

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии им. академиков
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук**

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

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Зинченко Дмитрий Валерьевич

Москва 2020 г.

Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	7
ВВЕДЕНИЕ.....	9
1. Обзор литературы.....	15
1.1. Ионы кальция и кальциевые сигналы.....	15
1.2. Система зрительной трансдукции.....	17
1.2.1 Строение фоторецепторной сетчатки.....	17
1.2.2. Морфология и состав наружных сегментов палочек.....	19
1.2.3. Система передачи зрительного сигнала.....	20
1.3. Кальцийсвязывающие белки зрительной системы.....	23
1.3.1 Разнообразие и эволюция белков НКС.....	23
1.3.2. EF-hand-мотив – Ca ²⁺ -связывающий центр в структуре НКС.....	25
1.3.3. Взаимодействие НКС с ионами металлов.....	28
1.3.4. Механизм Ca ²⁺ -миристоильного переключателя и его влияние на функциональную активность и мембранную локализацию НКС.....	29
1.3.5. Редокс-зависимость функционирования НКС при патологиях сетчатки.....	31
1.4. Клеточные мембраны.....	33
1.4.1 Строение и функции биологических мембран.....	33
1.4.2. Роль холестерина в строении и свойствах биологических мембран.....	34
1.4.3. Некавеолярные рафт-структуры.....	36
1.4.4. Кавеолы: кавеолярные рафт-структуры.....	37
1.4.5. Формирование кавеол.....	38
1.5. Кавеолины.....	40
1.5.1. Общая характеристика белков семейства кавеолинов.....	40

1.5.2. Кавеолин-1: доменная организация	41
1.5.3. Кавеолин-1: представления о структурной организации.....	42
1.5.4. Кавеолин-1: функциональные свойства.....	44
1.5.5. Кавеолин-1: функциональный (scaffolding domain)	45
1.5.6. Сайт фосфорилирования Y14, как регулятор функциональной активности кавеолина-1	46
1.5.7. Роль кавеолина-1 при окислительном стрессе.....	48
2. Экспериментальная часть.....	50
2.1. Материалы и реактивы	50
2.2. Методы	50
2.2.1. Получение плазмидной ДНК	50
2.2.2. Получение фрагмента N-концевого домена кавеолина-1 (M1-R101) и введение точечной мутации Y14E.....	51
2.2.3. Получение генетической конструкции, содержащей фрагмент N-концевого домена кавеолина-1 (M1-R101).....	52
2.2.4. Получение генетических конструкций мутантных форм рековерина ..	52
2.2.5. Приготовление компетентных клеток.....	53
2.2.6. Трансформация клеток E.coli плазмидной ДНК.....	53
2.2.7. Получение и очистка белка, соответствующих N-концевому фрагменту кавеолина-1 (M1-R101).....	53
2.2.8. Получение функционального домена кавеолина-1 (F81-R101)	54
2.2.9. Экспрессия белков НКС в клетках E.coli	55
2.2.10. Очистка рекомбинантного рековерина дикого типа из клеток E.coli..	55
2.2.11. Очистка рекомбинантного NCS1 дикого типа из клеток E.coli	56

2.2.12. Очистка рекомбинантных GCAP1 и GCAP2 дикого типа из клеток E.coli.....	56
2.2.13. Разделение миристоилированной и немиристоилированной форм НКС	57
2.2.14. Определение степени миристоилирования рекомбинантных НКС.....	57
2.2.15. Ковалентная иммобилизация Cav на Sepharose CL-4B	57
2.2.16. Изучение гомогенности препаратов N-концевого фрагмента кавеолина-1 методом динамического светорассеяния.....	58
2.2.17. Определение структурного состава различных форм N-концевого фрагмента кавеолина-1 методом спектроскопии кругового дихроизма	58
2.2.18. Получение наружных сегментов палочек (НСП) сетчатки	58
2.2.19. Получение рафт-структур из НСП	59
2.2.20. Получение родопсинкиназы и отмытых мочевиной мембран НСП....	60
2.2.21. Фосфорилирование родопсина в суспензии НСП	61
2.2.22. Определение активности родопсинкиназы в реконструированной системе.....	61
2.2.23. Определение активности гуанилатциклазы в реконструированной системе.....	62
2.2.24. Преципитация белков на аффинном сорбенте (Pull-down assay).....	62
2.2.25. Взаимодействие функционального домена кавеолина-1 с НКС	63
2.2.26. Взаимодействие функционального домена кавеолина-1 с реверерином методом ППР.	64
2.2.27. Взаимодействие N-концевого фрагмента кавеолина-1 с миристиновой кислотой	65
2.2.28. Дисульфидная димеризация реверерина дикого типа in vitro.....	65

2.2.29. Дисульфидная димеризация реверина при окислительном стрессе в клетках линии MDCK	66
2.3. Аналитические процедуры.....	67
2.3.1. Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ).....	67
2.3.2. Иммуноблоттинг	67
2.3.3. Определение концентрации белков.....	68
2.3.4. Приготовление кальциевых буферов и определение количества кальция, связанного с реверинном	69
2.3.5. Компьютерное моделирование и вычисления	70
2.3.6. Вспомогательное программное обеспечение	71
3. Результаты и их обсуждение.....	72
3.1. Совместная локализация белков семейства НКС с кавеолном-1 в рафт-структурах НСП	72
3.2. Очистка белков семейства НКС	74
3.3. Получение и характеристика рекомбинантных белков, соответствующих N-концевому цитоплазматическому участку кавеолина-1	77
3.4. Исследование взаимодействия НКС с N-концевым цитоплазматическим участком кавеолина-1	79
3.5. Взаимодействие N-концевого фрагмента кавеолина-1 с миристиновой кислотой	81
3.6. Установление сайта связывания НКС в N-концевом цитоплазматическом участке кавеолина-1	82
3.7. Проверка функциональности канонического сайта связывания кавеолина-1, обнаруженного в структуре НКС	84
3.8. Идентификация нового сайта связывания кавеолина-1 в структуре НКС....	85

3.9. Предсказание структурного механизма взаимодействия кавеолина-1 с рековерином.....	87
3.10. Эффект кавеолина-1 на регуляторную активность НКС	90
3.11. Влияние кавеолина-1 на Ca ²⁺ -чувствительность рековерина.....	91
3.12. Исследование редокс-чувствительности рековерина <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i>	93
3.13. Компьютерное моделирование N-концевого фрагмента кавеолина-1	100
4. Заключение	103
5. Выводы	107
6. Список литературы	107

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДТТ	Дитиотреитол
ИПТГ	Изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид
НСП	Наружный сегмент палочки
myr	Миристоилированная форма белка
n-myr	Не миристоилированная форма белка
Rec	Рековерин (Recoverin)
WT	Белок дикого типа
GCAP1	Белок активатор гуанилатциклазы-1 Guanylate cyclase activating protein-1
GCAP2	Белок активатор гуанилатциклазы-2 Guanylate cyclase activating protein-2
NCS1	Нейрональный кальциевый сенсор – 1 Neuronal calcium sensor-1
НКС	Нейрональные кальциевые сенсоры (семейство белков)
МК	Миристиновая кислота
КМК	Критическая мицелярная концентрация
ППР	Спектроскопия плазмонного резонанса
SDS	Додецил сульфат натрия
Tris	Трис(гидроксиметил)аминометан
EDTA	Этилендиаминтетрауксусная кислота
EGTA	бис-(2-аминоэтиловый) эфир этиленгликоль-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты
Tween-20	Полисорбат-20
Triton X-100	Полиэтиленгликоль р-(1,1,3,3-тетраметилбутил)-фениловый эфир
ТФУ	Трифторуксусная кислота
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
K _D	Константа диссоциации
EF-hand	Ca ²⁺ -связывающий центр типа EF-hand
EF1	Первый Ca ²⁺ -связывающий центр типа EF-hand
EF2	Второй Ca ²⁺ -связывающий центр типа EF-hand

EF3	Третий Ca^{2+} -связывающий центр типа EF-hand
EF4	Четвёртый Ca^{2+} -связывающий центр типа EF-hand
$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{своб}}$	Равновесная концентрация свободного кальция
Cav	N-концевой фрагмент кавеолина-1 M ¹ -R ¹⁰¹
CavE	N-концевой фрагмент кавеолина-1 M ¹ -R ¹⁰¹ с точечной аминокислотной заменой Y-14-E
Cav81-101	Функциональный домен кавеолина-1 F ⁸¹ -R ¹⁰¹
DRM	Детергент-устойчивые мембран (detergent resistant membranes)
CIS	Сайт взаимодействия с кавеолином-1 (Caveolin-1 interaction site)
ИКТ	Изотермическая калориметрия титрования
ППР	Поверхностный плазмонный резонанс

ВВЕДЕНИЕ

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 аберрантных 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 встроен 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, обогащённые 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 рековерина) 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 реверина 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, GСАР1 и GСАР2 локализируются в фоторецепторных рафт-структурах совместно с кавеолином-1.
2. Рековерин, NCS-1, GСАР1 и GСАР2 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 GСАР2.
5. В случае рековерина связывание с кавеолином-1 повышает Ca^{2+} -чувствительность белка.

6. Окисление реверина 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.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Ионы кальция и кальциевые сигналы

Способность адекватно реагировать на внеклеточные стимулы (первичные мессенджеры) определяет основные биологические функции клетки. Эволюционно именно ионы кальция приняли на себя роль универсальных внутриклеточных сигнальных посредников (вторичных мессенджеров), с помощью которых происходит регулирование основных биохимических процессов клетки. Изменения концентрации кальция запускают многочисленные внутриклеточные сигналы, и обеспечивают взаимодействие клеток друг с другом (внеклеточные сигналы). Сигналы, воспринимаемые клетками извне, могут быть различной природы (гормоны, нейротрансмиттеры, феромоны, цитокины и др.), однако внутри клетки все они преобразуются в кальциевый сигнал, и, возможно, клеточный ответ, реализующийся в конечном итоге, в виде выброса первичного мессенджера [1]. Это делает кальций универсальным средством восприятия и передачи клеточных событий. В зависимости от длительности и амплитуды кальциевых сигналов происходит активация различных сигнальных путей, регулирующих как нормальное функционирование клетки, так и патологические процессы. Для точной реакции на конкретный кальциевый сигнал клетки оснащены сложным механизмом, обеспечивающим кальциевый гомеостаз, включающим в себя кальциевые каналы в цитоплазматической мембране и мембранах органелл/внутриклеточных кальциевых депо, АТФ-зависимые каналы, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменники, цитозольные Ca^{2+} -буферные и Ca^{2+} -сенсорные белки, [2].

В состоянии покоя концентрация кальция в цитоплазме поддерживается на уровне 10^{-7} М. Стимуляция клетки сопровождается кратковременным увеличением концентрации кальция до 10^{-6} - 10^{-5} М. Это приводит к активации Ca^{2+} -сенсорных белков, которые, в свою очередь, оказывают влияние на разнообразные клеточные процессы.

По оказываемым эффектам Ca^{2+} -связывающие белки можно разделить на сенсорные и буферные. Так, Ca^{2+} -сенсорный белок кальмодулин принимает участие в широком спектре клеточных процессов, включая деление клеток,

дифференцировку, транскрипцию генов, синтез ДНК и сокращение мышц [3]. Кальмодулин регулирует более 100 мишеней как в растениях, так и в клетках животных, среди которых несколько фосфодиэстераз, синтаза оксида азота, аденилатциклазы 1 и 8, несколько ионных каналов и ряд белков цитоскелета. Считается, что кальмодулин принимает участие во многих патологических процессах, таких как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера [4] или ревматоидный артрит [5]. Тропонин С являющийся изоформой кальмодулина в поперечнополосатых мышцах, регулирует взаимодействие между актином и миозином [6]. Белки семейства S100 не являются строго Ca^{2+} -связывающими, так как кроме кальция могут координировать Zn^{2+} и Cu^{2+} (в сайтах, не конкурирующих с сайтами связывания кальция), что играет важную роль в хемотаксисе и гомеостазе ионов токсичных металлов [7]. S100 регулируют множество мишеней, и, таким образом, принимают участие в процессах роста и дифференцировки клеток, регуляции клеточного цикла, активности транскрипции, и функционирования рецепторов клеточной поверхности [8]. Сигнальная активность белков семейства S-100 характеризуется четким профилем клеточной локализации и специфической экспрессией в определённых тканях. Аномальная экспрессия гена S100 наблюдается при различных патологических состояниях, включая хроническое воспаление, рак, кардиомиопатию, болезнь Альцгеймера и псориаз [9] [10].

Несмотря на то, что кальциевые сигналы являются адаптивными, и необходимы для правильного функционирования клетки, важно чтобы функциональный кальциевый сигнал был кратковременным, поскольку продолжительные сигналы приводят к включению проапоптотических сигнальных механизмов [11]. Здесь обнаруживается буферная (гомеостатическая) функция Ca^{2+} -связывающих белков, которая играет важную роль в поддержании определённого уровня кальция в клетке. Так действуют, например, белки семейства парвальбумина. Это небольшие (11 кДа), хорошо растворимые в воде белки, которые, как принято считать, функционируют главным образом как цитозольные кальциевые буферы [12]. Это функция чётко наблюдается в мышечной ткани, где парвальбумин облегчает процесс расслабления быстро

сокращающихся мышц путем транспортировки кальция в саркоплазматический ретикулум. Парвальбумины присутствуют и в других тканях, таких как кости, зубы, кожа, мозг, т.д., где принимают участие в таких клеточных процессах, как хемотаксис, эндокринная регуляция и др. [13]. Другой пример белка, регулирующего кальциевый гомеостаз – кальсеквестрин (42 кДа), который локализуется в саркоплазматическом ретикулуме и на 40% состоит из остатков глутаминовой и аспарагиновой кислот, что определяет его аномально высокую кальциевую ёмкость: одна молекула кальсеквестрина может связать от 18 до 50 ионов кальция. Кальсеквестрин помогает удерживать высокий уровень кальция внутри саркоплазматического ретикулума после сокращения мышц, несмотря на то что уровень его в цитозоле сильно падает [14]. Кальсеквестрин-2, экспрессируемый в сердечной ткани играет важную роль в регуляции сердечной деятельности. Мутации в гене кальсеквестрина ассоциируют с сердечной аритмией и внезапной смертью [15]. Широкий спектр функций, реализуемых Ca^{2+} -связывающими белками, и их особая роль в регуляции процессов жизнедеятельности ставит их изучение в ряд перспективнейших направлений современной науки. В настоящей работе мы сфокусируемся на системе фоторецепции позвоночных как на одном из примеров сигнальной системы, где важная регуляторная роль отведена Ca^{2+} -связывающим белкам.

