

На правах рукописи

Владимиров Василий Игоревич

**Роль кавеолина-1 в регуляции белков семейства нейрональных
кальциевых сенсоров в фоторецепторной системе**

Специальность 02.00.10 Биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Москва 2020

Работа выполнена в лаборатории фармакокинетики Филиала федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Научный руководитель:

Зинченко Дмитрий Валерьевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, заместитель руководителя лаборатории фармакокинетики Филиала федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

Кочетков Сергей Николаевич, академик РАН, доктор химических наук, профессор, зав. лабораторией молекулярных основ действия физиологически активных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН.

Князев Александр Владимирович, доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник, декан химического факультета Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук

Защита диссертации состоится «28» октября 2020 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН) по адресу: 117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10 и на сайте ИБХ РАН (<http://www.ibch.ru>).

Автореферат разослан « ____ » _____ 2020 г.

Учёный секретарь Диссертационного совета
Доктор физико-математических наук



В.А. Олейников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность

Белки семейства нейрональных кальциевых сенсоров (НКС) принимают участие в сигнальных механизмах, модулирующих самые разные аспекты жизнедеятельности и функционирования нейронов. Будучи высокоспецифичными белками нервной ткани и фоторецепторов сетчатки, НКС детектируют кальциевые сигналы и, в ответ на это, регулируют активность целого ряда внутриклеточных мишеней, среди которых ферменты, ионные каналы, факторы транскрипции и др. НКС ограничено определяются у низших эукариот и беспозвоночных (*S. Cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* и *Drosophila melanogaster*) и наиболее распространены у позвоночных животных, что связано с их особой ролью в развитии и функционировании центральной нервной и зрительной систем. Так, эти белки принимают участие в регуляции роста и выживаемости нейронов, рецепции, нейротрансмиссии и синаптической пластичности. Функциональную активность НКС связывают с механизмами, лежащими в основе обучения и памяти. Нарушение функционирования НКС в том числе, в условиях окислительного стресса приводит к возникновению aberrантных сигнальных каскадов, ассоциированных с развитием дегенеративных заболеваний центральной нервной системы и сетчатки. Таким образом, поиск и исследование внутриклеточных факторов, оказывающих влияние на Ca^{2+} -зависимую сигнальную активность НКС, являются чрезвычайно важными для определения молекулярных механизмов, лежащих в основе нормальной и патологической активности фоторецепторных клеток и нейронов других типов. Одним из таких факторов может быть интегральный белок мембранных рафт-структур кавеолин-1, играющий ключевую роль в организации путей внутриклеточной сигнализации в различных тканях организма. Функция кавеолина-1 в Ca^{2+} -зависимых сигнальных каскадах, регулируемых при участии НКС, до сих пор остается малоизученной.

Степень разработанности темы исследования

Объектом для изучения НКС в рамках настоящей работы является фоторецепторная система, расположенная в наружных сегментах палочек (НСП) сетчатки глаза позвоночных животных, где экспрессируется и функционирует

большинство белков этого семейства. НСП содержат значительное количество мембранных рафт-структур, локализованных в фоторецепторных дисках – плотно упакованных замкнутых фрагментах плазматической мембраны, в которые встроены зрительный рецептор родопсин и на поверхности которых локализуются все процессы, связанные с приемом светового сигнала и его передачей в рамках каскада фототрансдукции. Рафт-структуры представляют собой устойчивые к воздействию неионными детергентами мембранные компартменты, обогащенные холестерином и сфинголипидами, которые содержат белки, относящиеся, в основном, к сигнальным системам клетки. Они вовлечены в такие фундаментальные клеточные процессы, как деление, миграция, апоптоз, экзо- и эндоцитоз и др. Одним из основных белковых компонентов рафт-структур является трансмембранный белок кавеолин-1, который, благодаря наличию специального каркасного (scaffolding) домена, обеспечивает компартментализацию сигнальных белков и, тем самым, регулирует передачу сигналов в различных системах организма. В большинстве случаев кавеолин-1 взаимодействует с белками-мишенями благодаря наличию в их структуре специфического сайта связывания с этим доменом (ArXXXXArXXAr, где Ar – это ароматический аминокислотный остаток, а X – любой аминокислотный остаток). Кавеолин-1 может фосфорилироваться по аминокислотному остатку Y14 под действием c-Src киназы и других тирозинкиназ, что особенно интенсивно происходит в условиях окислительного стресса, и оказывает влияние на его взаимодействие с мишенями. Перед началом настоящей работы в первичной структуре НКС (в частности, рековерина, NCS1 (neuronal calcium sensor-1), GCAP1 (guanylate cyclase activating protein-1) и GCAP2) нами был впервые обнаружен потенциальный сайт связывания кавеолина-1, что указывало на возможность взаимодействия НКС с этим белком.

Целью работы являлось исследование функциональной роли основного белкового компонента мембранных рафт-структур кавеолина-1, как потенциального партнера и модулятора Ca^{2+} -зависимой сигнальной активности НКС фоторецепторной клетки.

Для достижения этой цели в работе решались следующие **задачи**:

1. Исследование возможности совместной локализации и взаимодействия кавеолина-1 с белками НКС в фоторецепторной клетке.
2. Получение очищенных препаратов миристоилированных форм рекомбинантных НКС, а также индивидуальных функциональных доменов кавеолина-1 и определение параметров их взаимодействия. Локализация участков связывания НКС в структуре кавеолина-1.
3. Идентификация сайта связывания кавеолина-1 в структуре НКС.
4. Исследование влияния кавеолина-1 на функциональные свойства НКС.
5. Изучение влияния условий окислительного стресса клеток на взаимодействие НКС с кавеолином-1.

Научная новизна

В работе обнаружена и охарактеризована новая регуляторная функция интегрального белка мембранных рафт-структур кавеолина-1 в отношении белков семейства НКС зрительной системы. В частности, впервые получены данные, указывающие на совместную локализацию кавеолина-1 и белков НКС в фоторецепторных клетках. Несколькими прямыми методами показано наличие взаимодействий между кавеолином-1 и белками семейства НКС, определены кинетические и равновесные параметры этих взаимодействий. Определен сайт связывания кавеолина-1 в структуре НКС. Показано влияние кавеолина-1 на Ca^{2+} -чувствительность (на примере реоверина) и другие функциональные свойства НКС, высказаны предположения о механизмах, лежащих в основе наблюдаемых эффектов. Впервые продемонстрировано влияние мутации кавеолина-1 Y14E, имитирующей фосфорилирование этого белка в условиях окислительного стресса, на его взаимодействие с НКС. Впервые обнаружено образование окисленных форм реоверина в условиях окислительного стресса *in vivo* и охарактеризовано взаимодействие кавеолина-1 с указанными формами. Кроме того, разработана новая методика получения рекомбинантных НКС, включающая разделение миристоилированной и немиристоилированной форм этих белков.

Теоретическая и практическая значимость работы

В ходе выполнения работы установлен новый белковый партнёр НКС – кавеолин-1, связывание с которым, по всей видимости, оказывает влияние на внутриклеточную локализацию, связывание ионов кальция и функциональную активность этих белков. Взаимодействие НКС с кавеолином-1 является чувствительным к повышению редокс-потенциала клеточной среды, что указывает на возможность редокс-регуляции функционирования НКС. Полученные результаты позволяют предположить участие сигнальных комплексов НКС-кавеолин-1 в Ca^{2+} -зависимой регуляции функционирования зрительной системы в норме, а также в условиях окислительного стресса, сопряженного с развитием ряда офтальмологических заболеваний. В целом, результаты работы вносят существенный вклад в понимание механизмов, отвечающих за прием и передачу кальциевых сигналов, являющихся одним из самых распространённых типов внутриклеточной сигнализации. Понимание механизмов aberrантной сигнальной активности комплексов НКС-кавеолин-1 может служить основой для создания новых подходов к терапии нейродегенеративных и нейроофтальмологических заболеваний.

Методология и методы исследования

При выполнении работы использовался широкий спектр биохимических и молекулярно-биологических методов, а также ряд высокотехнологичных инструментальных подходов. Кроме того, в работе проводились эксперименты с использованием клеточных и животных моделей. Очистка и исследование рекомбинантных белков осуществлялись с применением жидкостной хроматографии (ионообменная, гидрофобная, аффинная, металл-хелатная), в том числе, ВЭЖХ (обратно-фазовая и гель-фильтрационная). Применялись методы исследования структуры белков, такие как масс-спектрометрия, спектрофлуориметрия, спектроскопия кругового дихроизма (КД) и метод динамического рассеяния света (ДРС). Использовались современные методы исследования белок-белковых взаимодействий, включая иммунопреципитацию на аффинном сорбенте, изотермическую калориметрию титрования (ИКТ), биосенсорный подход на основе явления поверхностного плазмонного резонанса

(ППР), а также методы молекулярного моделирования и докинга. Кроме того, в работе использовались методы измерения функциональной активности белков с применением радиоактивных изотопов кальция и фосфора.

Положения, выносимые на защиту

1. НКС рековерин, NCS-1, GCAP1 и GCAP2 локализуются в фоторецепторных рафт-структурах совместно с кавеолином-1.
2. Рековерин, NCS-1, GCAP1 и GCAP2 образуют стабильные Ca^{2+} -зависимые комплексы с N-концевым цитоплазматическим участком кавеолина-1, а также с входящим в его состав каркасным доменом белка.
3. В случае рековерина сайт связывания кавеолина-1 локализуется в C-концевом домене белка и включает остатки F106 и F172, в то время как остаток W156 принимает участие в поддержании структуры кавеолин-1-связывающего кармана.
4. Образование комплекса с кавеолином-1 не оказывает влияния на регуляторную активность Ca^{2+} -связанных форм рековерина и NCS-1 в отношении родопсинкиназы, однако стимулирует активацию фоторецепторной гуанилатциклазы под действием GCAP2.
5. В случае рековерина связывание с кавеолином-1 повышает Ca^{2+} -чувствительность белка.
6. Окисление рековерина по единственному, консервативному среди НКС остатку цистеина происходит в условиях окислительного стресса *in vivo* и усиливает его взаимодействие с кавеолином-1.
7. Мутация кавеолина-1 Y14E, имитирующая фосфорилирование белка в условиях окислительного стресса, ослабляет его взаимодействие с бескальциевыми формами НКС.

