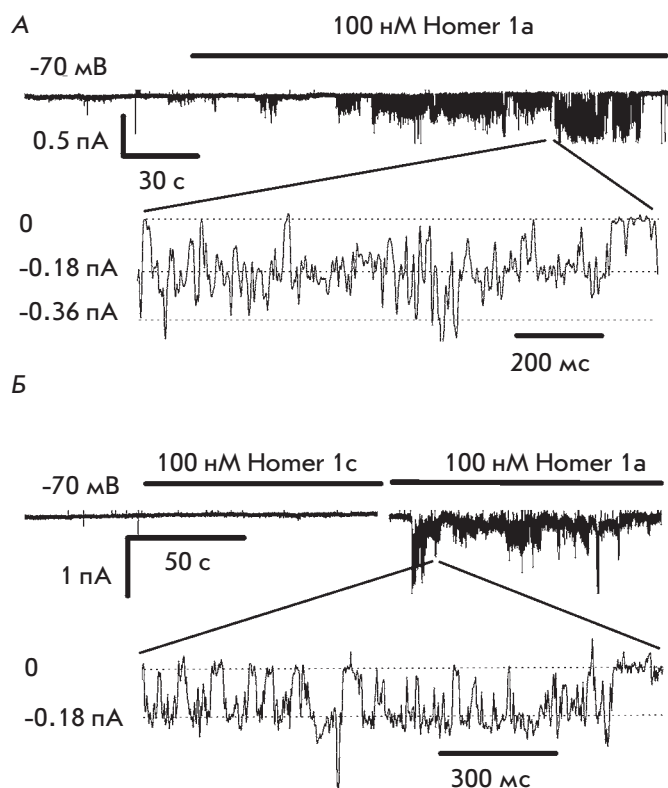


Рис. 4. Белок Homer 1a активирует каналы I_{\min} . А – Добавление 100 нМ белка Homer 1a с цитоплазматической стороны мембранного фрагмента (конфигурация inside-out, потенциал на мембране -70 мВ) приводит к активации каналов I_{\min} . Внизу представлена запись тока в расширенном масштабе времени. Б – 100 нМ Homer 1c не активирует каналы, тогда как последующее добавление 100 нМ Homer 1a активирует каналы I_{\min} . Внизу представлена запись тока в расширенном масштабе времени.

Для TRPC было предложено следующее объяснение действия белков Homer, которое, по-видимому, подходит и для каналов I_{\min} . Поскольку белки Homer 1c могут формировать олигомеры, а короткие изоформы Homer 1a, у которых нет coil-coiled-домена, не могут, было выдвинуто предположение, что олигомерные комплексы блокируют активность каналов, а активирует каналы разобщение с олигомерами Homer [3, 4]. Наши электрофизиологические эксперименты с пептидами и рекомбинантными белками показывают, что не белок Homer 1a сам по себе, а именно нарушение взаимодействия олигомерных комплексов Homer с белками-мишенями необходимо для активации каналов I_{\min} . Можно предположить, что при отделении олигомерных комплексов Homer меняется характер взаимодействия между кальциевым каналом и другими белками, в том числе IP_3R . Такое разобщение может вызываться пептидом PPKKFR, короткой изоформой Homer 1a или IP_3 (см. ниже). Известно, что белки Homer 1 не влияют