1.2. Система зрительной трансдукции

1.2.1 Строение фоторецепторной сетчатки

За прием и передачу световых сигналов у позвоночных животных отвечает сетчатка – нервная ткань, состоящая из порядка 10-ти слоёв клеток (рис. 1), отвечающих за рецепторную функцию, а также обработку сигнала и проведение нервного импульса в мозг [16]. В сетчатке происходят анализ зрительной информации и выделение наиболее существенных элементов зрительных образов, например, направления и скорости движения объекта, его величины. Наиболее важный первичный элемент сетчатки – фоторецепторные клетки, палочки и колбочки. Палочек в сетчатке человека примерно 120 млн., причем расположены они преимущественно по периферии ее зрительной части. Колбочки (их около 7

млн.) концентрируются в центральной ее зоне, причем их плотность особенно высока в центральной ямке (фовеа). Палочки отвечают за сумеречное зрение при низкой освещенности, которое имеет малую разрешающую способность (остроту) и преобладают у животных, ведущих ночной образ жизни. Колбочки эффективно работают при достаточно ярком освещении и обеспечивают цветное зрение, имеющее высокую остроту [17]. Далее мы подробно остановимся на функционировании системы передачи зрительного сигнала, расположенной в наружных сегментах палочек.

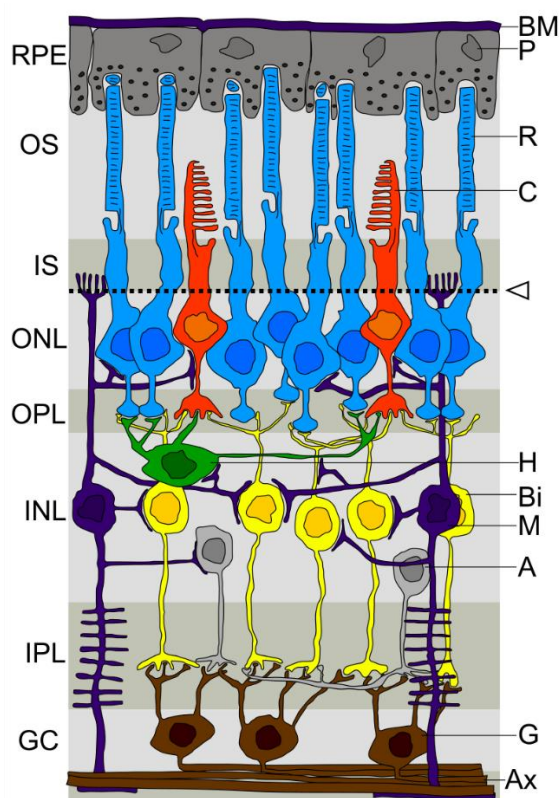


Рисунок 1. Строение сетчатки*. RPE — пигментный эпителий сетчатки, OS — наружный сегмент фоторецепторов, IS — внутренний сегмент фоторецепторов, ONL — внешний ядерный слой, OPL — внешний сплетениевидный слой, INL — внутренний ядерный слой, IPL — внутренний сплетениевидный слой, GC — ганглионарный слой, BM — мембрана Бруха, P — пигментные эпителиоциты, R — палочки, C — колбочки, стрелка и пунктирная линия — внешняя пограничная мембрана, H — горизонтальные клетки, B — биполярные клетки, M — Клетки Мюллера, A — амакриновые клетки, G — ганглионарные клетки, AX — аксоны.

**(адаптировано из <https://ru.wikipedia.org/wiki/сетчатка>)*

1.2.2. Морфология и состав наружных сегментов палочек

Наружный сегмент фоторецепторных клеток своим окончанием вдаётся в пигментный слой сетчатки. У палочек наружные сегменты тонкие цилиндрические, у колбочек они значительно более утолщенные – отсюда и название этих фоторецепторных клеток. Через тонкую ножку (цилию) наружный сегмент соединен с внутренним, который обращен внутрь глаза.

Внутренний сегмент фоторецепторных клеток содержит ядро, митохондрии, эндоплазматический ретикулум и другие клеточные органеллы и характеризуется очень высокой метаболической активностью. В отличие от большинства других нейронов, которые выбрасывают нейромедиатор в состоянии возбуждения, фоторецепторные клетки выделяют его в состоянии покоя (в темноте), тогда как при их фотовозбуждении выделение нейромедиатора подавляется. Нейромедиатор (глутамат) воздействует затем на постсинаптические окончания дендритов биполярных, а затем и ганглиозных клеток, и от них сигнал по волокнам зрительного нерва передаётся в клетки мозга [18].

Морфология НСП весьма своеобразна. НСП имеет цилиндрическую форму и по диаметру примерно соответствует внутреннему сегменту палочки. У человека диаметр НСП составляет 2 мкм, длина его равна 40-60 мкм, объем $1,6 \times 10^{-13}$ л; у быка соответствующие параметры НСП составляют 2 мкм, 7-10 мкм, $2,7 \times 10^{-14}$ л, у лягушки 5-7 мкм, 35-50 мкм, 1×10^{-12} л [19]. Подавляющая часть мембран НСП – это мембраны стопки плотно упакованных фоторецепторных дисков, образующихся как из плазматической мембраны. На саму плазматическую мембрану приходится всего лишь 1-5% общей массы мембран НСП [20]. Состав НСП также необычен. Фоторецепторные диски – главный структурный элемент НСП – построены почти исключительно из белков и липидов (около 60 и 40% общей массы мембран соответственно). Углеводов в НСП немного – лишь 4% их общего сухого веса. В цитоплазме НСП, заполняющей узкие просветы между мембраной дисков, главный компонент – это белки [21]. Белковый состав НСП уникален. Исторически белки НСП в зависимости от их поведения в гипотонической среде (в растворе с концентрацией соли около 10 мМ) разделяли на интегральные мембранные и

экстрагируемые. Интегральные мембранные белки НСП остаются в связанном с мембранами состоянии даже после их интенсивной экстракции. Таких белков около 70% (общего количества белков в НСП), причем их основная доля – около 95% – приходится на зрительный рецептор родопсин [22]. Общая масса экстрагируемых белков НСП меньше массы интегральных, но их намного больше по номенклатуре: первых в НСП порядка 70 типов, вторых, немногим более 10. Больше всего в экстрагируемой фракции G-белка трансдуцина, количество которого примерно в 10 раз меньше по сравнению с родопсином. Далее следует белок аррестин – его в НСП в несколько раз меньше, чем трансдуцина. Еще несколько белков представлено в 10-100 раз меньшем количестве, чем трансдуцин. Среди них функционально наиболее важные – фосфодиэстераза циклического GMP (сGMP-фосфодиэстераза), родопсинкиназа, гуанилатциклаза, рековерин и белки активаторы гуанилатциклазы [23][24].

1.2.3. Система передачи зрительного сигнала

Белковый каскад передачи зрительного сигнала позвоночных располагается в наружных сегментах фоторецепторных клеток – палочек и колбочек. Физиологический ответ на световой сигнал в наружном сегменте палочки опосредован фосфодиэстеразным каскадом (Рис. 2). В темноте белки каскада, а именно рецептор родопсин, G-белок трансдуцин и эффекторный фермент цГМФ фосфодиэстераза находятся в инактивированном состоянии. Уровень вторичного мессенджера цГМФ высокий, цГМФ-зависимые Ca^{2+} -каналы в плазматической мембране открыты и катионы (Ca^{2+} и Na^{+}) поступают внутрь клетки. Как следствие, плазматическая мембрана фоторецептора находится в слабо поляризованном состоянии (примерно -35 мВ). Концентрация кальция в адаптированной в темноте фоторецепторной клетке постоянна и поддерживается на уровне около 500-1000 нМ благодаря активности светонезависимого $Na^{+}/K^{+},Ca^{2+}$ -обменника [25]. В результате поглощения кванта света происходит изомеризация 11-цис-ретиная – хромофорной группы молекулы родопсина – в полностью-транс-ретиная что приводит к переходу родопсина в фотовозбужденное состояние (Rho^{*}). В этом состоянии родопсин активирует G-

белок трансдуцин: α -субъединица трансдуцина, на которой происходит обмен ГДФ на ГТФ, что приводит к диссоциации от его $\beta\gamma$ -субъединиц. ГТФ-содержащая α -субъединица трансдуцина активирует фосфодиэстеразу, которая гидролизует цГМФ до ГМФ. При снижении уровня цГМФ цГМФ-зависимые каналы закрываются, из-за чего прекращается поступление Ca^{2+} в клетку, в то время как Na^+/K^+ , Ca^{2+} -обменник продолжает функционировать, приводя к уменьшению концентрации свободного кальция до $\sim 20\text{-}50$ нМ. В результате происходит гиперполяризация плазматической мембраны фоторецепторной клетки, что приводит к прекращению выброса глутамата в ее синаптических окончаниях и обуславливает электрофизиологический ответ. Зрительный сигнал передается через нейроны высшего порядка по зрительному нерву в соответствующие отделы головного мозга [26]. В процессе передачи зрительного сигнала происходит его многократное усиление, первым этапом которого является активация тысяч молекул трансдуцина единственной молекулой Rho^* . Второй этап усиления – гидролиз каждой молекулой активированной фосфодиэстеразы около трёх тысяч молекул цГМФ [27].

Снижение концентрации кальция в цитоплазме НСП служит сигналом для возврата фоторецепторной клетки из фотовозбуждённого состояния в исходное, в котором она находилась до действия светового стимула. Цепь событий, приводящих к восстановлению темнового состояния фоторецепторной клетки, можно представить следующим образом. Произошедшее под действием света снижение концентрации кальция приводит к диссоциации комплекса рековерина с родопсинкиназой (RK), последняя получает возможность связываться с цитоплазматическими петлями родопсина и фосфорилирует С-концевой участок фотовозбуждённого рецептора. В результате этого снижается каталитическая эффективность родопсина; комплекс между RK и $\text{Rho}^*\text{-P}$ диссоциирует, поскольку RK обладает способностью к аутофосфорилированию, и ее аутофосфорилированная форма обладает сниженным сродством к $\text{Rho}^*\text{-P}$; после взаимодействия место RK на молекуле $\text{Rho}^*\text{-P}$ занимает аррестин, связывание которого полностью блокирует активацию трансдуцина [28]. Одновременно с этим, при низких концентрациях кальция белки GCAP1 и GCAP2,

последовательно активируют фоторецепторные гуанилатциклазы, которые восстанавливают темновой уровень цГМФ (рис. 2) [29].

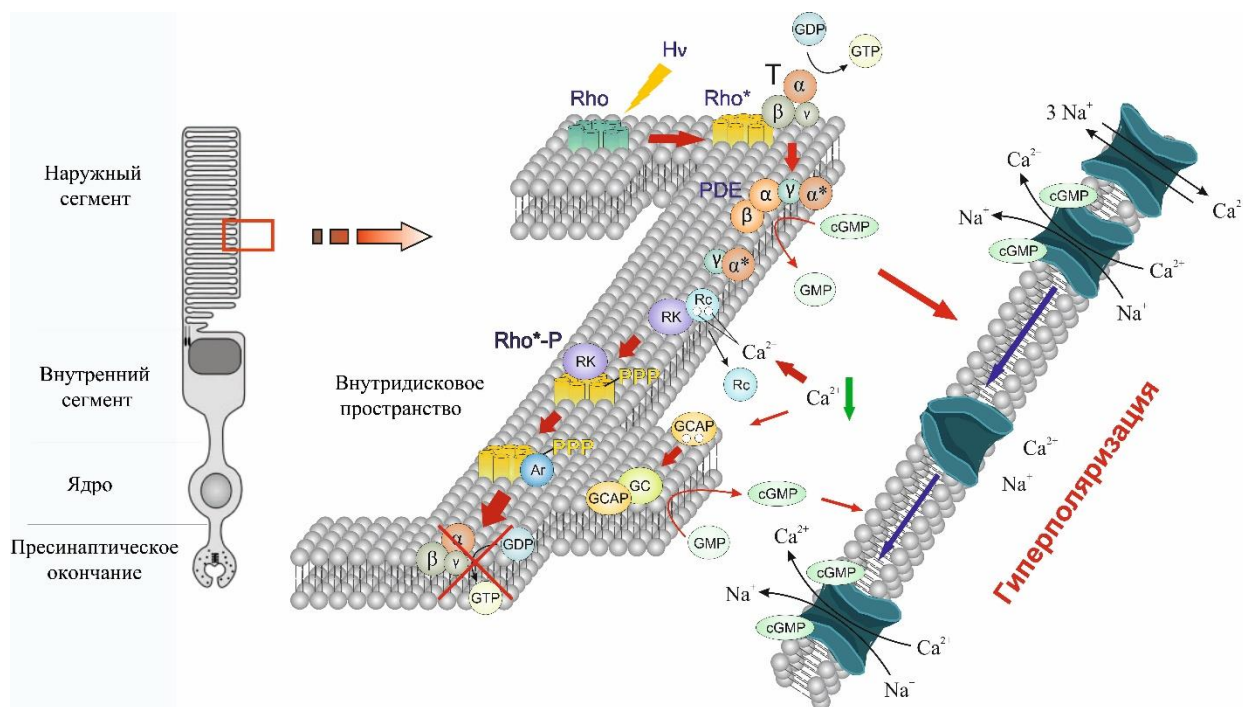


Рисунок 2. Общая схема молекулярных механизмов зрительной трансдукции. Rho, Rho*, Rho*-P – темновой, фотовозбуждённый и фосфорилированный родопсин соответственно; Gt – трансдуцин; PDE – cGMP-фосфодиэстераза; RK – родопсинкиназа; Ar – аррестин, Rc – рековерин, GC – гуанилатциклаза cGMP, GCAP – активатор гуанилатциклазы, cGMP – циклический гуанозинмонофосфат, GMP – гуанозинмонофосфат, GDP – гуанозиндифосфат, GTP – гуанозинтрифосфат.

Из представленного описания видно, что важную регуляторную роль в системе приема и передачи зрительного сигнала играют Ca^{2+} -связывающие белки – рековерин, GCAP1 и GCAP2, которые относятся к семейству НКС. Для понимания механизмов, определяющих специфику кальциевой сигнализации с участием НКС, далее мы подробно остановимся на структурных особенностях, лежащих в основе функционирования белков этого семейства.

1.3. Кальцийсвязывающие белки зрительной системы

1.3.1 Разнообразие и эволюция белков НКС

Белки семейства НКС экспрессируются главным образом в сетчатке и клетках центральной нервной системы, что указывает на особую роль этих белков в процессах генерации и проведения нервного импульса, а также в регуляции жизнедеятельности нейронов. Как и другие Ca^{2+} -сенсорные белки, НКС реагируют на изменения концентрации кальция изменением своей конформации, приобретая способность регулировать множество внутриклеточных процессов.