Личный вклад автора

Основная часть работы выполнялась в филиале Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Пущино, непосредственно автором. Отдельные эксперименты выполнялись совместно с сотрудниками сторонних организаций (НИИ физико-химической биологии имени

А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва; Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН, Пущино).

Апробация результатов

Результаты диссертации были представлены на следующих научных мероприятиях: международной конференции «Биология – наука 21 века» (Пущино, в 2014, 2015, 2018, 2019 г.), 8-м симпозиуме «Белки и пептиды» (Москва, 2017 г.), международной конференции «Ломоносов» (Москва, 2018), 43-м конгрессе FEBS «Biochemistry forever» (Прага, 2018 г.).

Публикации

По материалам диссертационной работы опубликовано 4 статьи в российских и иностранных журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций, и 8 тезисов конференций.

Объём и структура работы

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы (170 источников). Работа изложена на 120 страницах машинописного текста и содержит 34 рисунков. *В первой главе* представлен анализ литературных данных, описывающих строение и механизмы функционирования белков семейства НКС в фоторецепторной клетке позвоночных животных. Кроме этого, описаны структура интегрального мембранного белка кавеолина-1 и его функция в различных системах организма. *Во второй главе* приведены сведения о реагентах и материалах, используемых в работе. Изложены методы получения рекомбинантных и природных белков, исследования их структуры и активности, а также выявления и характеристики белок-белковых взаимодействий. *В третьей главе* представлены и проанализированы результаты экспериментов по изучению функциональной роли основного компонента рафт-структур кавеолина-1 как модулятора Ca^{2+} -зависимой функциональной активности НКС в фоторецепторной клетке.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Исследование взаимодействия кавеолина-1 с белками семейства НКС

1.1. Совместная локализация белков семейства НКС с кавеолином-1 в рафт-структурах НСП

Анализ первичной структуры НКС выявил наличие потенциального сайта связывания кавеолина-1, включающего каноническую последовательность ArXXXXArXXAr, где Ar – это ароматический аминокислотный остаток, X – любой аминокислотный остаток. С учетом этого наблюдения, было высказано предположение, что НКС могут образовывать комплексы с кавеолином-1 и это свойство может обуславливать их локализацию в мембранных рафт-структурах. Проверка высказанного предположения была осуществлена с использованием препаратов наружных сегментов фоторецепторных клеток (НСП) сетчатки, экспрессирующих четыре основных НКС – рековерин, NCS-1, GCAP1 и GCAP2 – и содержащих в своем составе стопку фоторецепторных дисков, обогащенных рафт-структурами.

Методом фракционирования в градиенте сахарозы с использованием НСП, адаптированных к световым (низкий уровень Ca^{2+}) или темновым (высокий уровень Ca^{2+}) условиям, были получены фракции фоторецепторных мембран устойчивых к действию неионных детергентов (рафт-структуры), а также мембран, не содержащих рафт-структуры. Анализ полученных образцов с помощью иммуноблоттинга показал, что при низкой концентрации кальция все НКС присутствуют во фракциях, содержащих рафт-структуры/кавеолин-1 (Рис. 1). При этом аналогичные фракции, полученные в условиях высокой концентрации кальция, практически лишены GCAP1 и GCAP2, однако содержат повышенную концентрацию рековерина и NCS-1. Последнее, скорее всего, отражает низкоспецифичное связывание с мембранами Ca^{2+} -заполненных форм рековерина и NCS-1 за счет их N-концевой миристоильной группы. Однако в целом, наблюдаемое распределение НКС по фракциям свидетельствует о наличии общего фактора, удерживающего эти белки в рафт-структурах в условиях низкого кальция, в роли которого может выступать кавеолин-1. Отметим, что присутствие остаточного пула GCAP1 и GCAP2 в рафт-структурах при низкой концентрации кальция согласуется с физиологической функцией этих белков, бескальциевые

формы которых активируют фоторецепторные гуанилатциклазы. Однако в случае рековерина и NCS-1 подобный пул белка должен быть неактивным (“запасным”), поскольку указанные НКС регулируют свои мишени при высокой концентрации внутриклеточного кальция.

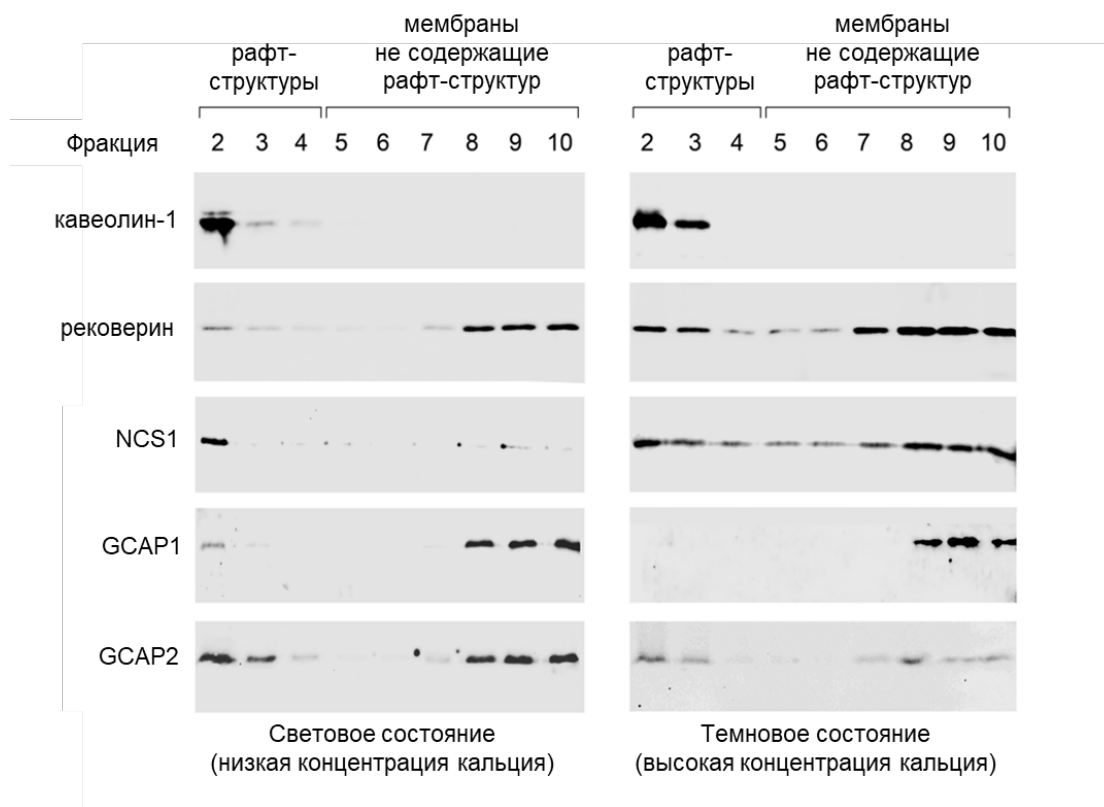


Рисунок 1. Распределение кавеолина-1 и белков НКС во образцах, полученных в результате фракционирования НСП в градиенте сахарозы, по данным метода иммуноблоттинга с использованием соответствующих антител.

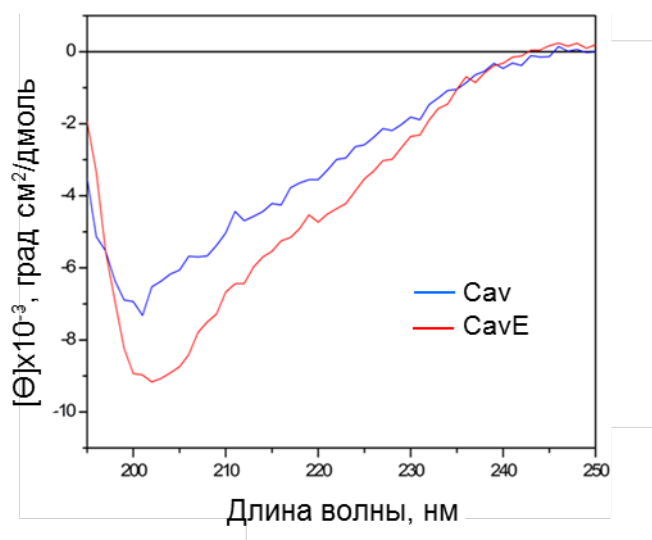
В целом, можно заключить, что фоторецепторных клетках сетчатки бескальциевые формы белков семейства НКС – рековерина, NCS-1, GCAP1 и GCAP2 – локализуются в мембранных рафт-структурах совместно с кавеолином-1.

1.2. Получение и характеристика рекомбинантных белков, соответствующих N-концевому цитоплазматическому участку кавеолина-1

Большинство выявленных взаимодействий кавеолина-1 с белками-мишенями происходит с участием остатков его протяженного N-концевого цитоплазматического участка M1-R101, который представляет собой отдельный

элемент структуры, содержащий функционально важные домены. С учетом этого, для изучения комплексов кавеолина-1 с НКС нами был сконструирован и получен рекомбинантный белок, имеющий аминокислотную последовательность этого участка кавеолина-1 с тагом из шести остатков гистидина на N-конце (“Cav”). Кроме того, был получен аналогичный белок с заменой Y14E (“CavE”), имитирующей фосфорилирование кавеолина-1 тирозинкиназами, характерное для условий окислительного стресса (см. раздел 4).

На первом этапе, с использованием методов спектроскопии КД и ДРС были охарактеризованы структурные свойства Cav и CavE. Результаты проведенных исследований показали высокую степень гомогенности и структурированности полученных рекомбинантных белков. Так, по данным КД, они не имеют существенных отличий во вторичной структуре и содержат значительное количество ее элементов (50-55%), среди которых преобладают β-складчатые слои (30-40%), что соответствует структуре природного кавеолина-1 (Рис. 2).



| Образец | α-спираль, % | В-лист, % | Поворот, % | Неупорядоченная структура, % |
|---------|--------------|-----------|------------|------------------------------|
| Cav | 7,2 | 30,1 | 19,8 | 40,3 |
| CavE | 7,4 | 26,2 | 21,1 | 44,7 |

Рисунок 2. Результаты анализа вторичной структуры Cav и CavE методом спектроскопии КД.