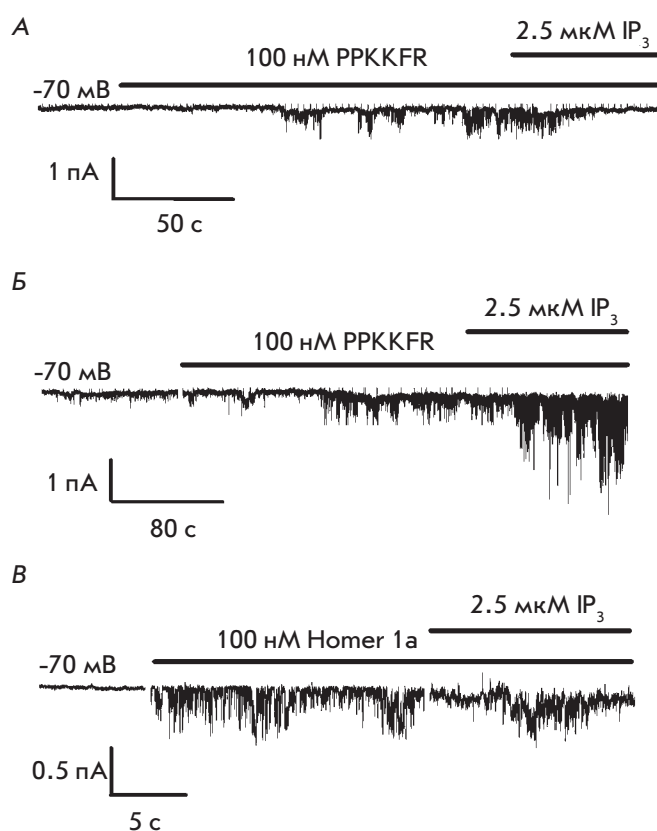


Рис. 5. Отщепление нативных белков Homer и действие IP_3 не аддитивны при активации каналов I_{\min} . А – Активность каналов I_{\min} , вызванная 100 нМ PPKKFR, не увеличивается при последующем добавлении 2.5 мкМ IP_3 . Б – Приложение 100 нМ PPKKFR с цитоплазматической стороны мембраны активирует каналы I_{\min} . Последующее добавление 2.5 мкМ IP_3 вызывает активность каналов I_{\min} . В – Активность каналов I_{\min} , вызванная 100 нМ Homer 1a, не меняется при добавлении 2.5 мкМ IP_3 .

на метаболизм фосфоинозитидов, в частности не вызывают увеличение концентрации IP_3 и не могут вызывать выброса из IP_3 чувствительных кальциевых депо [21]. Таким образом, можно утверждать, что Homer активирует депо-управляемые каналы за счет непосредственного воздействия на канал плазматической мембраны, но не за счет дополнительного выброса из кальциевых депо. Следовательно, несмотря на то, что каналы I_{\min} являются депо-управляемыми в клетках A431, они, по-видимому, могут функционировать и по депо-нечувствительному механизму – в случае, когда они активируются при диссоциации комплекса, образованного белками Homer с белками-мишенями.

Воздействие IP_3 и разобщение нативных белков Homer с белками-мишенями влияют на работу каналов I_{\min} не аддитивно

Поскольку каналы I_{\min} регулируются как IP_3 , так и белками Homer, то возникает вопрос, адди-

тивно ли их действие на эти каналы. Добавление 2.5 мкМ IP_3 к мембранным фрагментам с РРККFR-индуцированной активностью обычно не приводило к дальнейшему увеличению активности каналов (10 из 13 опытов) (рис. 5А). В аналогичных экспериментах с рекомбинантным белком Номер 1а аппликация IP_3 также не изменяла активность каналов (рис. 5В). Однако в нескольких опытах добавление IP_3 активировало каналы I_{max} (рис. 5Б). В экспериментах, где пептид РРККFR или рекомбинантный белок Номер 1а не вызывал активность каналов I_{min} , IP_3 также не активировал каналы. Таким образом, мы показали, что отщепление нативных белков Номер и действие IP_3 не аддитивны. Эти данные позволяют предположить, что каналы I_{min} регулируются IP_3 и белками Номер по одному сигнальному пути.

IP_3 нарушает взаимодействие белков Номер с IP_3R1

В клетках А431 в основном экспрессируется IP_3R первого типа (Глушанкова, неопубликованные данные). Как сообщалось ранее, в этих клетках каналы I_{min} , по-видимому, регулируются конформационным сопряжением с IP_3R первого типа [15, 17]. В нашей работе мы показали, что белки Номер участвуют в регуляции I_{min} . Данные рентгеноструктурного анализа IP_3R указывают на близкое пространственное расположение мотива, узнаваемого белками Номер, и домена, связывающего IP_3 [22]. Также было показано, что IP_3 может вызывать диссоциацию комплекса Номер с IP_3R третьего типа [4]. В наших экспериментах pull-down мы обнаружили, что IP_3 может нарушать взаимодействие IP_3R первого типа с белками Номер 1а или Номер 1с (рис. 6А, Б). Эти результа-