Семейство НКС подразделяется на несколько подсемейств: визининоподобные белки (visinin-like proteins, VILIPS), фреквенины (включают NCS1), белки активаторы гуанилатциклазы (guanylate cyclase activating proteins, GCAPs), белки, взаимодействующие с калиевыми каналами (K⁺-channel interacting proteins, KChIPs) и рековерины (рис. 3).

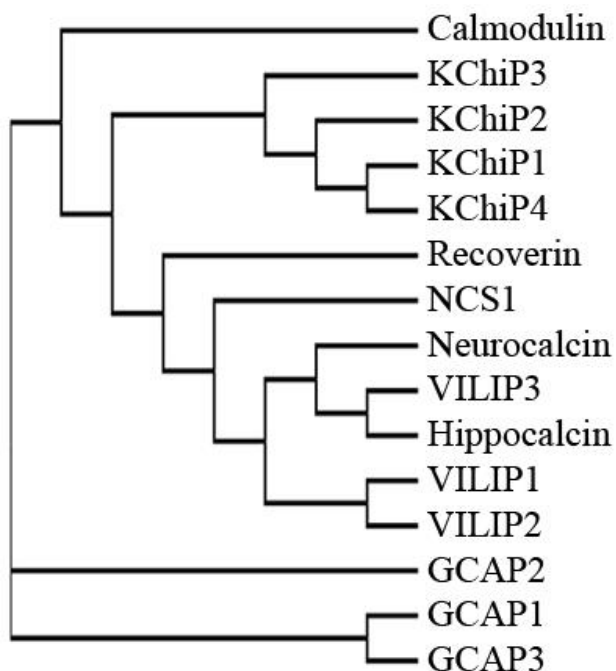


Рисунок 3. Эволюционное дерево белков, семейства НКС.

Несмотря на то что белки НКС обнаруживаются главным образом у позвоночных животных, их общим предком, по всей видимости, является NCS1, относящийся к семейству фреквенинов, так как гомологичный белок (59%) был обнаружен у *S. Cerevisiae*. У *Caenorhabditis elegans* и *Drosophila melanogaster* также встречается фреквениноподобный белок, и белок гомологичный человеческому белку VILIP-3. У птиц и млекопитающих так же были обнаружены 4 белка семейства VILIP (VILIP-1, -2, -3, и гиппокальцин). Белки активаторы фоторецепторной гуанилатциклазы – GCAPs, по-видимому, появились в период эволюции зрительного органа позвоночных. Самым «молодым» на данный момент подсемейством, является KChIPs – белки регулирующие работу подкласса К⁺-зависимых каналов А-типа, представители которого известны пока только у млекопитающих [30].

Все представители семейства НКС обладают разной степенью гомологии, которая колеблется от 10 до 90%, и в среднем составляя около 45% (табл. 1). При этом наибольшая степень гомологии (от 50 до 95%) характерна для последовательностей, отвечающих за связывание ионов кальция. Во всех НКС присутствуют четыре потенциальных Ca²⁺-связывающих центра типа EF-hand. Однако в силу эволюционных изменений, и в зависимости от выполняемых НКС функций, не все из этих центров действительно способны координировать катион у разных белков. Так, например, у NCS-1 и GCAPs активны три EF-hand центра (EF-2, EF-3, EF-4), в то время как у рековерина – только два таких центра (EF-2, EF-3) [12]. Кроме координации ионов кальция, а также магния в центры типа EF-hand, некоторые НКС, такие как рековерин и NCS1 способны связывать цинк, что существенно влияет их структуру и регуляторную активность [31].

Таблица 1. Гомология НКС (указана в процентах). CaM – кальмодулин, V1,2,3 – VILIP1,2,3 соответственно, Hc – hippocalcin, Rc – рековерин, G1,2,3 – GCAP1,2,3 соответственно, KC1,2,3,4 – KChIP1,2,3,4 соответственно. Значения получены с помощью алгоритмов расчёта <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>.

	NCS1	V1	V2	V3	Hc	Rc	G1	G2	G3	KC1	KC2	KC3	KC4	NC
CaM	27.2	29.0	26.2	25.9	28.0	25.4	27.9	28.9	27.9	21.53	22.2	30.5	25.0	31.0
NCS1	-	58.4	56.2	61.2	60.1	45.7	38.2	41.2	33.3	45.6	42.2	43.3	44.7	60.7
V1	-	-	89.0	69.7	68.6	45.8	40.7	43.1	34.2	46.3	43.5	41.2	44.6	70.0
V2	-	-	-	68.1	69.2	45.8	40.1	44.4	34.8	43.5	44.1	40.1	41.8	66.0
V3	-	-	-	-	94.3	50.8	44.2	48.0	37.7	44.3	42.6	42.1	40.3	90.7
Hc	-	-	-	-	-	51.3	43.0	46.2	36.1	44.3	44.3	41.5	41.5	88.1
Rc	-	-	-	-	-	-	35.7	34.7	29.6	35.0	35.6	35.1	34.5	50.0
G1	-	-	-	-	-	-	-	47.2	46.4	34.9	33.9	31.7	29.8	43.0
G2	-	-	-	-	-	-	-	-	36.8	35.7	35.7	33.5	31.3	47.4
G3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30.6	32.3	29.0	30.3	37.7
KC1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	71.4	69.9	76.7	42.1
KC2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	64.3	68.2	43.2
KC3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	66.9	40.9
KC4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	40.7

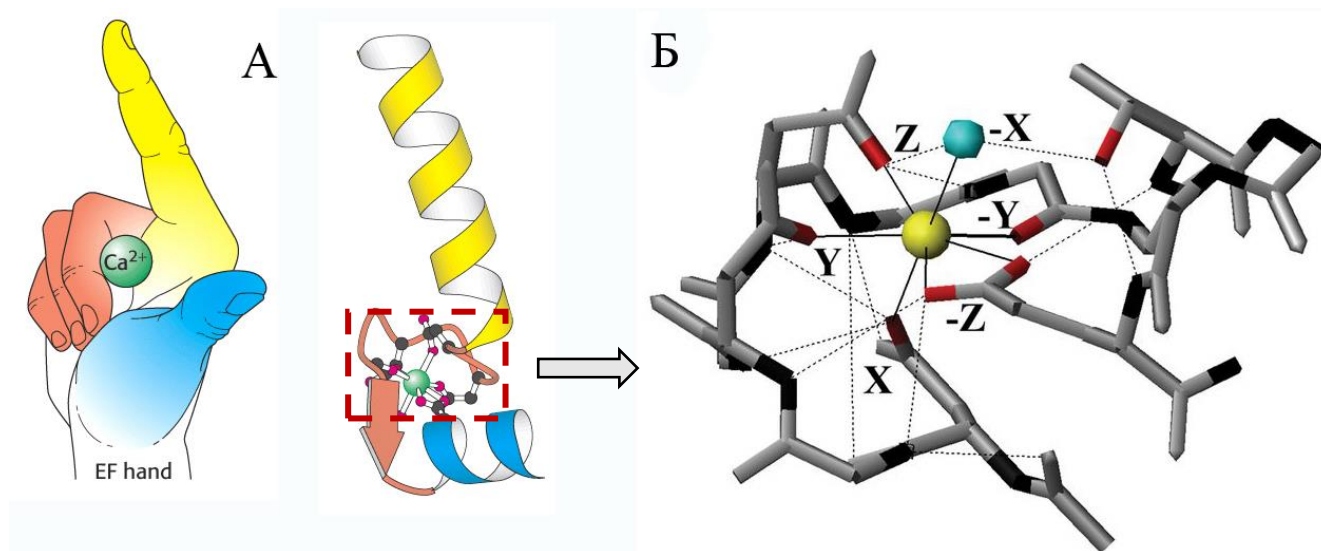
1.3.2. EF-hand-мотив – Ca²⁺-связывающий центр в структуре НКС

EF-hand-мотив состоит из петли, обрамленной с N- и C-концов α -спиралями. Обычно петля содержит 12 аминокислотных аминокислот, среди которых остатки, принимающие участие в координации Ca²⁺ (рис. 2) [26]. Общность данного структурного принципа подтверждена на основании анализа пространственных структур множества Ca²⁺-связывающих белков, содержащих EF-hand-мотив, что позволяет предсказывать способность у белка к связыванию

Ca^{2+} на основании его первичной структуры. Более того, консервативность структуры этого мотива позволяет определять, является ли он функционально активным у каждого конкретного белка или же не обладает способностью координировать Ca^{2+} ввиду отсутствия функционально важных аминокислотных остатков [28] [32].

Несмотря на структурное сходство, EF-hand-мотивы у разных белков обладают различной аффинностью и селективностью по отношению к ионам Ca^{2+} . На основании этого предложено классифицировать Ca^{2+} -связывающие участки на "структурные" и "регуляторные". "Структурные" участки при физиологических условиях всегда заняты Ca^{2+} или Mg^{2+} . "Регуляторные" участки высокоселективны по отношению к Ca^{2+} и при физиологических условиях такие Ca^{2+} -связывающие участки связывают Ca^{2+} только при увеличении его уровня в клетке [28].

Все известные представители семейства НКС имеют от 2 до 3 функционирующих участков связывания Ca^{2+} (EF1 всегда неактивен), причем основная структурно-функциональная единица представляет собой одиночный глобулярный домен, содержащий пару EF-hand-мотивов. Петли этих EF-hand-мотивов, входящие в состав одного структурно-функционального домена, взаимодействуют друг с другом, благодаря чему достигается стабилизация пространственной структуры Ca^{2+} -связывающего белка и увеличение аффинности каждого Ca^{2+} -связывающего участка к кальцию по сравнению с изолированными EF-hand (внутридоменная кооперативность). При этом у некоторых НКС (например, у реоверина) наблюдается междоменная кооперативность по связыванию Ca^{2+} за которую отвечает N-концевой остаток миристиновой кислоты, выступающий в роли своеобразного моста, функционально соединяющего N- и C-концевой домены белка [33].



Позиция остатка	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Координационный остаток	X		Y		Z		-Y		-X			-Z
Наиболее часто встречаемый	Asp 100%	Lys 29%	Asp 76%	Gly 56%	Asp 52%	Gly 96%	Thr 23%	Ile 68%	Asp 32%	Phe 23%	Glu 29%	Glu 92%
Альтернативно встречаемый		Ala Gln Thr Val Ile Ser Glu Arg	Asn	Lys Arg Asn	Ser Asn		Phe Lys Gln Tyr Glu Arg	Val Leu	Ser Thr Glu Asn Gly Gln	Tyr Ala Thr Leu Glu Lys	Asp Lys Ala Pro Asn	Asp

Рисунок 4.* Пространственная организация структуры типа “EF-hand”, А - графическое изображение, Б - схема координационных связей. На таблице отображён аминокислотный состав, наиболее часто встречаемых остатков.

*Адаптировано из [32]

Как уже говорилось, изменение уровня Ca^{2+} в фоторецепторной клетке в процессе ответа на световой стимул влечет за собой активацию ряда ферментов Ca^{2+} -зависимым образом, благодаря присутствию в клетке высокоспециализированных Ca^{2+} -сенсорных белков. Белки семейства НКС

дополняют и расширяют функциональный диапазон универсального Ca^{2+} -сенсора кальмодулина (регулирует аденилатциклазу и cGMP-зависимые каналы), модулируя активность родопсинкиназы (рековерин), и фоторецепторных гуанилатциклаз (GCAP1, GCAP2, GCAP3 и GCIP) [29].

1.3.3. Взаимодействие НКС с ионами металлов

Физиологический диапазон концентраций внутриклеточного кальция достаточно широк, и не известно ни одного Ca^{2+} -сенсорного белка, способного функционировать бы на всей его протяжённости. Однако если рассматривать кальмодулин и все белки НКС в совокупности, то уровни их Ca^{2+} -чувствительности покрывают практически весь диапазон внутриклеточных кальциевых сигналов (Рис. 5). Так, K_D комплексов НКС с Ca^{2+} , измеренные *in vitro*, варьируют от 0,06-0,2 нМ для белков GCAP [34] и 90 нМ для NCS1 [35] до 17 мкМ в случае рековерина [36], [37].

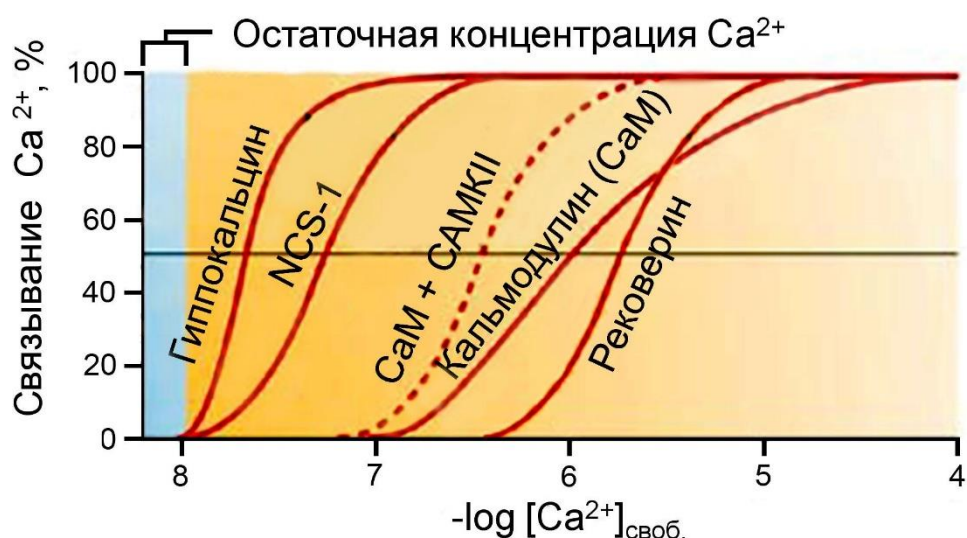


Рисунок 5. Ca^{2+} -чувствительность кальмодулина и некоторых НКС.

Сродство каждого из этих белков к ионам кальция определяется числом функциональных EF-hand и природы аминокислотных остатков в 9-м положении Ca^{2+} -связывающих петель [38]. Кроме этого, важную роль играют структурные особенности – стерическая доступность Ca^{2+} -связывающих элементов и

энергетическая выгода конформационных изменений, которые претерпевает молекула при связывании катиона.