По данным ДРС оба фрагмента кавеолина-1 существуют в виде олигомеров высокого порядка, однако демонстрируют узкое молекулярно-массовое распределение, что указывает на гомогенность и регулярность образующихся белковых комплексов (Рис. 3). Примечательно, что CavE имеет более высокую степень олигомеризации, чем Cav, что может обуславливать различия в функциональных свойствах этих белков, имитирующих, соответственно, фосфорилированный и нефосфорилированный кавеолин-1. В целом, по своим свойствам полученные рекомбинантные белки соответствуют природному кавеолину-1 и поэтому могут быть использованы для анализа его взаимодействия с НКС.

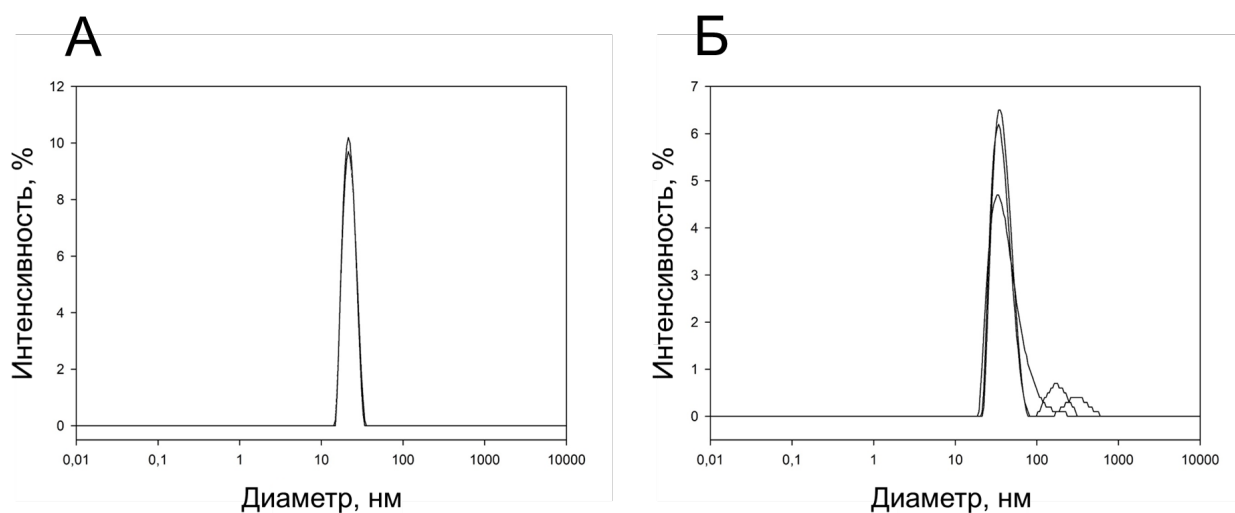


Рисунок 3. Результаты анализа мультимеризации Cav (А) и CavE (Б) методом ДРС

1.3. Исследование взаимодействия НКС с N-концевым цитоплазматическим участком кавеолина-1

Для исследования кавеолин-1-связывающих свойств НКС нами использовались рекомбинантные препараты четырех представителей этого семейства (рековерина, NCS-1, GCAP1 и GCAP2), экспрессируемых фоторецепторной клеткой. Поскольку природные варианты НКС содержат N-концевую миристоильную группу, наличие которой имеет принципиальное значение для их локализации и функционирования, важнейшей первоначальной задачей было получение полностью миристоилированных форм этих белков. Для этого был разработан новый метод экспрессии и выделения НКС, включающий использование набора последовательных гидрофобных хроматографий.

Использование этого метода позволило получить препараты миристоилированных НКС, которые по результатам масс-спектрометрического анализа и исследования собственной флуоресценции белков не отличались от соответствующих природных аналогов (данные не показаны).

Первичная характеристика комплексов полученных НКС с кавеолоном-1 была осуществлена с помощью метода аналитической аффинной хроматографии, где в качестве активной группы выступал Cav, ковалентно иммобилизованный на хроматографической матрице. Как видно из Рис. 4, все четыре исследуемых НКС связываются с иммобилизованным Cav, причём это связывание является более выраженным в отсутствие кальция. Следует отметить, что в этих условиях взаимодействие является практически нечувствительным к наличию в НКС N-концевой миристоильной группы, что указывает на узнавание кавеолоном-1 специального сайта в структуре этих белков.

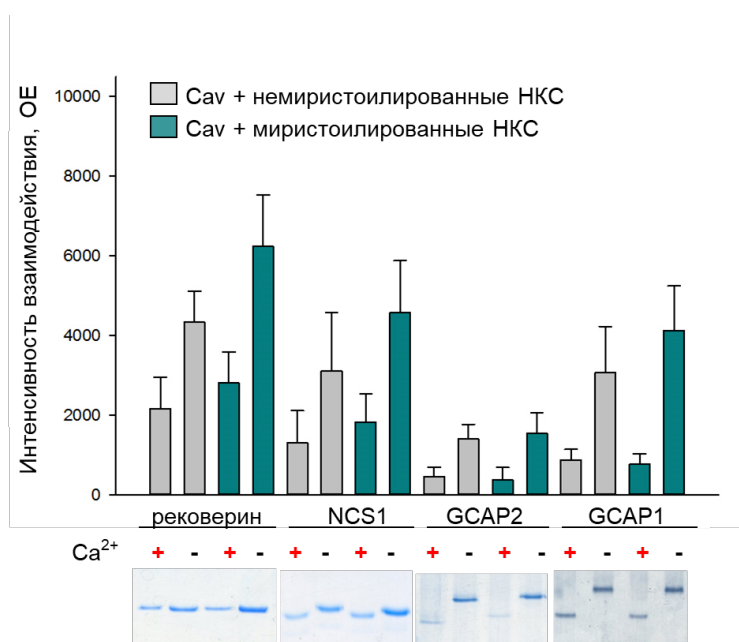


Рисунок 4. Взаимодействие различных форм НКС с аффинным сорбентом, содержащим иммобилизованный Cav в присутствии (2 мМ Ca²⁺) или в отсутствие (2 мМ ЭГТА) кальция.

В случае рековерина были также определены кинетические и равновесные параметры выявленного взаимодействия с Cav с использованием высокочувствительного метода, использующего ППР-биосенсор. Рековерин был иммобилизован на ППР-чипе, после чего осуществлялся мониторинг его

связывания с Cav (подвижная фаза) в режиме реального времени (Рис. 5). Полученные результаты обрабатывались с применением модели гетерогенного лиганда, учитывающей неспецифические взаимодействия (K_{D2} на Рис. 5). Оказалось, что реCOVERIN образует комплекс с Cav только в отсутствие ионов кальция, при этом величина константы диссоциации этого комплекса (K_{D1} на Рис. 5) находится в субмикромольном диапазоне, что подтверждает высокую специфичность обнаруженного взаимодействия.

| Концентрация Cav | k_{off1} (s^{-1}) | K_{D1} (M) | k_{off2} (s^{-1}) | K_{D2} (M) |
|------------------|-------------------------|----------------------------|-------------------------|--------------------|
| 15 мкМ | 6,32E-5 | 2,29E-7 | 2,10E-3 | 1,69E-5 |
| 10 мкМ | 1,07E-4 | 4,05E-7 | 2,87E-3 | 2,31E-5 |
| 7,5 мкМ | 1,41E-4 | 4,75E-7 | 2,86E-3 | 2,31E-5 |
| 5 мкМ | 8,08E-5 | 1,86E-7 | 2,72E-3 | 2,19E-5 |
| Ср.знач.±STD | (9,80±3,38) E-5 | (3,24±1,38) E-7 | (2,64±0,37) E-3 | (2,13±0,29) E-5 |

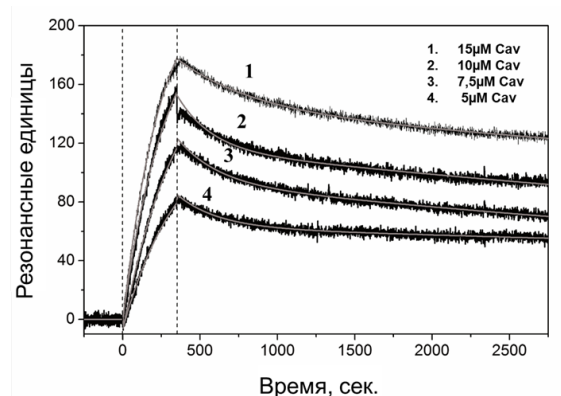


Рисунок 5. Кинетические и равновесные параметры взаимодействия бескальциевой формы реCOVERINA с Cav, определенные с использованием ППР-биосенсора.

1.4. Установление сайта связывания НКС в N-концевом цитоплазматическом участке кавеолина-1

Учитывая, что основной вклад в узнавание мишеней кавеолином-1 вносит присутствующий в структуре его N-концевого цитоплазматического участка каркасный домен F81-R101, мы предположили, что именно этот домен может выступать в роли сайта связывания НКС. Для проверки этого предположения была изучена способность реCOVERINA, NCS-1, GCAP1 и GCAP2 взаимодействовать с соответствующим синтетическим пептидом (“Cav81-101”) методом ИКТ. В отсутствие ионов кальция все исследуемые НКС демонстрируют выраженное эндотермическое связывание с Cav81-101 (Таблица 1). Во всех случаях взаимодействие является эквимольным, за исключением GCAP2, который связывает меньше пептида на моль белка, вероятно, из-за частичной димеризации в отсутствие кальция. Эффективность выявленных взаимодействий НКС с Cav81-101 уменьшается в следующем ряду: GCAP1 > реCOVERIN > NCS1 > GCAP2. Во всех

случаях наблюдается энтропийный характер связывания, что соответствует гидрофобной природе взаимодействий между кавеолином-1 и его мишенями. Отметим, что в присутствии ионов кальция взаимодействия между Cav81-101 и белками НКС практически не происходит.