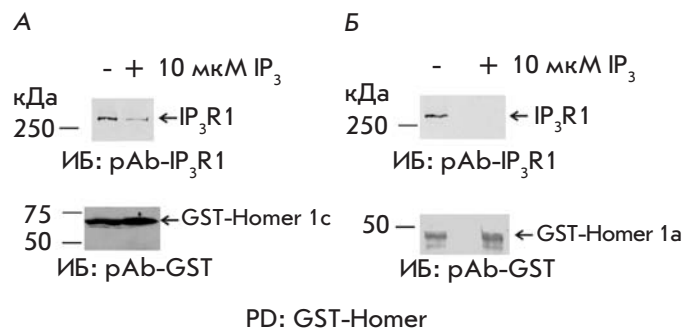


Рис. 6. IP_3 ослабляет взаимодействие белков Номер с IP_3R1 . А, Б – Результаты pull-down-экспериментов. IP_3R1 инкубировался с GST-Homer 1с (А) или GST-Homer 1а (Б) в отсутствие или в присутствии 10 мкМ IP_3 .

ты хорошо согласуются с данными экспериментов inside-out, показывающими, что действие IP_3 и действие белка Номер 1а или пептида РРККFR не аддитивны.

Таким образом, в данной работе впервые исследована регуляция нативных депо-управляемых каналов белками семейства Номер. Полученные результаты расширяют представления о механизмах организации компонентов депо-управляемого входа. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы Министерства образования и науки (ГК 02.740.11.5007) и (ГК П332), Программы Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”, грантов РФФИ (№ 09-04-12035, 10-04-01002, 10-04-00956), гранта “Ведущие научные школы” (НШ-3796.2010.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Parekh A.B., Putney J.W., Jr. // *Physiol. Rev.* 2005. V. 85. № 2. P. 757–810.
- Tu J.C., Xiao B., Yuan J.P., et al. // *Neuron.* 1998. V. 21. P. 717–726.
- Yuan J.P., Kiselyov K., Shin D. M., et al. // *Cell.* 2003. V. 114. P. 777–789.
- Kim J.Y., Zeng W., Kiselyov K., et al. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 43. P. 32540–32549.
- Worley P.F., Zeng W., Huang G., et al. // *Cell Calcium.* 2007. V. 42. № 4–5. P. 363–371.
- Hayashi M.K., Tang C., Verpelli C., et al. // *Cell.* 2009. V. 137. № 1. P. 159–171.
- Hayashi M.K., Ames H.M., Hayashi Y. // *J. Neurosci.* 2006. V. 26. № 33. P. 8492–8501.
- Ango F., Prézeau L., Muller T., et al. // *Nature.* 2001. V. 411. № 6840. P. 962–965.
- Feng W., Tu J., Yang T., et al. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 47. P. 44722–44730.
- Kaznacheeva E., Lupu V.D., Bezprozvanny I. // *J. Gen. Physiol.* 1998. V. 111. P. 847–856.
- Kaznacheeva E., Glushankova L., Bugaj V., et al. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. № 32. P. 23655–23662.
- Nиколаев А.В., Скопин А.Ю., Казначеева Е.В. // *Биол. мембраны.* 2004. Т. 21. № 6. С. 451–457.
- Kiselyov K.I., Mamin A.G., Semyonova S.B., Mozhayeva G.N. // *FEBS Lett.* 1997. V. 407. P. 309–312.
- Kiselyov K.I., Semyonova S.B., Mamin A.G., Mozhayeva G.N. // *Pflügers Arch.* 1999. V. 437. P. 305–314.
- Zubov A.I., Kaznacheeva E.V., Nikolaev A.V., et al. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 25983–25985.
- Kaznacheeva E., Zubov A., Gusev K., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. P. 148–153.
- Gusev K., Glouchankova L., Zubov A., et al. // *J. Gen. Physiol.* 2003. V. 122. P. 81–94.
- Bugaj V., Alexeenko V., Zubov A., et al. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 16790–16797.
- Feng W., Tu J., Pouliquin P., et al. // *Cell Calcium.* 2008. V. 43. № 3. P. 307–314.
- Pouliquin P., Pace S.M., Dulhunty A.F. // *Pflügers Arch.* 2009. V. 458. P. 723–732.
- Shin D.M., Dehoff M.D., Luo X., et al. // *J. Cell Biol.* 2003. V. 162. P. 293–303.
- Bosanac I., Yamazaki H., Matsu-Ura T., et al. // *Mol. Cell.* 2005. V. 17. P. 193–203.