N-концевое миристоилирование – одна из важнейших посттрансляционных модификаций у НКС, так как она оказывает значительное влияние на их Ca^{2+} -чувствительность [36]. Так, экспонирование гидрофобной миристоильной группы в раствор при связывании кальция некоторыми НКС требует энергетических затрат [39], которые компенсируются в присутствия мембран и других гидрофобных клеточных компонентов [40]. Кроме того, как уже говорилось, у некоторых НКС миристоильная группа обеспечивает кооперативность связывания кальция с центрами EF-hand, локализованными в разных доменах белка, поскольку конформационно связывает эти домены [41]. Как следствие, происходит сужение диапазона Ca^{2+} -чувствительности этих белков, что приводит к их более оперативному и селективному реагирования на изменения концентраций кальция. Кроме ионов кальция, НКС обладают также сродством к магнию, концентрация которых в клетке постоянна (около 1-2 мМ [42]),. Однако в силу небольшого радиуса этих ионов и низкой аффинности такого взаимодействия, связывание магния не переводит EF-hand мотив в открытую конформацию, как это происходит при связывании кальция, а, напротив, несколько стабилизирует его в закрытой [43].

1.3.4. Механизм Ca^{2+} -миристоильного переключателя и его влияние на функциональную активность и мембранную локализацию НКС

Процесс экспонирования миристиновой кислоты и реализация функциональной активности у НКС при связывании ионов кальция получил название кальций-миристоильный переключатель (Ca^{2+} -myristoyl switch) [44]. Сравнение структурных данных для бескальциевой и Ca^{2+} -связанной форм миристоилированного реверина позволило установить основные структурные перестройки в его молекуле, сопровождающие связывание им ионов кальция. Координация катионов Ca^{2+} -связывающими центрами молекулы реверина приводит к относительному повороту на 45° N- и C-концевого доменов реверина вокруг G96 и значительным конформационным изменениям N-

концевого (но не С-концевого) домена рековерина. В отсутствие кальция миристоильный остаток рековерина располагается антипараллельно относительно N-концевой α -спирали благодаря шпильке, образованной остатками Gly-2 и Asp-3. Гидрофобный «карман» рековерина, удерживающий его миристоильный «хвост», образован ароматическими и неполярными аминокислотными остатками Leu-28, Trp-31, Tyr-32, Phe-49, Tyr-53, Phe-56, Tyr-86, Val 87, Trp-104 и Leu-108 в составе пяти плотно примыкающих α -спиралей, принадлежащих центрам EF1, EF2 и EF3 [45]. Связывание ионов кальция с рековерином приводит к экспонированию гидрофобного «кармана», при этом значительное количество образующих его гидрофобных остатков, становится доступным растворителю. Благодаря экспонированию гидрофобного «кармана» рековерин становится способным Ca^{2+} -зависимым образом взаимодействовать со своей внутриклеточной мишенью родопсинкиназой, а также с гидрофобными носителями такими, как фенилсефароза [46].

Раскрывание гидрофобного «кармана» облегчает перемещение в раствор миристоилированного N-конца рековерина, поскольку несколько гидрофобных остатков, удерживающих миристоильный остаток, при экспонировании «кармана» удаляются от него, тем самым ослабляя его взаимодействие с белком. Экспонирование миристоильного остатка рековерина становится возможным также благодаря Ca^{2+} -зависимому раскручиванию части α -спирали и выпрямлению шпильки на N-конце белка, при этом миристоильный остаток поворачивается на 180° и ориентируется параллельно N-концевой α -спирали (рис. б). Благодаря механизму Ca^{2+} -миристоильного переключателя, рековерин в Ca^{2+} -связанной конформации проявляет два функционально важных свойства. Во-первых, открытый гидрофобный карман позволяет рековерину Ca^{2+} -зависимым образом ингибировать фосфорилирование светоактивированного родопсина родопсинкиназой. Такой эффект неоднократно продемонстрирован в условиях *in vitro* на препаратах НСП и в системах, реконструированных из очищенных белков. С использованием ППР-биосенсора была определена величина полумаксимального связывания родопсинкиназы с рековерином, иммобилизованном на ППР-чипе, которая оценивается как 0,5 – 1 мкМ [47]. Во-

вторых, экспонированная миристоильная группа обуславливает способность рековерина взаимодействовать с фоторецепторными мембранами.

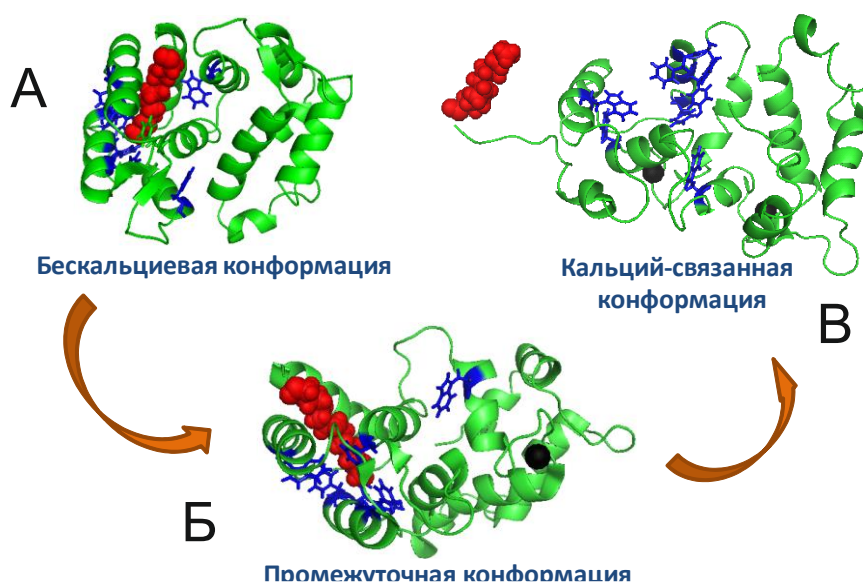


Рисунок 6. Последовательный механизм Ca²⁺/миристоильного переключателя на примере молекулы рековерина. А - Без-кальциевая форма (1IKU)*, Б - Содержащая 1 ион кальция (1OMR)*, В - Содержащая 2 иона кальция (1JSA)*.

* Структуры белков взяты из Protein data bank (<http://www.rcsb.org/pdb>)

Взаимодействие с плазматическими мембранами и мембранами органелл является одним из важнейших свойств всех белков семейства НКС. При Ca²⁺-зависимом, как в случае рековерина [36], или Ca²⁺-независимом экспонировании, как в случае NCS1 [48] миристоильная группа может встраиваться в фосфолипидный бислой, что в определенной степени обуславливает мембранную локализацию НКС. Иногда ассоциация белка с мембраной происходит без участия N-концевой ацильной группы, как это происходит в случае GCAP1 и GCAP2 [49], что по-видимому реализуется за счет определенных участков полипептидной цепи белка.

1.3.5. Редокс-зависимость функционирования НКС при патологиях сетчатки

Считается, что окислительный стресс является неотъемлемой частью фотохимического повреждения сетчатки, которое сопровождается изменениями в регуляции транскрипции и активности ферментов, а также инициацией и апоптоза

фоторецепторов различными путями [50]. Окислительный стресс, индуцированный светом, развивается в изолированных палочках в течение нескольких минут после интенсивного облучения светом и влияет как на внешние, так и на внутренние сегменты этих клеток [51]. В развитии окислительного стресса основное участие принимает родопсин-ретиноидный каскад [52], а также функционирование NO-синтазной системы в фоторецепторах и клетках пигментного эпителия сетчатки. Фотосенсибилизированные реакции и NO продуцируют активные формы кислорода и активные формы азота, которые способны окислять другие молекулы, включая липиды [53], [54] и белки. При окислении фоторецепторных НКС может происходить их дисульфидная димеризация, за счёт одного «неспаренного» цистеина, который консервативен во всех НКС. Так, при интенсивном освещении фоторецепторной сетчатки было отмечено накопление димерной (в большей степени) и мультимерной формы рековерина, которое сопровождается апоптозом фоторецепторов [55], [56].

Известно, что избыточное облучение сетчатки млекопитающих видимым светом вызывает окислительный стресс и гибель фоторецепторов, что ассоциировано с целым рядом заболеваний зрительного аппарата, таких как например, возрастная макулодистрофия [57], [58]. Это прогрессирующее дегенеративное заболевание макулы, распространённые формы которого являются основной причиной слепоты во всем мире [59]. Другой пример заболевания, в патогенезе которого принимает участие окислительный стресс – диабетическая ретинопатия, которая является одним из самых распространённых осложнений сахарного диабета, и в конечном итоге приводит к слепоте [60]. Таким образом, поиск и исследование внутриклеточных факторов, влияющих на кальциевую сигнализацию, регулирующую НКС, является чрезвычайно важным для понимания молекулярных механизмов функционирования как зрительной клетки, так и нейронов, в норме и при патологиях.

Функционирование НКС тесно связано с составом и особенностями строения фоторецепторных мембран по нескольким причинам. Во-первых, все НКС могут взаимодействовать с мембранами, за счёт N-концевой миристоильной группы, и в случае многих из них такое взаимодействие является частью

физиологического ответа на изменение концентрации внутриклеточного кальция. Во-вторых, большинство внутриклеточных мишеней НКС являются трансмембранными или примембранными белками. В настоящей работе мы исследуем влияние особого типа мембран – рафт-структур, и в частности, их основного белкового компонента кавеолина-1 – на структурно-функциональные свойства белков семейства НКС.

1.4. Клеточные мембраны

1.4.1 Структура и функции биологических мембран

Нормальное функционирование любой клетки немыслимо без биологических мембран, которые не только являются селективным барьером для химических соединений, но и выполняют огромное количество различных функций. Основная роль биологических мембран заключается в контроле процессов перемещения химических молекул в/из клетки, и поддержании различий концентрации химических веществ между цитозолем и внеклеточной средой, а также, между различными внутриклеточными органеллами. Таким образом, клетка разделяется мембранами на ряд компартментов, отделённых один от другого [61]. Принцип компартментализации позволяет разобщать биохимические процессы, протекание которых совместно невозможно, что чрезвычайно важно для нормального функционирования биологических систем. Так, анаболизм жирных кислот, происходящий в цитозоле, не пересекается с их катаболизмом, локализуемым в митохондриях, или процессы синтеза и деградации белков, которые так же разобщаются благодаря наличию внутриклеточных мембран [62]. Биологические мембраны обеспечивают связь и транспортировку между внутренней и внешней частью клетки или её органеллами, так водорастворимые компоненты, такие как ионы и сахара, могут пересекать мембраны по каналам и транспортерам [63], [64]. Не электролиты могут непосредственно проникать через мембранную часть липидного бислоя с помощью пассивной диффузии [65]. Сложная организация мембранных белков, и широкий спектр особенностей их функционирования позволяет мембранам выполнять самые разнообразные функции, такие как трансдукция [1], [66] и

преобразование клеточных сигналов [67]. Разнообразие фосфолипидов определяет структурные свойства мембраны, особенности функционирования мембранных диффузионных барьеров [68], и играет важную роль в функционировании мембранных белков [69] [70].

1.4.2. Роль холестерина в строении и свойствах биологических мембран

Одним из факторов определяющих функции мембран является разнообразие липидного состава, которое, в свою очередь, тесно связано с распределением холестерина [71]. Холестерин определяет такие физико-химические характеристики как, текучесть, проницаемость, гидрофобность диэлектрические свойства мембран, а также формирование высокоструктурированных гетерогенных участков, [61], [72]. Ряд исследователей развивает гипотезу о том, что существует корреляция между содержанием холестерина и набором, выполняемых мембраной функций, однако здесь есть ряд противоречий, которые требуют дополнительных исследований. И всё же нельзя не отметить, что содержание холестерина в мембранах не постоянно, и увеличивается от мембран эндоплазматического ретикулума и митохондрий, где его меньше всего [73], через аппарат Гольджи к мембранам эритроцитов, и миелиновых оболочек клеток Шванна (рис. 5), окружающих нервные аксоны, которые характеризуются самым высоким содержанием холестерина (около 50%) [74]. В последнем случае детектируют холестериновые кластеры, формирующие вкрапления в плазматическую мембрану, что, в свою очередь, может иметь ряд последствий на функциональную активность таких участков [75]. При дальнейшем увеличении содержания холестерина, по отношению к содержанию фосфолипидов (около 66%) достигается предел растворимости холестерина в мембранах, и в таком случае начинают формироваться холестериновые кристаллы, расположенные, как полагают, вне липидного бислоя [76]. Такое, достаточно редкое явление можно наблюдать в хрусталике глаза человека, или же при атеросклерозе сосудов (особенно у пожилых людей), в последнем случае это приводит к прогрессии различного рода заболеваний [77], [78].

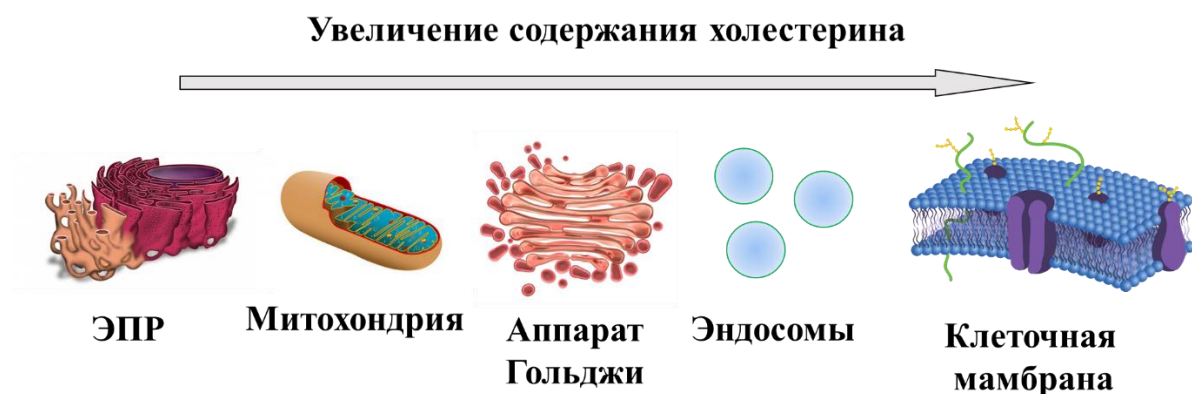


Рисунок 7. Распределение холестерина в клеточных органеллах.