Таблица 1. Параметры взаимодействия НКС с Cav81-101 по данным метода ИКТ.

| НКС | Стехиометрия | K_D (нМ) | ΔH (ккал/моль) | $T\Delta S$ (ккал/моль) |
|-----------|--------------|--------------|------------------------|-------------------------|
| рековерин | 0,98 | 196,46±24,05 | 15,68±0,22 | 24,8 |
| NCS1 | 0,73 | 384,62±44,48 | 15,00±0,27 | 23,7 |
| GCAP1 | 1,05 | 75,19±21,11 | 1,59±0,39 | 25,6 |
| GCAP2 | 1,40 | 492,61±91,00 | 4,25±0,11 | 12,8 |

В целом, на основании полученных данных можно заключить, что бескальциевые формы рековерина, NCS-1, GCAP1 и GCAP2 образуют специфические высокоаффинные комплексы с N-концевым цитоплазматическим участком кавеолина-1 M1-R101 и с каркасным доменом F81-R101, входящим в его состав, которые диссоциируют в присутствии кальция.

2. Поиск и идентификация сайта связывания кавеолина-1 в структуре НКС

2.1. Проверка функциональности канонического сайта связывания кавеолина-1, обнаруженного в структуре НКС

Как уже говорилось, функциональный домен кавеолина-1 распознает специализированные аминокислотные мотивы в белках-мишенях (ArXXXXArXXAr, где Ar – это ароматический аминокислотный остаток, X – любой аминокислотный остаток), один из которых был обнаружен нами в N-концевом домене белков НКС (Рис. 6). Структура этого мотива является высоко консервативной среди НКС как по набору аминокислот, составляющих сайт взаимодействия с кавеолином-1, так и по расположению сайта в структуре этих белков (перед вторым Ca^{2+} -связывающим доменом). С учетом этих данных, на примере рековерина была проведена проверка возможной специфичности указанного сайта в отношении кавеолина-1. Для этого была получена мутантная

форма рековерина с одновременными заменами Y65A, F70A, и F73A, т.е. всех ароматических аминокислотных остатков, потенциально отвечающих за связывание с кавеолином-1. Мониторинг взаимодействий полученного мутанта с Cav81-101 осуществляли с помощью ИКТ. Оказалось, что константы диссоциации и термодинамические параметры соответствующего комплекса не сильно отличались от таковых для рековерина дикого типа (Таблица 2). Таким образом, аминокислотные остатки, формирующие специализированный сайт ArXXXXArXXAr, обнаруженный нами в структуре НКС, скорее всего, не участвуют во взаимодействии рековерина с кавеолином-1 (Таблица 2).

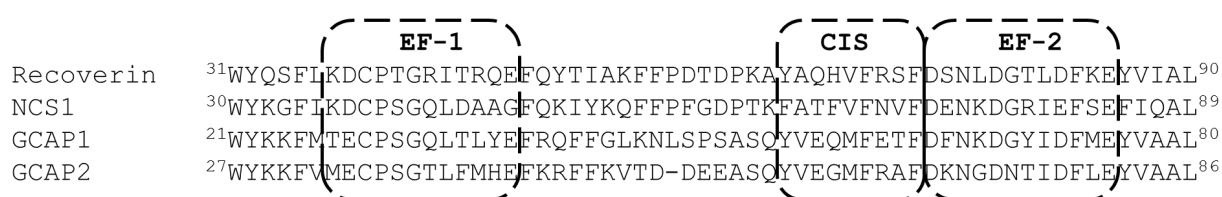


Рисунок 6. Выравнивание аминокислотных последовательностей N-концевого домена исследуемых НКС. Первый (неактивный) и второй Ca^{2+} -связывающие центры типа EF-hand, а также потенциальный кавеолин-1-связывающий сайт обозначены как EF-1, EF-2 и CIS (caveolin-1 interacting site), соответственно.

2.2. Идентификация нового сайта связывания кавеолина-1 в структуре НКС

Для дальнейшего поиска сайта связывания кавеолина-1 в молекуле рековерина был использован следующий подход. Как известно, каждый из двух доменов немиристоилированной формы рековерина независимо связывает один ион кальция, и это связывание может быть селективно блокировано точечными аминокислотными заменами E85Q (ингибирует связывание Ca^{2+} в EF-2 N-концевого домена) или E121Q (ингибирует связывание Ca^{2+} в EF-3 C-концевого домена). Поскольку Ca^{2+} -заполненная форма рековерина не связывается с Cav81-101, способность мутантов E85Q или E121Q взаимодействовать с этим пептидом в присутствии кальция будет свидетельствовать о локализации искомого сайта в N-концевом или C-концевом домене белка, соответственно. По данным ИКТ, именно мутант E121Q приобретает способность связывать Cav81-101 в присутствии

кальция ($K_D \sim 900$ нМ, Таблица 2), что указывает локализацию соответствующего сайта в С-концевом домене рековерина.

Для идентификации аминокислот С-концевого домена рековерина, непосредственно участвующих в связывании с кавеолоном-1, были проведены точечные замены всех ароматических остатков, входящих в состав этого домена и являющихся консервативными среди белков НКС (W104, F106, Y109, W156 и F172). Полученные мутантные формы были протестированы на предмет взаимодействия с Cav81-101 методом ИКТ. В отсутствие ионов кальция мутанты W104A и Y109A связывались с Cav81-101 аналогично белку дикого типа. Мутантная форма F172A, напротив, демонстрировала примерно двукратное снижение сродства к пептиду, тогда как в случае F106A и W156A сродство снижалось в 5,5 и 6,7 раза, соответственно (Таблица 2).

Таблица 2. Параметры взаимодействия Cav81-101 с мутантными формами рековерина по данным метода ИКТ.

| Форма рековерина | Условия | K_D (нМ) | ΔH (ккал/моль) |
|-------------------|-------------------|----------------|------------------------|
| n-myrWT | -Ca ²⁺ | 122,5±20,42 | 13,07±0,20 |
| n-myrE85Q | -Ca ²⁺ | 156,86±39,22 | 10,95±0,44 |
| n-myrE121Q | -Ca ²⁺ | 601,5±118,03 | 12,20±0,63 |
| | +Ca ²⁺ | 903,95±187,09 | 9,07±0,55 |
| myrWT | -Ca ²⁺ | 196,46±24,05 | 15,68±0,22 |
| myrY65A/F70A/F73A | -Ca ²⁺ | 390,625±44,12 | 17,720±0,30 |
| myrW104A | -Ca ²⁺ | 211,86±54,22 | 8,15±0,20 |
| myrF106A | -Ca ²⁺ | 1086,96±191,05 | 17,75±0,92 |
| myrY109A | -Ca ²⁺ | 217,39±42,12 | 14,75±0,65 |
| myrW156A | -Ca ²⁺ | 1315,79±219,29 | 7,80±0,35 |
| myrF172A | -Ca ²⁺ | 257,73±50,34 | 7,95±0,11 |

Таким образом, нам удалось впервые обнаружить в молекуле рековерина новый структурный сайт связывания кавеолина-1, который локализуется в С-концевом домене белка и, по-видимому, включает аминокислотные остатки F106, W156 и F172.

2.3. Предсказание структурного механизма взаимодействия кавеолина-1 с рековерином

Для того чтобы более детально охарактеризовать структурный механизм, лежащий в основе нового типа взаимодействий кавеолина-1 с белками НКС, далее было проведено молекулярное моделирование соответствующих комплексов на примере рековерина. Для этого с одной стороны был использован С-концевой домен рековерина (F82-A177) полученный на основе ЯМР-структуры PDB 1IKU, а с другой – каркасный домен кавеолина-1 (F81-R101). В случае рековерина сделанный выбор был обусловлен тем фактом, что именно С-концевой домен белка содержит остатки Y106, W156 и F172, критичные для связывания кавеолина-1, а координация кальция в этот домен блокирует присоединение кавеолина-1. В случае кавеолина-1, каркасный домен F81-R101 является наименьшим подтверждённым для НКС сайтом взаимодействия. Кроме этого, пространственная структура кавеолина-1 полностью не разрешена, и, в этом случае, структурное моделирование должно выполняться для пептидов с как можно менее протяжённой аминокислотной последовательностью.

На первом этапе, с использованием сервисов «Quark» и «PEP-FOLD» были получены 10 наиболее вероятных вариантов структуры Cav81-101, из которых 4 (2 из 5 для каждого сервиса) представляли собой β -шпильку (Рис. 7А). Учитывая имеющиеся литературные данные, а также полученные нами результаты исследования Cav с помощью спектроскопии КД (см. Рис. 2), именно такой вид вторичной структуры наиболее вероятен для Cav81-101. Молекулярный докинг бескальциевой формы С-концевого домена рековерина и полученной структуры Cav81-101, проведённый с помощью сервиса «Z-DOCK», позволил установить структуру комплекса, характеризующегося наименьшей энергией и наиболее полно отвечающую всем геометрическим критериям (Рис. 7Б). Расчет взаимодействий в полученной структуре, произведенный с помощью сервисов «LigPlot» и «PIC: Protein Interactions Calculator», показал, что выявленные ранее критичные для узнавания кавеолина-1 остатки Y106 и F172 рековерина принимают участие в сети гидрофобных взаимодействий, формирующихся с участием остатков F91, T92 и V93 Cav81-101. Кроме того, обнаружено два прочных катион- π взаимодействия между остатками Y96 и W97 кавеолина-1 и R151 и K101 рековерина,

соответственно. Всего предсказанный комплекс стабилизирован за счет одной водородной связи, пяти ароматических и двух катион-π контактов, а также тринадцати гидрофобных контактов, что хорошо согласуется с его термодинамическими характеристиками (см. раздел 1.4.).