По данным ряда исследований химическая структура холестерина оптимальна для взаимодействия с различными видами фосфолипидов, что объясняет его широкое распространение в различных биологических мембранах [79]. Функционально холестерин является полициклическим липофильным спиртом с достаточно термодинамически жёсткой структурой и небольшими размерами, что сильно отличает его от других компонентов, составляющих эукариотические мембраны. Условно молекулу холестерина можно поделить на три функционально важных домена: полярную гидроксильную группу, стероидное кольцо, с жёсткой структурой и лабильную изооктильную цепь. Это позволяет холестерину с одной стороны легко встраиваться в мембраны, а с другой, значительно структурировать их [80]. При физиологических температурах все мембранные компоненты подвергаются тепловой диффузии, и если бы мембрана состояла из одних фосфолипидов, то, следуя законам флюидно-мозаичной модели [81], должна была бы под действием неограниченного поперечного диффузионного движения быть достаточно гомогенной средой. Но известно что такого не происходит, что указывает на существование особых структурированных участков, что следует из ряда мембранных функций, не укладывающихся в классическую модель [82], [83]. Не так давно были обнаружены мембранные комплексы различного белково-липидного состава, которые играют существенную роль в функционировании биологических мембран. В настоящее время связь между различными типами доменов и мембранными функциями является одной из ключевых проблем мембранной

биологии. И особое внимание заслуживают рафт-структуры, называемые в иностранной литературе - detergent resistant membranes (DRM). Рафт-структуры – это высоко-структурированные белково-липидные домены с высоким содержанием холестерина, выполняющие целый ряд важнейших функций: транспорт холестерина через мембрану, организация сигнальной активности, участие в процессах канцерогенеза, апоптоза и многих других [Lisanti и др., 2011].

1.4.3. Некавеолярные рафт-структуры

Рафт-структуры представляют собой устойчивые к воздействию неионными детергентами мембранные компартменты, которые богаты холестерином, сфинголипидами, и содержат целый ряд различных белков, относящихся, в основном, к сигнальным системам клетки. Содержание холестерина в таких микродоменах в 3-5 раз выше, чем в не рафтовой части мембраны. Благодаря своему биохимическому составу, рафт-структуры более структурированы и имеют большую высоту, по сравнению с остальной частью липидного бислоя, где преобладают фосфолипиды с ненасыщенными жирными кислотами [85].

Стабильность и время существования рафт-структур зависят как от типа и количества белков, встроенных в мембрану, так и от нерафтовых белков, стабилизирующих структуру на поверхности мембраны, и от условий, в которых рафтам необходимо функционировать. Например, при сборке T-клеточного рецептора лимфоцитов, происходит объединение рафтов в более крупные структуры размером от 50 до 200 нМ [86]. Перекрёстные химические ковалентные сшивки белков, входящий в состав разных рафтов (например, антителами), или активация клетки (в процессе адгезии) приводит к ещё большему укрупнению структур и формированию рафтовых платформ или целых фаз, размеры которых измеряются микрометрами [87].

Благодаря морфологическим особенностям рафтовых мембран, белки получают возможность пространственного разобщения на мембране в зависимости от биохимического состава и выполняемых функций [88]. Особенно высокая аффинность к рафт-структурам обнаруживается у ГФИ-заякоренных

белков, (например, из семейства Src-киназ) G-белков и пальмитированных мембранных белков. Рафт-структуры принимают участие в фундаментальных клеточных процессах – делении, экзо- и эндоцитозе, образовании иммунологического синапса и многих других. Морфологически идентичные рафт-структуры зачастую имеют совершенно разный набор мембранных белков, так для рафт-структур митохондрий характерно включение таких белков, как инозитол-1,4,5-трифосфатный рецептор и эрлин-2, а для рафт-структур эндоплазматического ретикулума – эрлин-1 и эрлин-2 [89].

1.4.4. Кавеолы: кавеоллярные рафт-структуры

Помимо некавеоллярных рафтов, есть особый вид структур, отличающийся ещё более упорядоченной структурой, и намного более продолжительным временем жизни, по сравнению с обычными рафт-структурами, - кавеоллярные рафты-структуры, основным отличием которых является наличие кавеол (рис. 8). Первые статьи в которых встречается упоминание о кавеолах относятся к периоду с 1950-1960г. [Palade, 1953], однако интерес к изучению этих чрезвычайно интересных объектов до сих пор очень высок [91].

Кавеолы являются особым вариантом функциональных микродоменов, обнаруживаемых по всему организму. Они формируют колбообразные выпячивания мембраны, диаметром 70-140 нМ [92]. Принадлежность кавеол к функциональным рафт-структурам определяется по абсолютной тождественности их липидных составов. Кавеолы содержат в 3 раза больше холестерина и в 2 раза больше сфингомиелинов, чем не рафтовые участки мембраны, однако соотношения липидов и белков варьируют, в зависимости от типа клеток [93]. Всё же ряд белков более характерен для кавеол, чем другие, так в кавеолах часто обнаруживаются ГФИ-заякоренные белки, G-белки, аденилатциклазы, NO-синтазы, тирозинкиназы и др. [94].

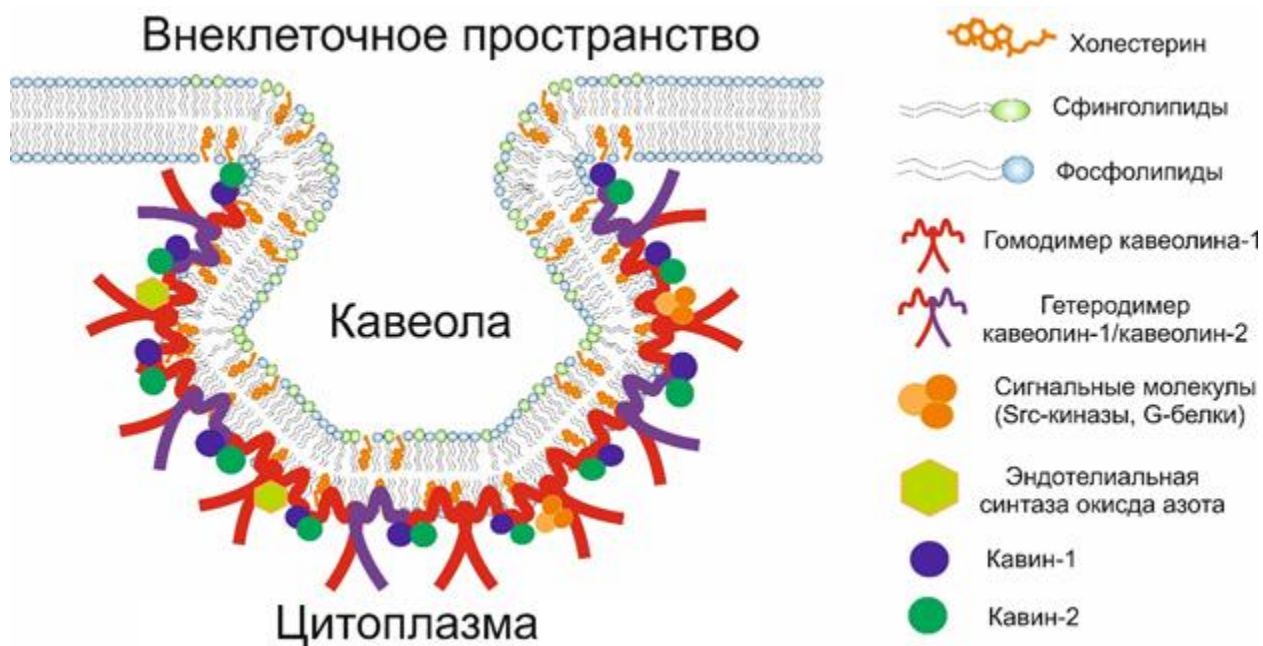


Рисунок 8. Принципиальное строение кавеолы, и наиболее характерные для её организации белки.

Специфический липидный состав не единственный фактор от которого зависит формирование кавеол, решающую роль в этом процессе играют взаимодействия специфических белков [95].

1.4.5. Формирование кавеол

Сборка кавеолы возможна только если в клетке экспрессируется ряд необходимых для этого белков. По данным последних исследований процесс сборки кавеолы можно представить следующим образом [95], [96].

Первый этап – синтез белков семейства кавеолинов (кавеолин-1,2, и 3 для мышечной ткани) его олигомеризация, (7-12 единиц кавеолина), и транспорт в аппарат Гольджи, где олигомеризованный кавеолин-1 взаимодействует с холестерином. Этот комплекс переносится к плазматической мембране, где к нему присоединяются белки семейства кавинов - PTRF/cavin-1, SRBC/cavin-2, SDPR/cavin-3 и некоторые другие, которые стабилизируют кавеолы в липидном бислое. Как и в случае кавеолина, экспрессия кавинов является критичной для формирования кавеол, их морфологии и динамики [97]. Но есть принципиальное различие во влиянии обозначенных выше белков, на этот процесс. В отсутствии

кавеолинов кавеолы не формируются, при сверхэкспрессии формируются значительно больше нормы. В то время как, при низком уровне кавинов кавеолы становятся значительно менее стабильными, и количество их уменьшается, однако они не исчезают полностью [Lisanti и др, 2011].

Эффект кавеолина в формировании кавеол заключается в первую очередь, в полимеризации белка, что приводит к изменению локального натяжения и, как следствие, к формированию кавеолы. Кроме этого, кавеолин-1 принимает участие в транспорте холестерина, и повышает его содержание, в своём липидном окружении, что структурирует мембрану, делая её более жёсткой и химически устойчивой [98]. Таким образом, в структуре кавеол можно выделить 3 условных слоя:

1. Специфический липидный бислой, обогащённый холестерином и сфинголипидами.
2. Интегральная цитоплазматическая часть, формируемая за счёт белков кавеолинов, заякоренных в мембране.
3. Периферический слой белков, сформированный комплексом белков семейства *cavins* [99].

В последнее время широко изучается способность кавеол существовать и вне липидных мембран. Отпочковываясь, они образуют в цитоплазме различные морфологические конструкции, которые принимают участие в везикулярном транспорте и организации сигнальной активности. Кавеолярные везикулы обнаруживаются во многих тканях организма, где они тесно сопряжены с процессами жизнедеятельности клетки. В огромном количестве кавеолы (и кавеолины) обнаруживаются в лёгочной ткани, что говорит о важной роли этих элементов в дыхательной системе [100]. Изучение механизмов кавеолин-зависимого эндоцитоза является перспективным направлением в современной науке, особенно применительно к исследованиям в области адресной доставки лекарственных средств [101].

1.5. Кавеолины

1.5.1. Общая характеристика белков семейства кавеолинов

Кавеолины – это погружённые в мембрану шпилькообразные белки, играющие важнейшую роль в транспорте холестерина, и ассоциированные с регуляцией сигнальной активности в самых разнообразных клеточных процессах. На сегодняшний день известно три представителя кавеолинов:

1. Кавеолин-1 встречается в двух изоформах. Кавеолин-1 α состоит из 178 аминокислотных остатков, является полностью функциональным белком. Кавеолин-1 β , кодируется, начиная с метионина 32, и содержит только 146 аминокислотных остатков, вследствие чего он намного хуже олигомеризуется, и не может выполнять ряд функций, присущих кавеолину-1. Кавеолина-1 β обнаруживается в значительно меньших количествах в рафт-структурах и кавеолах, чем кавеолин-1. Свойства кавеолина-1 β практически не изучены, считается, что он является структурным компонентом мембранных рафтов, взаимодействующим с сигнальными белками [102].

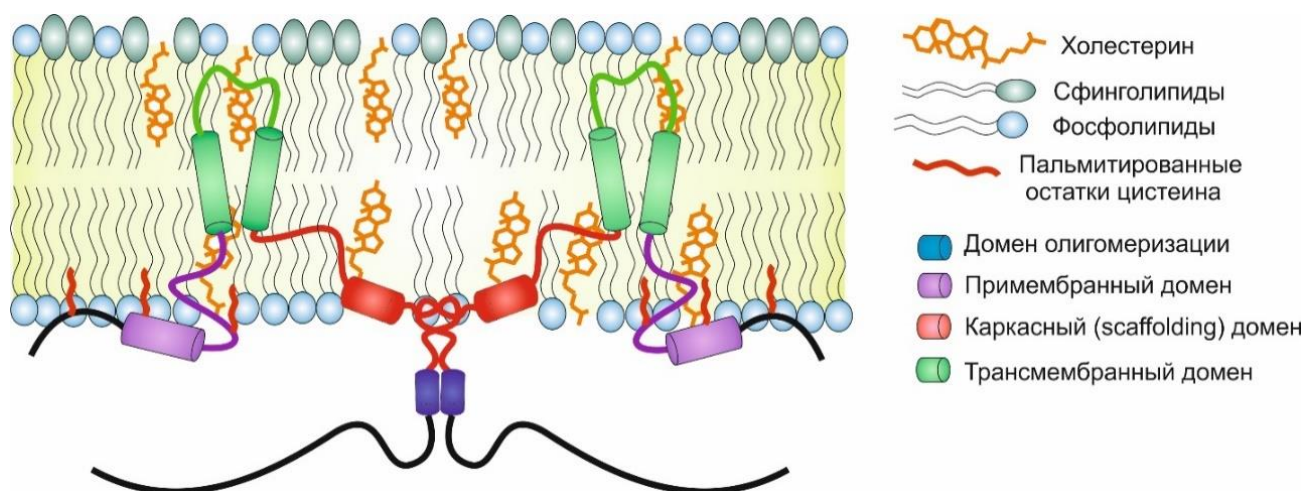
2. Кавеолин-2, коэкспрессируется вместе с кавеолином-1, что показано для адипоцитов, эндотелиальных клеток, и фибробластов, хотя кодируется отличными от него высококонсервативными генами. Но очень сильно связан с кавеолином-1. Имеет схожую с ним тканевую локализацию, участвует в образовании кавеол и олигомеров с кавеолином-1 разного состава. В отсутствие кавеолина-1 происходит деградация уже образовавшегося кавеолина-2, а синтез нового белка чрезвычайно затруднён. Роль кавеолина-2 в регуляции передачи сигнала охарактеризована слабо [103].

3. Кавеолин-3 в основном экспрессируется в клетках гладкой и поперечнополосатой (мышечной и сердечной) тканях, и является по сути функционально-активным аналогом кавеолина-1 в мышечной системе, где не были идентифицированы в значительных количествах ни кавеолин-1, ни кавеолин-2 [104]. Роль кавеолина-3 особенно хорошо изучена в процессах регуляции сердечной активности, главным образом, путем регулирования

функций G-белок сопряжённых рецепторов (GPCRs) миоцитов. Так, β -1 адренергические рецепторы обнаруживаются преимущественно в нековеолярных рафтах, и лишь небольшое количество - в кавеолах. β -2 адренергические рецепторы, напротив, обнаруживаются практически только в кавеолах, где они колокализированы со своими внутриклеточными мишенями [105].

1.5.2. Кавеолин-1: доменная организация

Кавеолин-1 заякорен в мембране трансмембранным доменом, но не пронизывает её насквозь, имея погруженные в цитоплазму функционально-активные N-концевой и C-концевой домены. В зависимости, от выполняемых функций кавеолин принято делить на следующие функционально-активные участки (рис. 9).



MSGGKYVDSEGHLYTVPIREQGNIYKPNNKAMADELSE
 KQVYDANTKEIDLVNRPKHLNDDVVKIDFEDVIAEPEG
 THSF¹⁴DGIWKASFTTFTVTKYWFYRLLSALFGIPMALIWGI
 YFAILSFLHIWAVVPCIKSFLIEIQCTSRVYSIYVHTVCDP
 LFEAVGKIFSNVRINLQKEI

Рисунок 9. Доменная организация кавеолина-1

N-концевой домен M^1-R^{101} , включает в себя сайт фосфорилирования Y^{14} , являющийся особым триггером, кардинально меняющим активность белка; домен олигомеризации $D^{60}-S^{80}$, и функциональный домен $D^{82}-R^{101}$, с помощью которого

кавеолин-1 взаимодействует с целым рядом белков, и тем самым участвует в организации их сигнальной активности. Трансмембранный домен L¹⁰²-I¹³⁴, примембранный домен Lys¹³⁵-Phe¹⁵⁰, который в ряде публикаций считают частью С-концевого домена [106], и С-концевой домен K¹⁵¹-I¹⁷⁸, отвечающий за взаимодействие сигнальных молекул, таких как NO-синтаза, коннексины [107]. Системные нарушения в структуре этого домена были обнаружены у пациентов с легочной артериальной гипертензией [108].

Кроме этого, выделяют сигнальные участки, необходимые для нормальной экспрессии и транспорта кавеолина-1. D⁶⁶-V⁷⁰ - выход из эндоплазматического ретикулума, I⁷¹-S⁸⁰ регулирует включение олигомеров в аппарат Гольджи. T⁹¹-Y¹⁰⁰ и I¹³⁴-T¹⁵⁴ – координируют процесс олигомеризации, и выход олигомеров из аппарата Гольджи [95].

1.5.3. Кавеолин-1: представления о структурной организации

Кавеолин-1 – заякоренный в мембране сильногидрофобный белок, склонный к олигомеризации, из-за этого изучение его структуры достаточно сложный процесс, по причине этого она до сих пор точно не установлена. Кавеолин-1 разделён на три домена – трансмембранный, N-концевой, и С-концевой домены. Наиболее изучены трансмембранный и С-концевой домены кавеолина-1, так, согласно имеющимся данным, кавеолин-1 содержит в основном α -спирали, соединённые короткими неупорядоченными участками, на которых происходят повороты аминокислотной цепи для правильной ориентации. Так при движении с N-конца, сначала следует цитоплазматический неупорядоченный участок 1-86, затем первая А-спираль 87-107, частично погружённая в мембрану, затем поворот- 108-G I P-110, внутримембранная α -спираль 111-128, ещё один поворот 129-V V P-131, и ещё одна α -спираль 135-178, лежащая, в основном в примембранной области (рис. 10) [109]. Интересно что обе поворотные последовательности имеют в своём составе одну гидрофобную аминокислоту с разветвлённой боковой цепью, и, следующей за ней пролин. Что вполне логично, так как остатки пролина часто обнаруживаются в начале α -спиралей [110]. Кроме этого С-концевой домен имеет три сайта пальмитирования (133, 143, 156),

которые важны для переноса холестерина через мембраны, и взаимодействия с C-Src киназой [111].

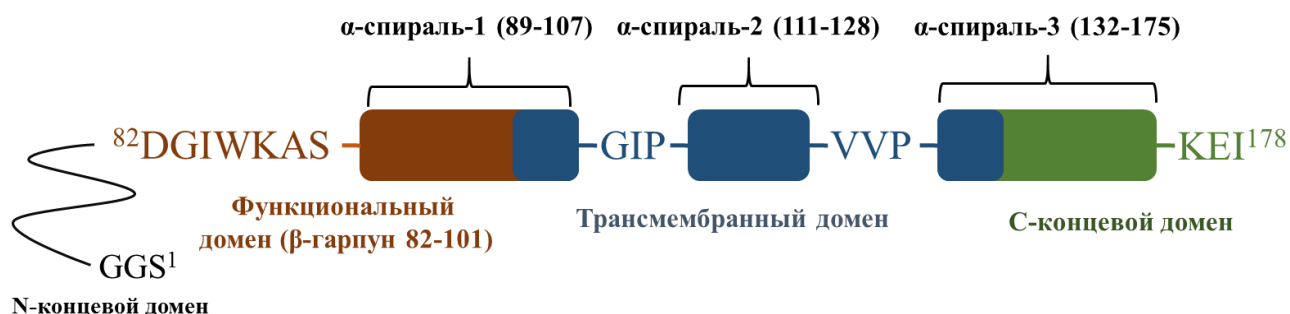


Рисунок 10. Принципиальная схема строения кавеолина-1.

Структурная организация N-концевого домена кавеолина-1 уже долгое время является предметом дискуссий в научной среде. Данные экспериментов с индивидуальными фрагментами N-концевого домена кавеолина-1 в нейтральных буферных системах определённо показывают существование большого неупорядоченного участка 1-79 по [112], или 1-86 по [109], с последующей α-спиралью (80-101 или 87-107, соответственно), внедряющейся в липидный бислой. Аминокислотные остатки с 82 по 101 составляют функциональный домен кавеолина-1, который чрезвычайно важен, не только для взаимодействия с белками-мишенями, но также и для связывания кавеолина-1 с холестерином и фосфолипидными мембранами [113]. Кроме этого, многие исследователи отмечали, что для взаимодействия с белками мишенями не обязательно необходим весь функциональный домен, а достаточно его укороченной версии (82-94). Применение методик с имитацией липидного окружения, в присутствии холестерина, и прочих компонентов рафт-структур указывает на существование смешанного типа вторичной структуры – антипараллельная β-шпилька (82-101), что позволяет лучше понять структурные особенности, лежащие в основе мультифункциональности CSD. Сложенные в антипараллельный β-лист аминокислотные остатки (84-94) обеспечивают взаимодействие кавеолина-1 с белками-мишенями, а располагающаяся за ним α-спираль (95-101), внедряется в мембрану, и отвечает за связывание холестерина [114] [115]. Отличительной

особенностью кавеолина-1 является его способность к олигомеризации. По разным данным кавеолины олигомеризованы от 4 до 12 единиц [116], однако наиболее распространённая стабильная единица – гептамер [112]. In vivo кавеолин-1 проявляет свои функциональные свойства только в составе олигомеров разного состава.

1.5.4. Кавеолин-1: функциональные свойства

Кавеолин-1 был первоначально идентифицирован как фосфопротеин массой 22 кДа, субстрат Src-киназы, локализованный на кавеоле [117]. После этого кавеолин-1 так же был обнаружен в аппарате Гольджи, а затем, в больших количествах обнаружен в рафт-структурах, и, соответственно, по всему организму. [118]. В ходе многочисленных исследований продемонстрирована роль кавеолина-1 во множестве клеточных процессов (рис.11): транспорт холестерина [119], клеточная миграция [120], ангиогенез, регуляция NO-синтазы [121], фосфотидилинозитол-4,5-фосфатный путь передачи сигнала [122], эндоцитоз [123], клеточная сигнализация [124], регуляция функционирования клеточных рецепторов [125], регенерация тканей и многих других [126].

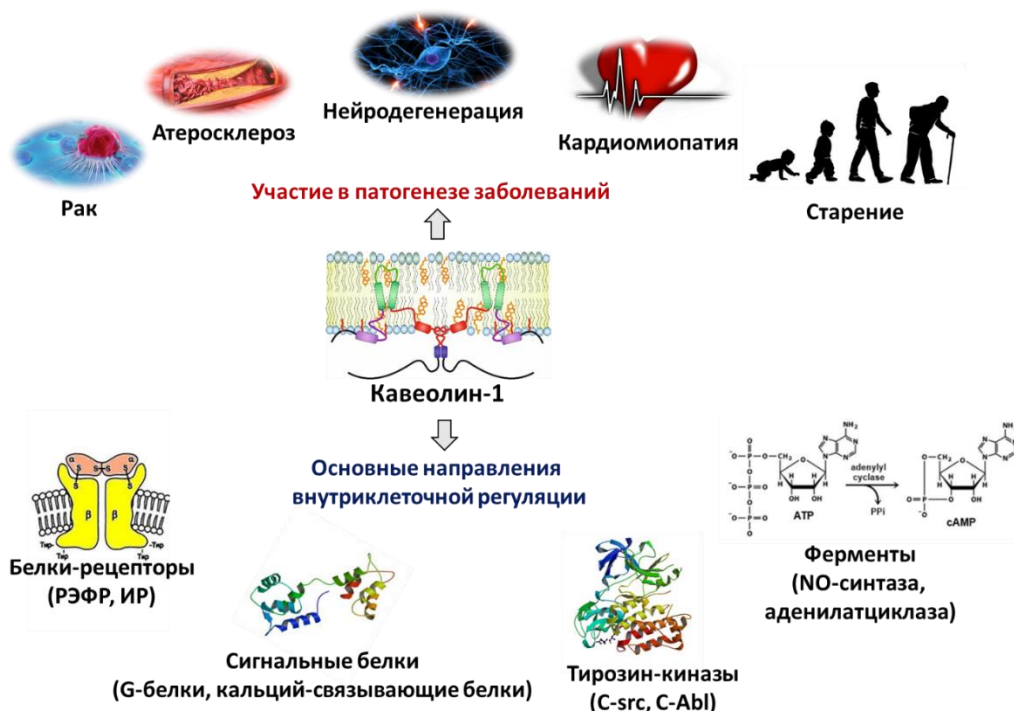


Рисунок 11. Разнообразие контролируемых кавеолином-1 процессов

Соответственно, нарушения в функционировании или синтезе этого белка драматически сказывается на регулируемых им процессах. Так caveolin-1 принимает участие в развитии широкого ряда заболеваний: рак [127], болезнь легких, липодистрофия, мышечная дистрофия, нейродегенерация и многих других [128].

Свою регуляторную роль caveolin-1 проявляет благодаря трём функционально-важным участкам. С-концевой домен caveolina-1, основная роль которого заключается в транспорте и метаболизме холестерина [129]. И двум функционально-сопряжённым участкам – функциональный домен (scaffolding domain) и сайт фосфорилирования тирозин-14, которые отвечают за подавляющее большинство взаимодействий caveolina-1 с его внутриклеточными мишенями.

1.5.5. Caveolin-1: функциональный домен (scaffolding domain).

Особое внимание необходимо уделить функциональному домену, который отвечает за взаимодействие caveolina-1 с целым спектром сигнальных молекул: семейство Src - белков, G – белков, фосфорилаторы, протеинкиназы A и C, аденилатциклазы [130], синтазы оксида азота [121], тирозинкиназные рецепторы и Ras-семейство ГТФ-аз, и др.[131]. Особая роль функционального домена подтверждается тем фактом, что caveolin-1 регулирует передачу сигнала даже в клетках, где отсутствуют caveолы. Так, например, в олигомеризованном состоянии caveolin-1 регулирует активность рецептора эпидермального фактора роста независимо от наличия caveол. Это указывает на то что caveolin-1 проявляет свои регуляторные свойства независимо от белкового окружения, присущего caveолам [98]. Несмотря на многочисленные исследования, и десятки доказанных мишеней caveolina-1, на сегодняшний день нет ясности на счёт точной структуры сайта взаимодействия в белках-мишенях (CIS, caveolin-1 interaction site). В ряде исследований CIS определяется в первичной структуре, и соответствует аминокислотным последовательностям: WXWXXXXW или WXXXXWXXW, где W – это ароматический аминокислотный остаток, X - любой аминокислотный остаток. Таким образом, можно говорить о формировании не столько сайта, сколько профиля взаимодействия caveolina-1 с мишенями,

основанного на гидрофобных взаимодействиях. С другой стороны, константы, диссоциации, определяемые для белок-белкового взаимодействия с кавеолином-1, достаточно высоки и составляют порядка 10^{-7} - 10^{-6} , что говорит о более сильном характере взаимодействия, чем просто гидрофобное. В подтверждение этому есть ряд данных и о совершенно других аминокислотных последовательностях определяющих взаимодействие с кавеолином-1 [132], [133], их объединяет только наличие гидрофобных аминокислот в составе CIS, особенно ароматических. Всё это указывает на возможность существования π -стэкинг взаимодействия, между кавеолином-1 и его мишенями [134]. Стоит заметить, что на данный момент нет прямых доказательств в подтверждение этого предположения.

Механизмом регуляции активности функционального домена кавеолина-1 является сайт фосфорилирования тирозин-14, который определяет не столько способность кавеолина-1 взаимодействовать с мишенями, а скорее специфичность этого процесса.

1.5.6. Сайт фосфорилирования Y14, как регулятор функциональной активности кавеолина-1

Сайт фосфорилирования – Y14 расположен в N-концевом домене кавеолина-1, но не кавеолина-1 β , у которого отсутствуют первые 32 аминокислотных остатка. Фосфорилирование по Y14 могут опосредовать киназы таких семейств, как: Yes, Fyn и c-Abl, однако наибольшее сродство к кавеолину-1 имеет c-Src-киназа. Фосфорилирование может идти постоянно или время от времени, в ответ на внешний стимул, как например, воздействие эпидермального фактора роста [135] или активация интегрина [136]. По современным данным значение фосфорилирования для кавеолина-1 определяется его структурой в фосфорилированном и не фосфорилированном состояниях. Исходя из анализа пространственной ориентации полипептидных цепей кавеолина-1 было выдвинуто предположение что в не фосфорилированном состоянии, неупорядоченный N-концевой домен кавеолина-1 обёрнут вокруг функционального домена, и удерживается в таком «закрытом» состоянии благодаря гидрофобным взаимодействиям и водородным связям [112]. При

фосфорилировании, на N-конце белка появляется дополнительный отрицательный заряд, что приводит к электростатическому отталкиванию неструктурированного участка, и открыванию функционального домена для взаимодействия. Эта идея была подтверждена при изучении гептамеров кавеолина-1 с различными точечными заменами в N-концевом домене. Этот эффект даже более важен для понимания функционирования олигомеров кавеолина-1 и кавеол в организации сигнальной и транспортной систем. Здесь фосфорилирование служит механизмом «открывания» таких крупных систем, что говорит о возможности образования целых сигнальных платформ на основе кавеолина-1, находящихся под регуляцией фосфорилирования (Рис. 12) [137].