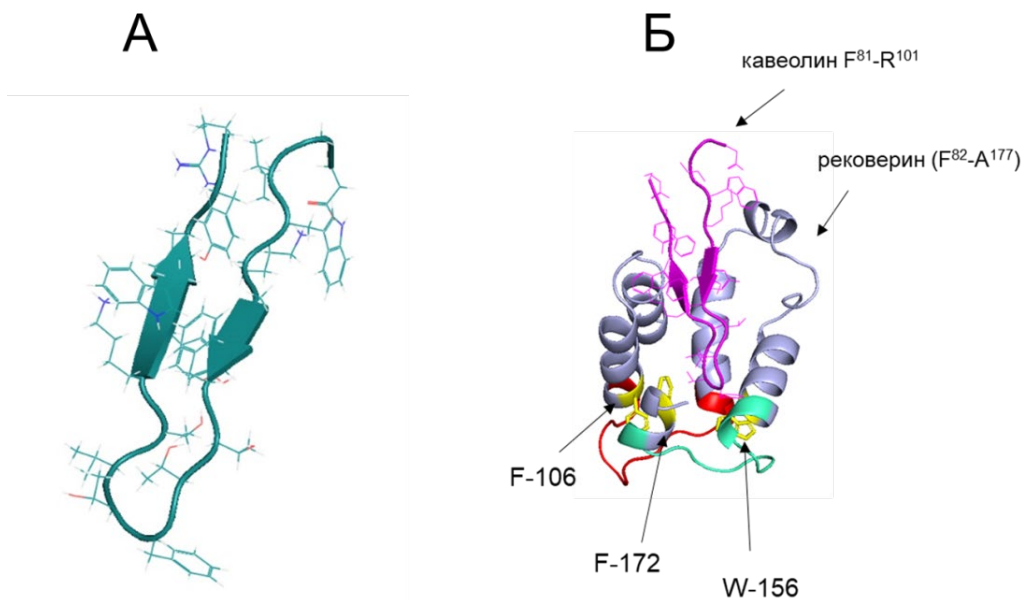


Рисунок 7. Пространственная структура комплекса бескальциевой формы рековерина с Cav81-101 по данным молекулярного моделирования. (А) Результаты моделирования структуры Cav81-101 с использованием сервисов «Quark» и «PEP-FOLD». (Б) Результаты молекулярного докинга С-концевого домена рековерина (F82-A177) и каркасного домена кавеолина-1 (F81-R101) с помощью сервиса «Z-DOCK».

Примечательно, что описанный комплекс не содержит прямых контактов с участием W156 рековерина, замена которого производит наиболее выраженный негативный эффект на взаимодействие с кавеолином-1 (Таблица 2). Мы предполагаем, что этот аминокислотный остаток важен не столько для взаимодействия, сколько для поддержания правильной конформации кавеолин-1-связывающего кармана в С-концевом домене рековерина.

Таким образом, связывание бескальциевой формы рековерина с кавеолином-1 происходит не за счет канонической последовательности ArXXXXArXXAr, обнаруженной в N-концевом домене белка, а с участием структурного сайта, формирующегося в его С-концевом домене и включающего остатки F106 и F172, в то время как остаток W156, по всей видимости, необходим для поддержания

правильной конформации кавеолин-1-связывающего кармана в С-концевом домене рековерина.

3. Исследование влияния кавеолина-1 на функциональные свойства НКС

3.1. Эффект кавеолина-1 на регуляторную активность НКС

Для того чтобы охарактеризовать функциональное значение выявленных новых комплексов НКС с кавеолином-1, далее мы изучили влияние Cav на регуляторную активность этих белков. В случае рековерина и NCS1 в качестве тест-системы была использована реакция фосфорилирования зрительного рецептора родопсина родопсинкиназой (G-protein coupled receptor kinase-1, GRK1). Как и ожидалось, рековерин и NCS1 ингибировали активность GRK1 только при высокой концентрации Ca^{2+} (Рис. 8А). При этом наблюдаемый эффект не зависел от присутствия Cav, что согласуется с тем фактом, что взаимодействие между ним и обоими НКС происходит только в отсутствие кальция (см. раздел 1).

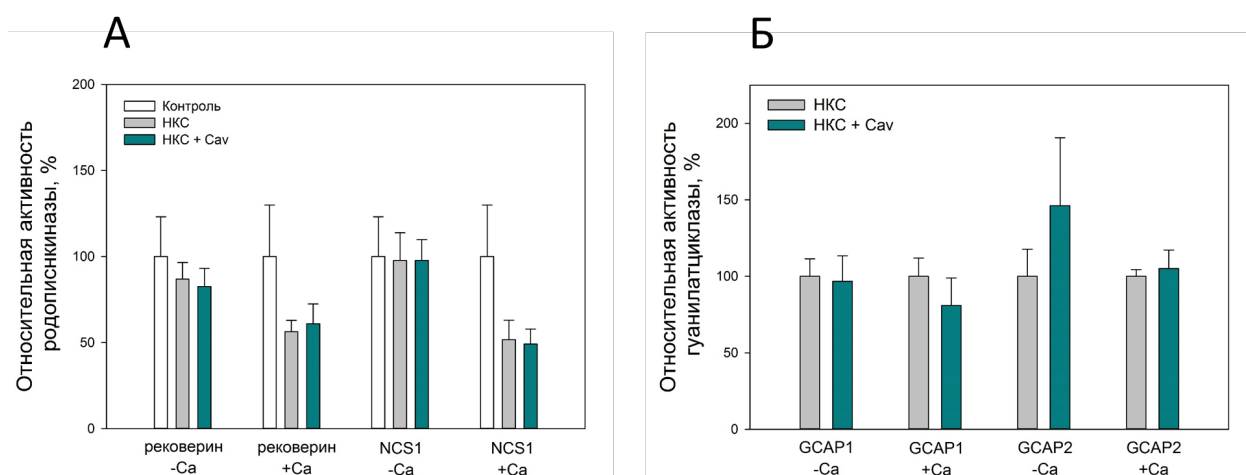


Рисунок 8. Влияние Cav на Ca^{2+} -зависимую регуляцию GRK1 (А) и ROS-GC1 (Б) под действием рековерина/NCS1 и GCAP1/GCAP2, соответственно. * - $p < 0,05$ по сравнению с активностью ферментов в отсутствие НКС/Cav (А) или в присутствии НКС, но в отсутствие Cav (Б) по результатам расчета непарного двустороннего t-критерия Стьюдента.

Для определения влияния кавеолина-1 на активность GCAP1 и GCAP2 было проведено исследование Ca^{2+} -зависимой регуляции фоторецепторной гуанилатциклазы-1 (ROS-GC1) под действием каждого из этих белков в присутствии и в отсутствие Cav (Рис. 8Б). Как видно, в случае бескальциевой

формы GCAP2, предварительно проинкубированной с эквимольным количеством Cav, была зафиксирована заметная дополнительная активация ROS-GC1. Кроме того, в случае GCAP1 наблюдалось небольшое ингибирующее действие Cav при насыщающих концентрациях Ca^{2+} .

Таким образом, присутствие кавеолина-1 ожидаемо не оказывает влияния на регуляторную активность Ca^{2+} -связанных форм НКС в отсутствие соответствующего взаимодействия. При этом связывание с кавеолином-1 стимулирует активность бескальциевой формы GCAP2 в отношении его мишени ROS-GC1.

3.2. Влияние кавеолина-1 на Ca^{2+} -чувствительность рековерина

Принимая во внимание тот факт, что Ca^{2+} -чувствительность рековерина, измеренная *in vitro*, находится за пределами физиологического диапазона концентрации кальция, а связывание рековерина с мембранами, как известно, усиливает его сродство к кальцию, мы предположили, что взаимодействие бескальциевой формы этого белка с кавеолином-1 может иметь аналогичный эффект. По результатам экспериментов с использованием изотопа $^{45}Ca^{2+}$ (Рис. 9А) было установлено, что взаимодействие с Cav действительно существенно увеличивает сродство рековерина к ионам кальция (значение K_D уменьшается с 24,5 до 8,1 мкМ). При этом связывание двух ионов становится некооперативным (коэффициента Хилла уменьшается с 1,5 до 0,7), что предполагает влияние Cav на координацию кальция в одном из EF-hand центров рековерине.

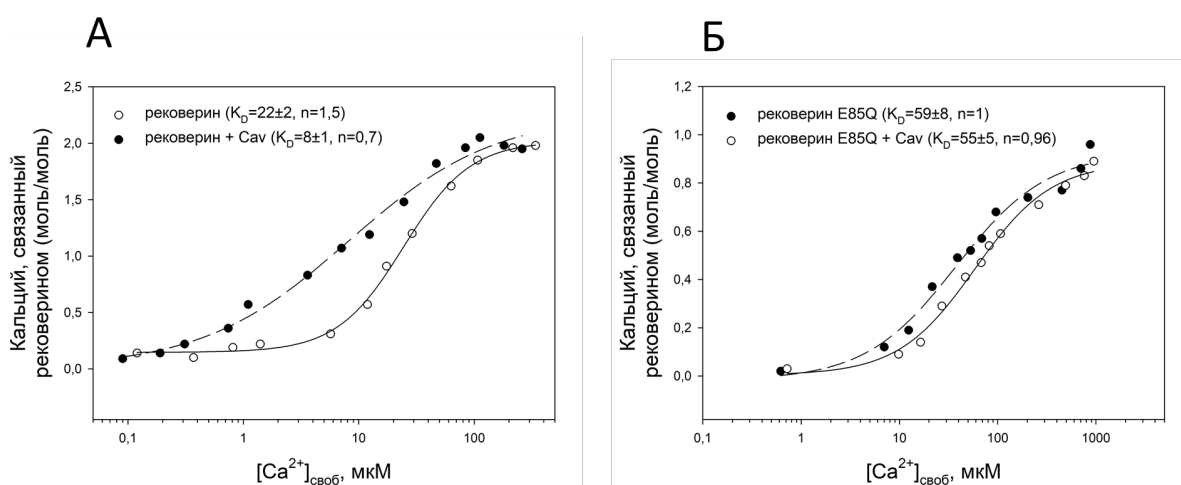


Рисунок 9. Влияние кавеолина-1 на связывание $^{45}Ca^{2+}$ с рековерином дикого типа (А) и его мутантной формы E85Q (Б).

Для идентификации этого центра было необходимо охарактеризовать влияние Cav на связывание $^{45}\text{Ca}^{2+}$ с мутантными формами реверина, не способными координировать катион в EF-2 или EF-3 (мутанты E85Q и E121Q, соответственно). Как известно, замена E121Q практически полностью блокирует связывание Ca^{2+} с реверинном (этот феномен связан с механизмом последовательного заполнения миристоилированного реверина ионами кальция), что делает исследование этого мутанта нецелесообразным. Между тем, анализ мутанта реверина E85Q показал, что произведенная замена полностью предотвращает эффект Cav на связывание Ca^{2+} с белком (Рис. 9Б). С учетом того, что взаимосвязь между доменами в реверине определяется миристоильной группой, мы предполагаем, что связывание кавеолина-1 ослабляет взаимодействие этой группы с С-концевым доменом реверина, что снижает междоменную кооперативность и повышает аффинность к ионам кальция центра EF-2 белка.

Для оценки влияния обнаруженного эффекта кавеолина-1 на регуляторную активность реверина, мы изучили Ca^{2+} -зависимость ингибирования этим НКС фосфорилирования родопсина в нативных фоторецепторных мембранах и фоторецепторных мембранах, обогащенных рафт-структурами. Оказалось, что в присутствии рафт-структур (содержащих кавеолин-1) наблюдается существенный сдвиг Ca^{2+} -зависимости ингибирования GRK1 в сторону более низких концентраций катиона: значение концентрации кальция, соответствующее полумаксимальному ингибированию, снижается с 1,91 до 0,76 мкМ (данные не показаны). Таким образом, в присутствии рафт-структур/кавеолина-1 происходит существенное повышение сродства реверина к ионам кальция и, как следствие, Ca^{2+} -чувствительности сигнальной активности белка как регулятора GRK1.

4. Исследование влияния условий окислительного стресса на образование комплексов белков НКС с кавеолином-1

4.1. Исследование редокс-чувствительности рековерина *in vivo* и *in vitro*

Развитие патологических состояний зрительной системы часто сопряжено с окислительным стрессом фоторецепторных клеток, в том числе индуцируемым избыточным облучением сетчатки. Ранее нами было показано, что рековерин является редокс-зависимым белком, окисляясь по единственному в его структуре, консервативному среди НКС остатку С39 с образованием дисульфидного димера. Поскольку функционирование кавеолина-1 также является чувствительным к окислительному стрессу через фосфорилирование этого белка по остатку Y14, мы предположили, что изменения редокс-потенциала клеточной среды могут оказывать влияние на образование и сигнальную активность комплексов НКС-кавеолин-1, впервые описанных в настоящей работе.

Для проверки этого предположения, прежде всего, мы исследовали редокс-чувствительность рековерина *in vivo*, а именно его способность образовывать дисульфидные димеры в условиях окислительного стресса. Для этого, нами была использована ранее разработанная модель светоиндуцированного окислительного стресса сетчатки крыс. Иммуноблоттинг экстрактов сетчатки в невосстанавливающих условиях выявил накопление димерных форм рековерина у облученных животных (Рис. 10). Указанная форма полностью разрушалась в присутствии агента, восстанавливающего тиольные группы белков, что говорит о ее стабилизации за счет дисульфидных связей.

Сделанные наблюдения были подтверждены на клеточной модели окислительного стресса с использованием линии MDCK (отличается высоким содержанием кавеолина-1), стабильно экспрессирующей рековерин (Рис. 11). Как видно, повышение редокс-потенциала среды приводило к накоплению дисульфидных димеров рековерина в клетках. Важно, что этот процесс коррелировал с уровнем фосфорилирования кавеолина-1, индуцируемого в условиях окислительного стресса. На основании этих данных, можно предположить наличие функциональной взаимосвязи между указанными модификациями рековерина и кавеолина-1.

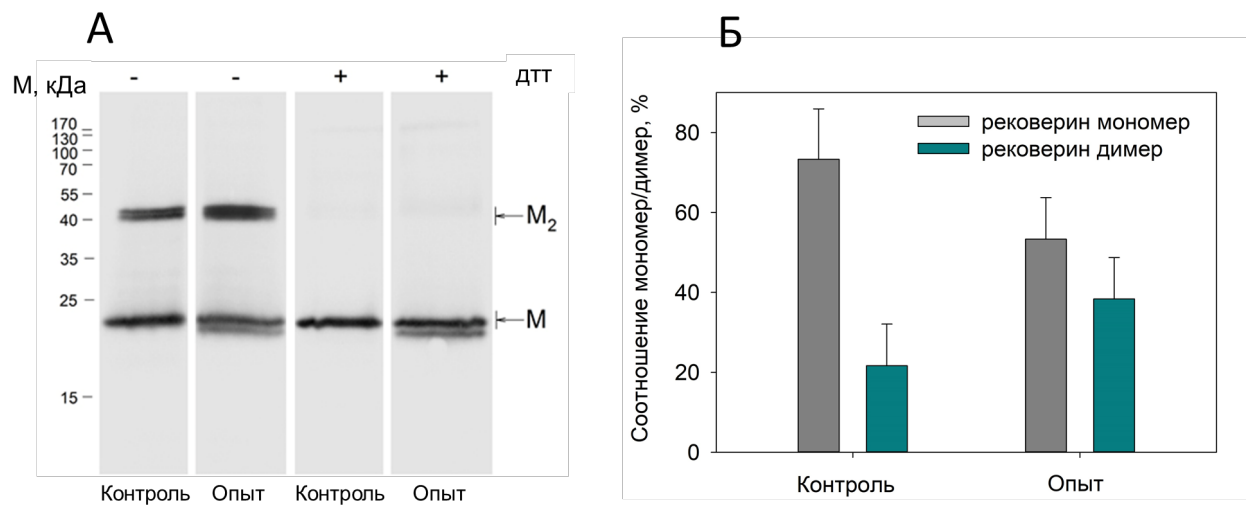


Рисунок 10. Дисульфидная димеризация реCOVERина в сетчатке крыс в условиях окислительного стресса, вызванного световым облучением (2500 люкс, 14 часов). (А) Иммуноблоттинг экстрактов сетчатки контрольных и облученных животных с использованием антител против реCOVERина, проведенный в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях. (Б) Соотношения фракций мономерной и димерной форм реCOVERина в сетчатке контрольных и облученных животных.

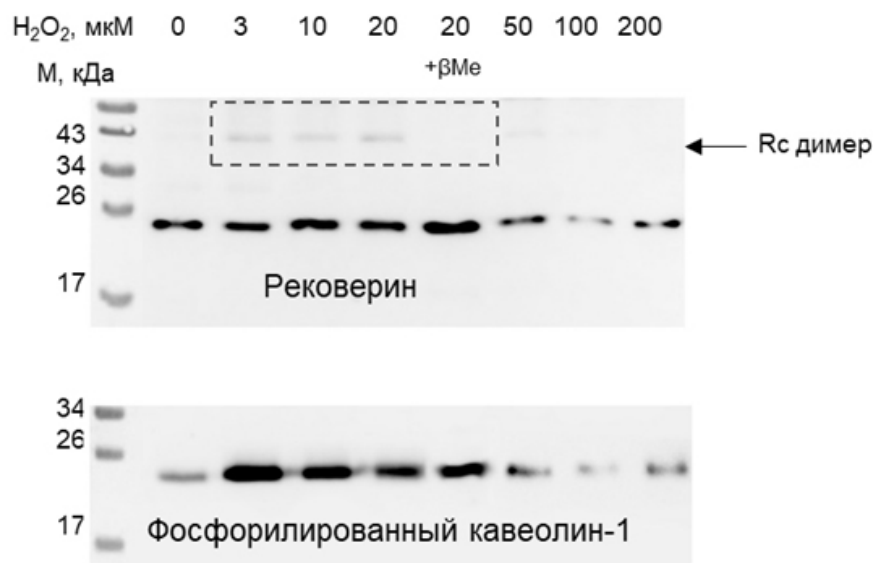


Рисунок 11. Дисульфидная димеризация реCOVERина в клетках MDCK. Иммуноблоттинг экстрактов клеток, проинкубированных в присутствии различных концентраций пероксида водорода (60 минут) в невосстанавливающих или восстанавливающих (проба +βMe) условиях. Визуализация белков произведена с использованием антител против реCOVERина (вверху) или фосфорилированного кавеолина-1 (внизу).

Наконец, в условиях *in vitro* было показано, что дисульфидная димеризация рековерина является процессом, протекающим более интенсивно в присутствии кальция (Рис. 12Б). Это наблюдение согласуется с результатами анализа имеющихся трёхмерных структур рековерина, указывающих на то, что Ca^{2+} -связанная форма белка является структурно более предпочтительной для образования его дисульфидного димера (Рис. 12А). Важно отметить, что ни Cav, ни миметик его фософрилированной формы CavE не оказывают прямого влияния на процесс димеризации рековерина (Рис. 12В).