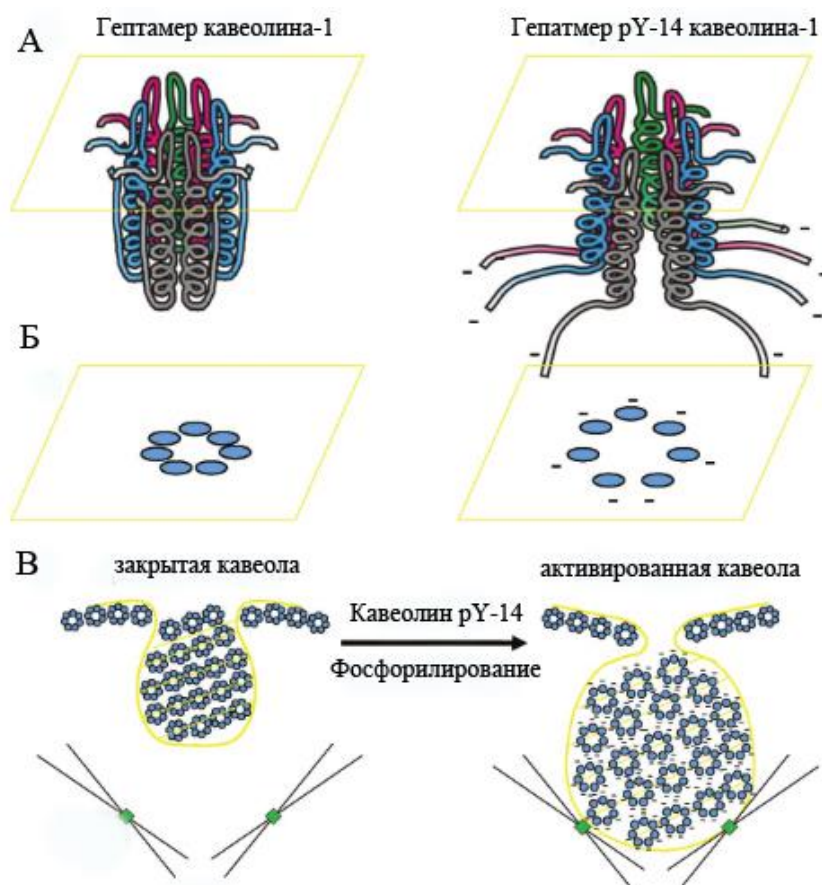


Рисунок 12.* Активирование кавеолина-1 фосфорилированием. А – принципиальное строение гептамера кавеолина-1. Б – пространственная конфигурация, вид сверху. В – процесс «активации» кавеолы.

*Адаптировано из [137]

Фосфорилирование кавеолина-1 имеет место во многих клеточных процессах. Но если для реализации некоторого круга сигналов оно необходимо так, например, взаимодействие с рецептором эпидермального фактора роста (РЭФР) и инсулиновым рецептором (ИР) сопряжено с фосфорилированием кавеолина-1 по Y¹⁴ [138][139]. То в других случаях оно только усиливает оказываемый кавеолином-1 эффект, как в случае стимуляции регенерации эпителия слизистой оболочки кишечника при различных патологических состояниях, за счет увеличения кальциевой сигнализации опосредованной фосфорилированной формой кавеолина-1 [140]. Отдельного внимания заслуживает функциональная роль кавеолина-1 при окислительном стрессе, который является стимулом для фосфорилирования кавеолина-1, сохраняющегося длительное время после снятия окислительного импульса.

1.5.7. Роль кавеолина-1 при окислительном стрессе

Окислительный стресс приводит к множеству негативных последствий для клетки, заканчивая её апоптозом. При таком патологическом состоянии кавеолин-1 вносит не меньший вклад в клеточную регуляцию, чем в норме [141]. Фосфорилирование кавеолина-1 является одновременно и следствием, и маркером окислительного стресса, и, как было показано является модулятором программируемой клеточной гибели, в случае возникновения устойчивого цитотоксического стимула [142]. Причём, как показано в экспериментах с пальмитат-индуцированным апоптозом, не имеет большого значения сам стимул, а скорее его продолжительность, которая в итоге приводит к апоптотическим сигналам, опосредуемым фосфорилированной формой кавеолина-1 [143].

АФК могут влиять на экспрессию, деградацию, посттрансляционные модификации и мембранный транспорт кавеолина-1 [144]. Было показано, что кавеолин-1 взаимодействует с многочисленными окислительными ферментами, поэтому может быть вовлечен в регуляцию путей, индуцированных окислительным стрессом [145]. Так, было показано, что добавление различных концентраций пероксида водорода в культуральную среду миобластов заметно снижает уровень экспрессии кавеолина-1 [146]. Несмотря на снижение количества

кавеолина-1, кавеолы всё же продолжали формироваться на плазматической мембране, но их функциональность, при этом, нарушалась [144].

Кавеолин-1 также оказывает обратное регулирующее действие на уровень АФК в клетке, так, фосфорилирование кавеолина-1 связано с апоптозом клеток и приспособлением их к окислительному стрессу. Повышенная экспрессия фосфорилированного кавеолина-1 приводит к уменьшению апоптоза клеток и может способствовать их выживанию после окислительных повреждений [144]. В подтверждении этого, Shiroto T. и др. обнаружили, что выключение гена кавеолина-1 в эндотелиальных клетках может увеличивать продукцию АФК и индуцировать окислительный стресс [147].

Как было сказано ранее, система фоторецепции позвоночных является местом постоянного возникновения окислительного стресса, но роль кавеолина-1 в этой системе до сих пор не исследовалась. Ранее кавеолин-1 был обнаружен в составе НКС, где он коиммунопреципитировал с одним из представителей семейства НКС – рековерином [40], который вовлечён в механизмы окислительного стресса, лежащие в основе фотоповреждения сетчатки. Имеющиеся данные позволяют говорить, что белок рафт-структур кавеолин-1 является потенциальным модулятором свойств НКС. Исходя из этого, актуальной задачей является исследование молекулярных факторов, влияющих на функционирование НКС, с целью разработки терапевтических подходов, ориентированных на промежуточные компоненты сигнальных каскадов, такие как белки семейства НКС, или их белки-партнёры. В этом исследовании мы сфокусируемся на изучении влияния кавеолина-1 на молекулярные механизмы функционирования НКС в фоторецепторной клетке.

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Материалы и реактивы

В работе были использованы следующие реактивы, отечественного производства: соли, кислоты и щёлочи, качества «осч» и «чда» (Реахим, Россия); N,N-метилен бисакриламид, трис-(гидроксиметил)аминометан, хлорид натрия, мочеви́на, акриламид, TEMED, дрожжевой экстракт (Хеликон, Россия), ДНК-лигаза бактериофага T4 (СибЭнзим, Россия). А так же импортные реактивы: хлорид кальция (II), дитиотреитол, меркаптоэтанол (Sigma, США), N,N-метиленбис-акриламид, глицин, персульфат аммония, хлорид магния (II) (ICN, США); ЭДТА, ЭГТА, кумасси синий G-250, бромфеноловый синий, додецилсульфат натрия, глицерин, N,N,N',N'-тетраметилендиамин (Serva, США), триптон (Amersco, Нидерланды), Бактоагар (DIFCO, США). Хроматографические колонки и сорбенты: MonoQ HR10/10, фенилсефароза (Pharmacia, Швеция), глутатион-сефароза, Ni-NTA-сефароза, Butyl-sepharose (GE Healthcare, США), Butyl toyopearl (Tosoh, Япония). Рестриктазы, BamH 1 и Sal 1 (Thermo scientific, США), T7 полимераза (Amersham, США).

2.2. Методы

2.2.1. Получение плазмидной ДНК

Для получения плазмидной ДНК из клеток штамма *E.coli XLII* единичную колонию бактерий инокулировали с чашки Петри в 3 мл LB среды (10 г/л бактотриптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л NaCl), содержащую 50 мкг/мл ампициллина и 10 мкг/мл тетрациклина, и растили в течение ночи при 37°C при интенсивной аэрации. Полученную ночную культуру клеток осаждали на микроцентрифуге Eppendorf «Mini Spin» (7000 об/мин, 2 мин), осадок ресуспендировали в 100 мкл буфера I (50 mM глюкозы, 10 mM ЭДТА, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0) и инкубировали 10-15 минут при комнатной температуре. После чего добавляли 200 мкл раствора II (1% SDS и 0.2 M NaOH), перемешивали и инкубировали 10 минут при комнатной температуре до просветления раствора. Затем лизированные клетки нейтрализовали 150 мкл 3 M ацетата калия pH 4.8,

перемешивали и инкубировали 10 минут при 4°C. Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием (12000 об/мин, 5 мин). К супернатанту добавляли 0.6 объема изопропанола, инкубировали 20 мин, осадок собирали центрифугированием (12000 об/мин, 10 мин). ДНК последовательно промывали 70% и 95% этанолом, высушивали и растворяли в воде.

Альтернативно, для очистки плазмидной ДНК использовали готовый набор реагентов «GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit» (Fermentas, EU). Очистку проводили по методике производителя.

2.2.2. Получение фрагмента N-концевого домена кавеолина-1 (M1-R101) и введение точечной мутации Y14E

Реакцию лигирования, для получения фрагмента ДНК кавеолина-1 M¹-R¹⁰¹ (Cav), проводили, в течении 2 часов при комнатной температуре в 20 μл реакционной смеси следующего состава: 1x-буфер для лигирования: 50 мМ Трис-НСl рН 7.9, 100 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂, 100 мкг/мл БСА, ДНК-лигаза бактериофага T4 (10ед. активности), десять олигонуклеотидных последовательностей, по 100 нг. каждой, стерильная вода.

Полимеразную цепную реакцию для амплифицирования фрагмента ДНК проводили в 50 мкл реакционной смеси следующего состава: 1x буфер для Taq-полимеразы, 0.1-0.2 мкг плазмидной ДНК, по 15 пМ прямого и обратного праймеров, по 1 мМ каждого дезоксирибонуклеотидтрифосфата, 2 мМ MgCl₂, стерильная вода. После перемешивания на реакционную смесь наслаивали 30 μл минерального масла. Амплификацию проводили на приборе «Терцик» (ДНК-Технология, Россия) по следующей схеме: 1 цикл предварительной денатурации при 95°C 2 минуты, после чего добавляли 2,5 ед. акт. Taq-полимеразы, 30 циклов ПЦР:

1. Денатурация: 95°C 1 минута,
2. Отжиг праймеров: $X = 81,5 + 0,41 * (\%GC) - (675/N) - 5^\circ C$, где N – общее количество нуклеотидов, в течении 30 секунд.

3. Элонгация - 72°C 2 минуты

Введение точечной мутации проводили методом ПЦР по приведённой выше схеме, с использованием следующих праймеров:

Прямой: 5'-CTC CCG GTG GAC GAG TGG CAC GGG TAG-3'

Обратный: 5'-СТА CCC GTG ACC CTC CTG CAC CGG GAG-3'

Полученной смесью трансформировали клетки *Escherichia coli*, наличие мутации определяли методом ПЦР с отдельных клонов, с последующим секвенированием образцов.

2.2.3. Получение генетической конструкции, содержащей фрагмент N-концевого домена кавеолина-1 (M1-R101)

Для клонирования амплифицированных фрагментов ДНК в векторную плазмиду рЕТ-28а проводили рестрикцию данной плазмиды (1-2 часа, 37°C) последовательно эндонуклеазами рестрикции BamHI и SalI. После чего осуществляли электрофоретическое разделение в агарозном геле и очистку.

Лигирование соответствующих очищенных фрагментов ДНК с ДНК плазмиды, проводили при молярном соотношении вектора и вставки 1:5 в присутствии 1 ед. акт. ДНК-лигазы фага T4 в 20 мкл лигазного буфера в течение 2 часов при комнатной температуре. Полученная генетическая конструкция содержала фрагмент N-концевого домена кавеолина-1 (M1-R101). Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E.coli* штамм XL-II.

2.2.4. Получение генетических конструкций мутантных форм рековерина

Генетические конструкции, соответствующие аминокислотной последовательности рековерина с точечными мутациями W104A, F106A, Y109A, W156A, и F172A, а так же, мутантная форма с тремя аминокислотными заменами - Y65A/F70A/F73A, были получены, описанными выше стандартными процедурами сайт-направленного мутагенеза, а так же по известным методикам [36].

2.2.5. Приготовление компетентных клеток

Ночную культуру клеток *E.coli* разбавляли в соотношении 1:1000 свежеприготовленной LB средой и растили до оптической плотности $A_{600}=0,3$. Клетки собирали (по 1 мл.) на центрифуге Eppendorf «Mini Spin» (7000 об/мин, 4°C, 2 мин) и ресуспендировали в 0.5 мл. буфера (20 mM MgCl₂, 80 mM CaCl₂, 15% глицерин, 0.5% глюкоза), инкубировали 20 минут при +4°C. Затем такую процедуру проводили ещё 3 раза. После последнего центрифугирования клетки аликвотировали по 50 мкл в охлажденные пробирки, и хранили при температуре -70°C.

2.2.6. Трансформация клеток *E.coli* плазмидной ДНК

50 мкл суспензии компетентных клеток размораживали на льду, добавляли 10 мкл лигазной смеси, содержащей примерно 1-5 мкг ДНК, мягко перемешивали и инкубировали во льду в течение 40-60 минут. Затем клетки инкубировали в течение 70 секунд при 42°C в водяном термостате, после чего сразу же помещали в лед на 10 минут, добавляли среду LB (+ 0.5% глюкозы) до 1 мл и инкубировали в течение 60 минут при 37°C. После инкубации клетки помещали в лед и высевали по 50 мкл на чашки Петри со средой LB-агар (среда LB, 20 г/л агара), содержащей 100 мг/мл ампициллина (в случае использования плазмид рЕТ-11D, рЕТ-22b), а так же 20 мкг/мл канамицина (в случае использования плазмид рВВ-131, рЕТ-28a). Чашки инкубировали в течение ночи при температуре 37°C.