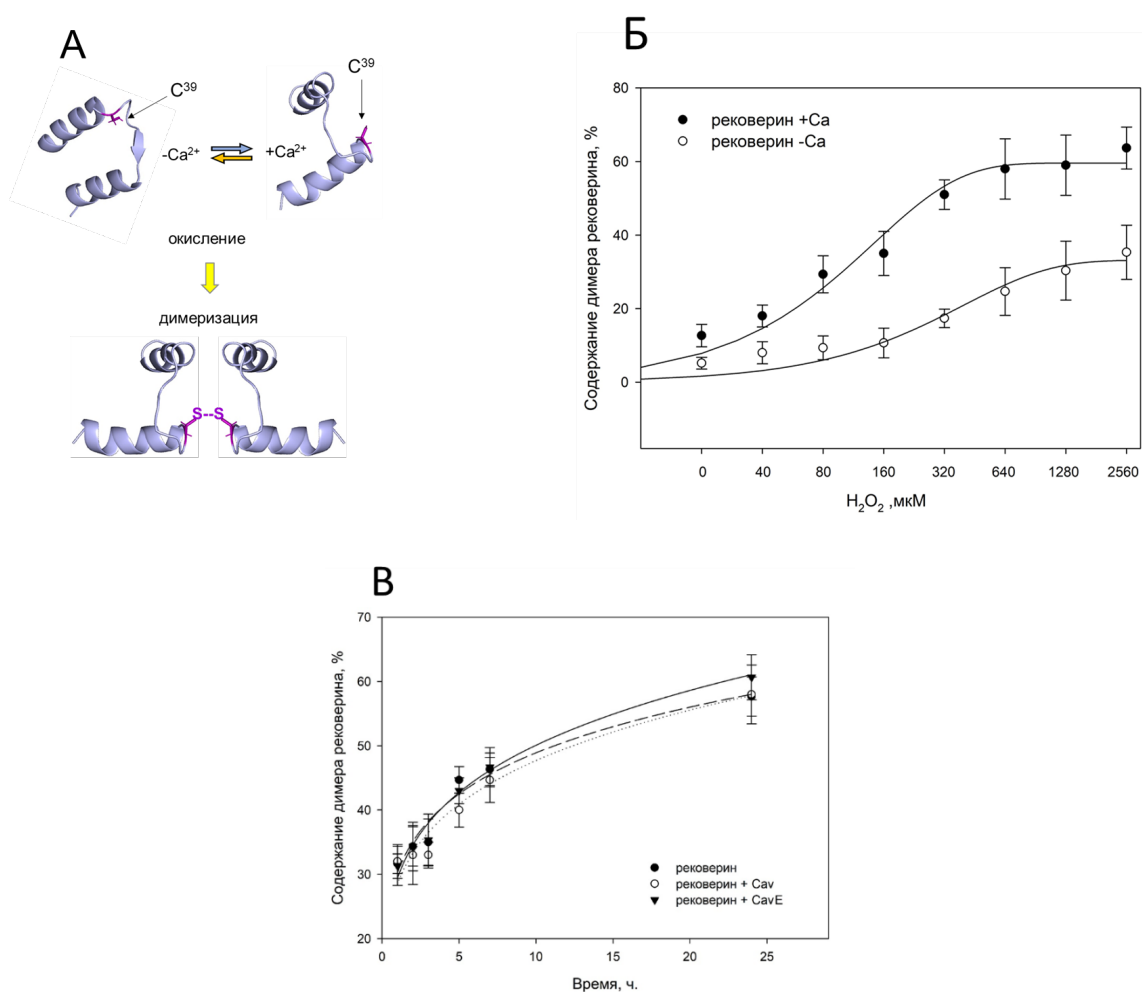


Рисунок 12. (А) Предполагаемый механизм дисульфидной димеризации рековерина. Показан фрагмент трёхмерной структуры E25-P58 N-концевого домена белка для бескальциевой (PDB 1IKU) и кальций-связанной (PDB 1JSA) форм рековерина. (Б) Дисульфидная димеризация рековерина *in vitro*. Зависимость степени дисульфидной димеризации бескальциевой и Ca^{2+} -связанной форм рековерина от концентрации пероксида водорода. (В) Степень димеризации Ca^{2+} -связанной формы рековерина в присутствии и в отсутствие Cav и CavE.

4.2. Изучение влияния модификаций НКС и кавеолина-1, характерных для окислительного стресса, на их взаимодействие

Несмотря на отсутствие прямого эффекта кавеолина-1 на дисульфидную димеризацию реверина, можно предположить, что модификации этих белков, характерные для условий окислительного стресса, оказывают влияние на их способность образовывать сигнальный комплекс, обнаруженный на предыдущих этапах работы. Для проверки этого предположения мы изучили способность Cav и CavE взаимодействовать с мономером и дисульфидным димером реверина, а также с его мутантом C39D, имитирующим более глубокое окисление C39 белка с образованием сульфеновой, сульфиновой или сульфоновой кислот. Кроме того, было изучено взаимодействие Cav и CavE с другими фоторецепторными НКС (NCS1, GCAP1 и GCAP2), которые по нашим данным также образуют комплекс с кавеолином-1. С использованием аналитической аффинной хроматографии (Рис. 13), а также ППР-биосенсора (Таблица 3) было показано, что взаимодействие всех форм реверина с CavE является менее выраженным, чем с Cav. При этом окисление реверина усиливает его взаимодействие с Cav, однако оказывает меньший эффект на связывание белка с CavE. Интересно, что фосфорилирование кавеолина-1 в разной степени, но все же стабильно ослабляет его взаимодействие с NCS1, GCAP1 и GCAP2 (Таблица 3). Полученные результаты могут указывать на наличие универсального сайта связывания кавеолина-1 среди белков НКС, прототип которого предсказан по результатам наших структурных исследований (см. раздел 2). Более того, на основании полученных данных можно впервые предположить наличие чувствительности сигнальной активности NCS1, GCAP1 и GCAP2 к условиям окислительного стресса.

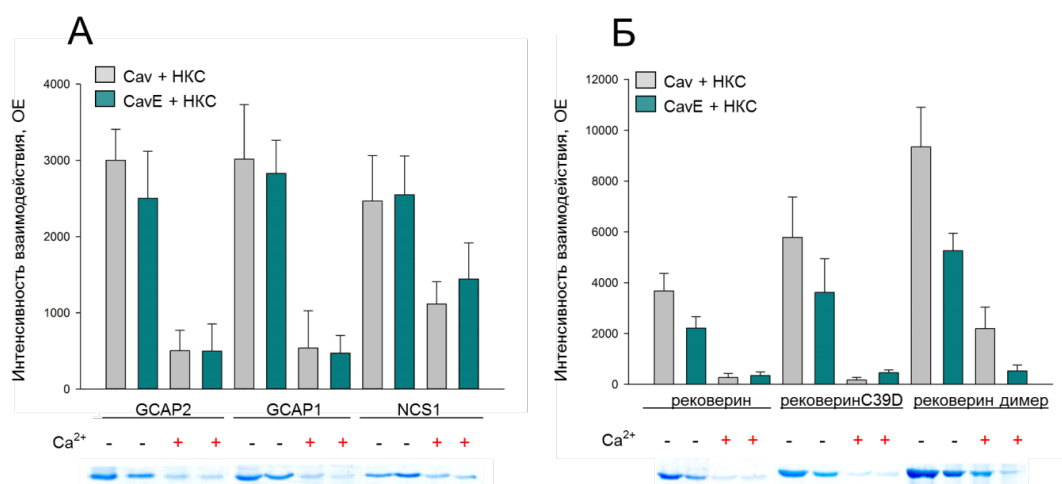


Рисунок 13. Взаимодействие GCAP1, GCAP2 и NCS1 (А), а также различных форм рековерина (Б) с аффинными сорбентами, содержащими иммобилизованный Cav или CavE в присутствии (2 мМ Ca²⁺) или в отсутствие (2 мМ ЭГТА) кальция.

В целом, можно заключить, что в условиях окислительного стресса рековерин способен окисляться по единственному в его структуре (консервативному среди НКС) остатку цистеина с образованием дисульфидных димеров, что усиливает его взаимодействие с кавеолином-1. При этом мутация кавеолина-1 Y14E, имитирующая фосфорилирование белка в условиях окислительного стресса, ослабляет его взаимодействие с бескальциевыми формами НКС.

Таблица 3. Параметры взаимодействия НКС с Cav и CavE в присутствии и в отсутствие кальция по результатам исследований с использованием ППР-биосенсора.

| | Cav K _D (nM) | | CavE K _D (nM) | |
|--------------------|-------------------------|-----------|--------------------------|----------|
| | 2мМ Ca ²⁺ | 2мМ ЭГТА | 2мМ Ca ²⁺ | 2мМ ЭГТА |
| Рековерин, мономер | - | 490±160 | - | 1110±66 |
| Рековерин димер | - | 48.6±1.1 | - | 218±87 |
| Рековерин C39D | 376±173 | 140±44 | 629±257 | 329±145 |
| NCS1 | 326±169 | 255±103 | 207±87 | 309±176 |
| GCAP1 | 473±262 | 83.8±47.8 | 322±181 | 207±80 |
| GCAP2 | 818±203 | 158±120 | 229±71 | 595±313 |

5. Предполагаемая функция комплексов НКС с кавеолином-1 в зрительной системе

Результаты проведенной работы позволяют высказать несколько гипотез, касающихся физиологической роли впервые обнаруженных нами комплексов белков НКС с кавеолином-1 в нормальной и патологической фоторецепторных системах. Мы предполагаем, что в норме при низком уровне кальция фоторецепторные рафт-структуры содержат резервный пул белков НКС за счет их связывания с кавеолином-1. Это может обеспечить более быструю реакцию компонентов зрительной системы в целом на кальциевые сигналы (например, при восстановлении темнового состояния фоторецепторной клетки) или (как в случае GCAP2) более эффективную регуляцию эффекторных ферментов в рафт-структурах, по сравнению с остальной частью фоторецепторной мембраны (Рис. 14).

В условиях окислительного стресса, характерного для многих патологических состояний сетчатки, рафт-структуры могут наоборот выступать в роли резервуара, изолирующего окисленный рековерин (и, возможно, другие окисленные НКС) за счет его большего сродства к кавеолину-1. При поступлении сигнала на фосфорилирование кавеолина-1 по остатку Y14 указанный комплекс диссоциирует и окисленный рековерин высвобождается, запуская aberrantные сигнальные каскады, вызывающие апоптоз клетки. Альтернативной функцией обнаруженных комплексов может быть утилизация окисленного рековерина, поскольку известно, что кавеолин-1 служит переносчиком белков между местом их функционирования и лизосомальной системой, а его фосфорилирование стимулирует отпочкование кавеол из мембран и интенсифицирует этот транспорт.

Функционирование фоторецепторной системы в норме

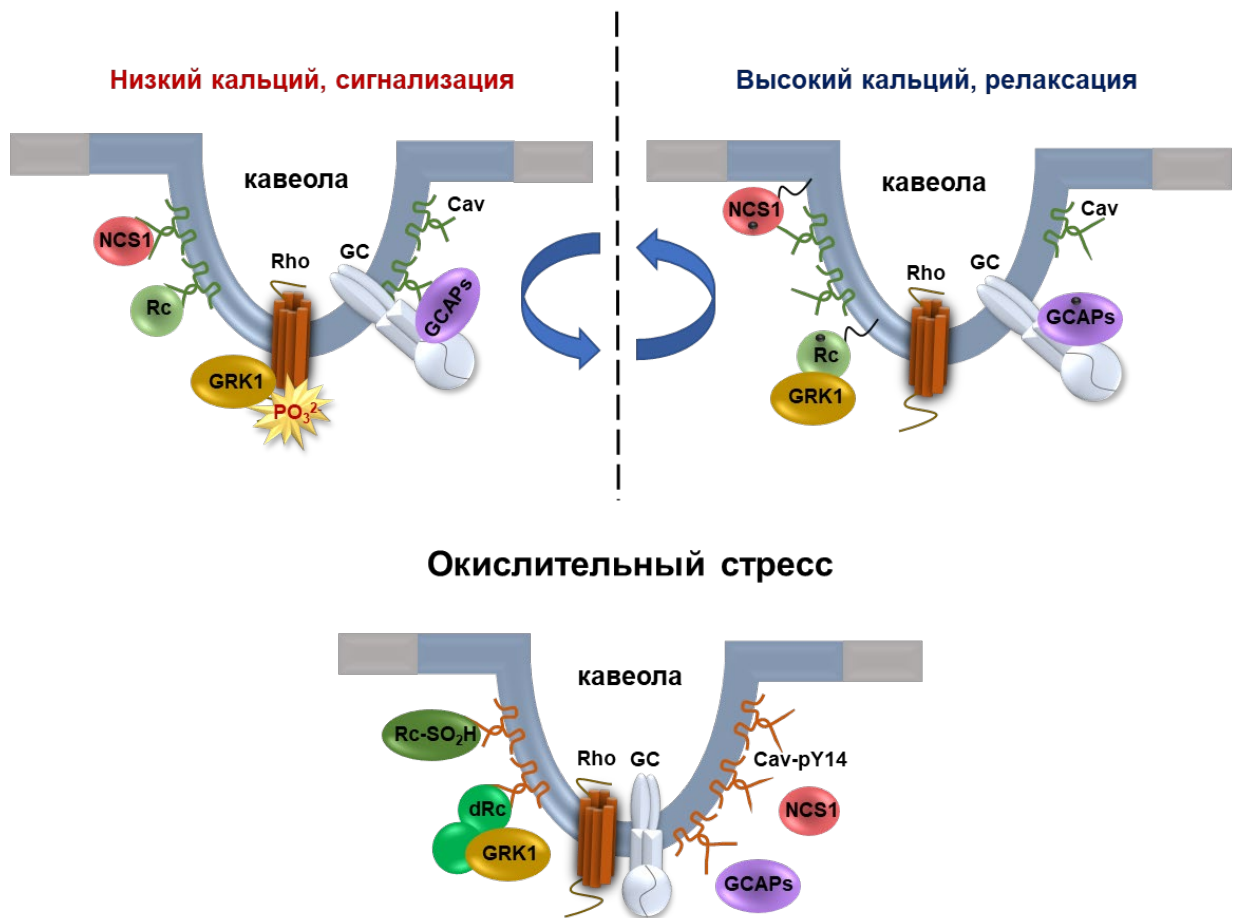


Рисунок 14. Возможное участие кавеолина-1 в регуляции зрительной трансдукции в норме и при окислительном стрессе. Cav – кавеолин-1; Cav-pY14 – фосфорилированный кавеолин-1; Rc – рековерин; dRc – дисульфидный димер рековерина; Rc-SO₂H – рековерин, окисленный по остатку цистеина с образованием сульфеновой кислоты; Rho – родопсин; GRK1 – родопсинкиназа; GCAPs – белки активаторы гуанилатциклазы 1 и 2; GC – гуанилатциклаза, NCS1 – нейрональный кальциевый сенсор 1.

6. ВЫВОДЫ

1. В фоторецепторных клетках сетчатки бескальциевые формы белков семейства НКС рековерина, NCS-1, GCAP1 и GCAP2 локализуются в мембранных рафт-структурах совместно с кавеолином-1.
2. Бескальциевые формы рековерина, NCS-1, GCAP1 и GCAP2 образуют комплексы с как с N-концевым цитоплазматическим участком кавеолина-1 M1-R101, так и с каркасным доменом F81-R101, входящим в его состав, которые характеризуются константами диссоциации в субмикромольном диапазоне и диссоциируют в присутствии кальция.
3. Связывание бескальциевой формы рековерина с кавеолином-1 происходит не за счет канонической последовательности ArXXXXArXXAr, обнаруженной в N-концевом домене белка, а с участием структурного сайта, формирующегося в его C-концевом домене и включающего остатки F106 и F172, в то время как остаток W156, по-видимому, важен для поддержания структуры кавеолин-1-связывающего кармана в этом домене белка.
4. Образование комплекса с кавеолином-1 стимулирует сигнальную активность бескальциевой формы GCAP2 по активации фоторецепторной гуанилатциклазы.
5. Образование комплекса с кавеолином-1 увеличивает сродство рековерина к ионам кальция за счет опосредованного влияния на Ca^{2+} -связывающий центр EF-2 белка и, как следствие, повышает Ca^{2+} -чувствительность его сигнальной активности – регуляции фосфорилирования зрительного рецептора родопсина под действием GRK-1.
6. В условиях окислительного стресса рековерин способен окисляться по единственному в его структуре, консервативному среди НКС остатку цистеина с образованием дисульфидного димера, что усиливает его взаимодействие с кавеолином-1.
7. Мутация кавеолина-1 Y14E, имитирующая фосфорилирование белка в условиях окислительного стресса, ослабляет его взаимодействие с бескальциевыми формами НКС.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

В рецензируемых журналах

1. **Vasily I. Vladimirov**, Viktoriia E. Baksheeva, Irina V. Mikhailova, Ramis G. Ismailov, Ekaterina A. Litus, Natalia K. Tikhomirova, Aliya A. Nazipova, Sergei E. Permyakov, Evgeni Yu. Zernii and Dmitry V. Zinchenko. A Novel Approach to Bacterial Expression and Purification of Myristoylated Forms of Neuronal Calcium Sensor Proteins. *Biomolecules* 2020, 10, 1025.
2. **Vladimirov V.I.**, Zernii E.Yu., Baksheeva V.E., Wimberg H., Kazakov A.S., Tikhomirova N.K., Nemashkalova E.L., Mitkevich V.A., Zamyatnin A.A., Lipkin V.M., Philippov P.P., Permyakov S.E., Senin I.I., Koch K-W., Zinchenko D.V. Photoreceptor calcium sensor proteins in detergent-resistant membrane rafts are regulated via binding to caveolin-1. *Cell Calcium*, 2018, V. 73, P. 55-69.
3. Zernii E.Y., Nazipova A.A., Nemashkalova E.L., Kazakov A.S., Gancharova O.S., Serebryakova M.V., Tikhomirova N.K., Baksheeva V.E., **Vladimirov V.I.**, Zinchenko D.V., Philippov P.P., Senin I.I. and Permyakov S.E. Light-Induced Thiol Oxidation of Recoverin Affects Rhodopsin Desensitization. *Front. Mol. Neurosci.*, 2019, 11, 474, P. 168-186.
4. Zernii E.Y., Zinchenko D.V., **Vladimirov V.I.**, Grigoriev I.I., Skorikova E.E., Baksheeva V.E., Lipkin V.M., Philippov P.P., Senin I.I. Ca²⁺-dependent regulatory activity of recoverin in photoreceptor raft structures: the role of caveolin-1. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, 2014, V. 8(1), P. 44–49.

Публикации в материалах научных мероприятий

1. Фоторецепторные Ca²⁺-сенсоры: выявление участков структуры, обеспечивающих мембранную локализацию. Зерний Е.Ю., **Владимиров В.И.**, Пермяков С.Е., Назипова А.А., Зинченко Д.В., Филиппов П.П., Сенин И.И. 17-ая Международная Пушинская школа-конференция молодых учёных “Биология – наука XXI века”, Пушино, 22-26 апреля. 2013 г. Тезисы докладов, с. 264.
2. Исследование сигнальной активности комплекса фоторецепторного Ca²⁺-сенсора рековерина с каркасным белком кавеоллином-1. **Владимиров В.И.**, Сенин И.И., Григорьев И.И., Зерний Е.Ю., Зинченко Д.В. 18-ая Международная Пушинская школа-конференция молодых учёных “Биология – наука XXI века”, Пушино, 21-25 апреля. 2014 г. Тезисы докладов, с. 137.
3. Neuronal calcium sensor 1: ubiquitous neuronal protein in photoreceptor system. Baksheeva V.E., Gancharova O.S., **Vladimirov V.I.**, Loboda A.P., Tikhomirova N.K.,

- Zinchenko D.V., Serebryakova M.V., Senin I.I., Philippov P.P., Zamyatnin A.A., Zernii E.Yu. 2nd European meeting on Phototransduction. Ascona, Switzerland, September 4-7. 2016. Abstract, p. 8.
4. The impact of caveolin-1 to regulatory function of Ca^{2+} -sensor recoverin in phototransduction system. **Vladimirov V.I.**, Zernii E.Y., Baksheeva V.E., Senin I.I., Permyakov E.I., Lipkin V.M., Zinchenko D.V. The 12th International scientific conference on bioorganic chemistry devoted to the memory of professor Yuri Ovchinnikov, 8th Russian symposium “Proteins and peptides” Moscow, Russia, September 18–22, 2017. Abstract, p. 66
 5. Регуляция нейрональных кальциевых сенсоров в фоторецепторных рафт-структурах. **Владимиров В.И.**, Зинченко Д.В. Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2018», Апрель 9-13. 2018г. М.: МАКС Пресс, 2018. Тезисы докладов секция биология, подсекция Биохимия.
 6. **Vladimirov V.I.**, Zernii E.Yu., Koch K-W., Baksheeva V.E., Wimberg H., Zamyatnin Jr. A.A., S. Permyakov S.E., Kazakov A.S., Senin I.I., Tikhomirova N.K., Zinchenko D.V. Caveolin-1 as a regulator of neuronal calcium sensor proteins in phototransduction system. *FEBS Open Bio*, Vol. 8 (Suppl. S1), 2018, 107–496, p.355.
 7. Механизмы взаимодействия кавеолина-1 и GCAPs фоторецепторной клетки. Доктор А.О., **Владимиров В.И.**, Зерний Е.Ю., Бакшеева В.Е., Сенин И.И., Зинченко Д.В. 22-ая Международная Пушинская школа-конференция молодых учёных “Биология – наука XXI века”, Пушино, 23-27 апреля, 2018 г. Тезисы докладов, с. 188-189.
 8. Влияние фосфорилирования кавеолина-1 на взаимодействие с белками семейства нейрональных кальциевых сенсоров в фоторецепторной клетке. Михайлова И.В., **Владимиров В.И.**, Зерний Е.Ю., Зинченко Д.В. 23-ая Международная Пушинская школа-конференция молодых учёных “Биология – наука XXI века”, Пушино, 15-19 апреля, 2019 г. Тезисы докладов, с. 175.

Поддержка проекта

1. Грант РФФИ 18-04-01250 «Механизмы окислительного повреждения сетчатки глаза: редокс-регуляция с участием белков семейства нейрональных кальциевых сенсоров»