2.2.7. Получение и очистка белка, соответствующих N-концевому фрагменту кавеолина-1 (M1-R101)

Экспрессию генетических конструкций N-концевого фрагмента кавеолина-1 (M1-R101) (Cav), и точечного мутанта Y14E (CavE), содержащий 6-гистидиновую последовательность на N-конце, проводили в клетках *E. coli* BL-21 (DE3) по методу, разработанному в нашей лаборатории. В культуральную среду LB, содержащую антибиотик - канамицин (25 мкг/мл) помещали 50 мкл. клеточной суспензии из замороженного стока, и выращивали в течение дня при 37°C, при

$A_{600}=1-2$ суспензию оставляли на +4 до следующего утра. Полученную культуру клеток разводили в соотношении 1:1000 культуральной средой LB и выращивали при 37°C до оптического поглощения $A_{600}=1.5-2$ ОЕ, после чего добавляли ИПТГ, до конечной концентрации 0.5 мМ. Растили еще 5 часов при температуре 37°C при перемешивании (180-250 об/мин), затем оставляли ещё на 16 часов при температуре +4°C без перемешивания. На следующий день клетки собирали центрифугированием 3000 g (4000 об/мин, 10 мин, ротор JA-10 Beckman), ресуспендировали в буфере, содержащем 50 мМ Tris-HCl pH 7.5, 1 мМ ЭДТА, 5 мМ MgCl₂, 5 мМ МЭ, 25 мМ сахарозы, 2-5 мг лизоцима (70 мл буфера на клеточный осадок с 1 литра культуральной среды), и замораживали при -20°C. После разморозки клеточный дебрис отделяли от растворимых белков центрифугированием 10000 g (10000 об/мин, 20 мин, ротор JA-20 Beckman). Полученный осадок растворяли в 5 лизирующего буфера, при интенсивном перемешивании добавляли в 50 мл. раствора 8 М гуанидин гидрохлорида из расчёта, и оставляли при перемешивании в течении 16ч при +4°C. Раствор диализовали против буфера 20 мМ Tris-HCl pH 7.5, 2 мМ MgCl₂, 2 мМ МЭ, 100 мМ NaCl, центрифугируют 17000 g (15000 об/мин, ротор JA-20 Beckman) 30 мин. Полученную растворимую фракцию наносили на колонку Ni-NTA Excel (GE Healthcare), уравновешенную буфером 20 мМ Tris-HCl pH 7.5, 2 мМ MgCl₂, 2 мМ МЭ, 250 мМ NaCl, элюцию вели ступенчатым увеличением концентрации имидазола - 200 и 500 мМ. Чистота полученных препаратов Cav и CavE, по данным SDS-электрофореза, была более 95 %.

2.2.8 Получение функционального домена кавеолина-1 (F81-R101)

Пептид, соответствующий функциональному домену кавеолина-1 (F81-R101) (Cav81-101), и контрольный пептид с произвольным набором тех же аминокислот (FDKWVQVELKKQKKNLNDLNQ) были получены в виде синтетических пептидов, с использованием стандартных процедур твердофазного пептидного синтеза Fmoc/But в группе химии пептидов ФИБХ РАН.

2.2.9. Экспрессия белков НКС в клетках *E.coli*

Экспрессию миристоилированных (myr) и немиристоилированных (non-myр) форм НКС проводили в клетках *E.coli* В1-21 (DE3) по методу, разработанному в нашей лаборатории ранее [148] с некоторыми модификациями. В культуральную среду LB, содержащую антибиотики - ампициллин (50 мкг/мл), и канамицин (25 мкг/мл.) (в случае использования штаммов с миристоилтрансферазой) помещали 50 мкл. клеточной суспензии из замороженного стока, и выращивали в течение дня при 37⁰С, при A₆₀₀=1-2 суспензию оставляли на +4 до следующего утра. Полученную культуру клеток разводили в соотношении 1:1000 культуральной средой LB и выращивали при 37⁰С до оптического поглощения A₆₀₀=1 после чего добавляли миристиновую кислоту до конечной концентрации 20 мкг/мл (в случае получения не миристоилированных белков этот этап пропускается). Через 15-20 минут, при оптическом поглощении A₆₀₀=1,5-2 ОЕ добавляли ИПТГ, до конечной концентрации 0.5 мМ. Растили еще 5 часов при температуре 37⁰С при перемешивании (180-250 об/мин), затем оставляли ещё на 16 часов при температуре +4⁰С без перемешивания. На следующий день клетки собирали центрифугированием 3000 g (4000 об/мин, 10 мин, ротор JA-10 Beckman), ресуспендировали в буфере, содержащем 50 мМ Tris-HCl pH 7.5, 1 мМ ЭДТА, 5 мМ MgCl₂, 5 мМ МЭ, 25 мМ сахарозы, 2-5 мг лизоцима (70 мл буфера на клеточный осадок с 1 литра культуральной среды), и замораживали при -20⁰С. После разморозки клеточный дебрис отделяли от растворимых белков центрифугированием 10000 g (10000 об/мин, 20 мин, ротор JA-20 Beckman). Далее процедура очистки каждого белка различалась.

2.2.10. Очистка рекомбинантного реоверина дикого типа из клеток *E.coli*

К фракциям растворимых белков после лизиса клеток добавляли NaCl до 1 М, а затем, хлорид кальция до конечной концентрации 2 мМ, и наносили на колонку с фенол-сефарозой «6-fast flow high sub» (Pharmacia, США), уравновешенную буфером ФА - 20мМ Tris-HCl, pH 7.5, 2 мМ CaCl₂, 2 мМ MgCl₂, 1 мМ ДТТ. Элюцию проводили буфером В – 20 мМ Tris-HCl, pH 7.5, 2 мМ

ЭГТА, 2 mM MgCl₂, 1 mM ДТТ. Для дополнительной очистки и концентрирования препаратов рековерина применяли анионообменную хроматографию на колонке MonoQ HR10/10 (Pharmacia, США) в 20 mM Трис-НСl, рН 7.5, в линейном градиенте концентрации NaCl от 0 до 300 mM. Чистота полученных препаратов рековерина, по данным SDS-электрофореза, была более 98 %.

2.2.11. Очистка рекомбинантного NCS1 дикого типа из клеток E.coli

К фракциям растворимых белков после лизиса клеток добавляли NaCl до 1M, а затем, хлорид кальция до конечной концентрации 2mM, и наносили на колонку с фенил-сефарозой «6-fast flow high sub» (Pharmacia, США), уравновешенную буфером ФА – 20 mM Трис-НСl, рН 7.5, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 1 mM ДТТ. Элюцию проводили сначала буфером Б - 20 mM Трис-НСl, рН 7.5, 2 mM ЭГТА, 2 mM MgCl₂, 1 mM ДТТ, 200 mM NaCl, затем буфером В – 20 mM Трис-НСl, рН 7.5, 2 mM ЭГТА, 2 mM MgCl₂, 1 mM ДТТ, после этого дистиллированной водой. Фракции с наибольшим содержанием миристоилированной формы далее очищали с помощью Butyl Sepharose (см. 2.2.13.). После этого, для дополнительной очистки и концентрирования препаратов NCS1 применяли анионообменную хроматографию на колонке MonoQ HR10/10 (Pharmacia, США) в 20 mM Трис-НСl, рН 7.5, в линейном градиенте концентрации NaCl от 0 до 300 mM. Чистота полученного белка, по данным SDS-электрофореза, была более 97 %.

2.2.12. Очистка рекомбинантных GCAP1 и GCAP2 дикого типа из клеток E.coli

В случае белков GCAPs, полученный после центрифугирования клеточной суспензии осадок растворяли в лизирующем буфере. При интенсивном перемешивании добавляли в раствор 8 M гуанидин гидрохлорида из расчёта 1 объём суспензии осадка к 10 объёмам гидрохлорида, и оставляли при комнатной температуре на 3 часа. Раствор диализовали против 20 mM Tris-НСl 7.5, 100 mM NaCl. Центрифугировали при 18000 об/мин. 20 мин в роторе JA-20 (Beckman). К растворимой фракции добавляют NaCl до 1 M. Наносят на Butyl Sepharose High Performance (GE Healthcare, США), уравновешенную буфером Б (20 mM Tris-НСl,

1 М NaCl, 0.4 мМ DDT). Элюцию проводят ступенчато: от 200 до 0 мМ NaCl. Для дополнительной очистки применяли анионообменную хроматографию на колонке MonoQ HR10/10 (Pharmacia, Швеция) в 20 мМ Трис-HCl, pH 8.0, в линейном градиенте концентрации NaCl от 50 до 600 мМ. Чистота полученных препаратов GCAP2, по данным SDS-электрофореза, была более 95 %.

2.2.13. Разделение миристоилированной и немиристоилированной форм НКС

Для разделения форм НКС применяли гидрофобную хроматографию на сорбенте Butyl Sepharose (GE Healthcare, США). К очищенным препаратам НКС добавляли NaCl до 1 М, наносили на колонку, уравновешенную 10 мМ Tris-HCl, 1М NaCl, 1 мМ DDT. Элюировали, ступенчатым уменьшением концентрации NaCl до 0 мМ, через каждые 100 мМ. В таком случае, в первую очередь элюировались немиристоилированные, а затем миристоилированные формы белков. Миристоилированный рековерин элюировался в диапазоне 200-0 мМ NaCl, GCAP1 и GCAP2 250-0 мМ NaCl, NCS-1 – 300-0 мМ NaCl.

2.2.14. Определение степени миристоилирования рекомбинантных НКС

Степень миристоилирования рекомбинантных НКС определяли с помощью обращено-фазовой хроматографии. Препараты НКС (1,5 мг/мл) наносили на колонку Luna C18(2) (100Å, 250x4.6 mm) (Phenomenex, США). Элюирование проводили в линейном градиенте 0-95% ацетонитрила в присутствии 0.1% ТФУ в течении 20-30 мин, в зависимости от белка. Детекцию осуществляли при 280 нм. По данным хроматографии, степень миристоилирования всех НКС была в районе 90-96%.

2.2.15. Ковалентная иммобилизация Cav на Sepharose CL-4B

Cav ковалентно связывали с Sepharose CL-4B согласно методике [149], с некоторыми изменениями. Sepharose CL-4B промывали дистиллированной водой и уравновешивали раствором 0.2М NaHCO₃. К полученной смоле при перемешивании, по каплям, добавляли BrCN растворённый в ацетонитриле, из расчёта 0.1 г BrCN на 1 г смолы, следя за тем чтобы температура реакции

находилась в районе 12-15°C, и pH в районе 11. Промывали смолу 0.1М HCl, и инкубировали в течении 2 часов при комнатной температуре с раствором белка в буфере 0.1 М NaHCO₃, 0.5М NaCl, из расчёта 5мг белка на 1 г смолы. Для инактивации оставшихся на смоле активных групп, в течении ночи инкубировали смолу с 1 М раствором этаноламина в 0.1М NaHCO₃, при 4 °С.

2.2.16. Изучение гомогенности препаратов N-концевого фрагмента кавеолина-1 методом динамического светорассеяния

Измерения проводили на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd.) в буфере 20 mM Трис-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM DTT. Температура 25°C, время накопления автокорреляционной функции для одного измерения 200 сек. Показатель преломления n_D и динамическая вязкость η буфера: $n_D = 1,3338$ и $\eta = 0,95$ мПа/сек при 25°C. Для каждого препарата выполняли по три измерения.

2.2.17. Определение структурного состава различных форм N-концевого фрагмента кавеолина-1 методом спектроскопии кругового дихроизма

Измерения КД проводили с использованием спектрополяриметра J-810 (JASCO, Inc.), с шагом в 2 нм, при среднем времени 2 с, и накоплении в течении 3 с при 20°C в следующей буферной системе: 10 mM H₃BO₃-KOH pH 9.0, 50 mM NaCl, 20 мкМ DTT. Концентрации белков были взяты в диапазоне 5.3 – 5.8 мкМ.

2.2.18. Получение наружных сегментов палочек (НСП) сетчатки

Свежеполученные глаза крупного рогатого скота адаптировали в темноте в течение 3-4 ч при 4°C. Во избежание засвечивания "темнового" родопсина сетчатки извлекали из глаз на слабом красном свете и либо использовали их немедленно, либо замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C. Очистку НСП из свежеприготовленных или замороженных сетчаток проводили в соответствии с методом, разработанным Шнеткампом и сотрудниками [150] на слабом красном свете. 2. Замороженные сетчатки помещают в раствор 45% сахарозу из расчёта 1 мл сахарозы на 1 сетчатку. Раствор интенсивно встряхивают колбу в течении 1 минуты, затем оставляют при комнатной температуре на 10 мин

и снова встряхивают, и так до полного растворения сетчаток, затем продолжают процедуру при +4°C. Процедуру продолжают в течении 2 ч.

Суспензию центрифугировали (Beckman JA-14 3000 об. 20 мин). Растворимую фракцию разбавляли в 2 раза буфером А (20 mM Трис рН 8.0) и центрифугировали (Beckman JA-14 7000 об. 40 мин.). Получившейся осадок растворяли в 2-кратном объёме 34% сахарозы и наслаивали сверху раствора градиента сахарозы следующего состава: 1:1 - 36%:34% сахарозы. Центрифугируют 100 000g 1.5-2 ч. Отбирали область с НСП, находящуюся на границе 34-36% сахарозы. НСП разбавляли в 2 раза буфером А и осаждали на центрифуге (Beckman JA-20 15 000 об. 30 минут). Полученный осадок НСП хранили при -20°C

2.2.19. Получение рафт-структур из НСП

Рафт-структуры получали используя адаптированные к темноте (высокий уровень кальция), или к яркому свету (низкий уровень кальция) НСП сетчатки быка, в соответствии с известной процедурой [40], [151], с некоторыми изменениями. НСП суспендировали в 20 mM буфере А (Tris-HCl рН 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂ и 1 mM DTT). 1 мл суспензии смешивают с 7 мл буфера А, содержащим 1.14% (m/v) Triton X-100, и либо 2 mM CaCl₂ (темновое состояние), либо 2 mM EGTA (световое состояние), инкубировали в течение 10 мин при 4°C, при перемешивании. Полученный раствор смешивали с 8 мл 80% (m/v) сахарозы в буфере А с добавлением 2 mM CaCl₂ или 2 mM EGTA и аккуратно наслаивали сверху 16 мл 30%-ого раствора сахарозы, и 8 мл 5%-ого раствора сахарозы в том же буфере. Препараты центрифугировали 100000 g (ротор SW-28, Beckman L7-70) при 4°C в течение 6 ч. Собирали 13 фракций, начиная с верха пробирки по 3 мл с использованием капиллярной трубки и перистальтического насоса. Детекцию белков в полученных фракциях проводили с помощью вестерн-блоттинга с использованием соответствующих поликлональных антител. Комплексы антиген-антитело визуализировали в системе ChemiDoc™ MP (Bio-Rad) с использованием набора ECL (Bio-Rad).

2.2.20. Получение родопсинкиназы и отмытых мочевиной мембран НСП

Выделение родопсинкиназы проводили, как описано в работе [152], с некоторыми изменениями. НСП, полученные из 100 сетчаток, гомогенизировали в темноте в 10 мл буфера А (20 мМ Трис, рН 8.0, 2 мМ MgCl₂, 1 мМ ДТТ, 0.04% Triton X-80, ингибиторы протеиназ) в стеклянном гомогенизаторе при 4°С. Полученную суспензию центрифугировали в течение 30 мин. Отделяли супернатант, осадок ресуспендировали в 10 мл буфера Б (буфер А, содержащий 300 мМ NaCl) и гомогенизировали с последующим центрифугированием. При этом родопсинкиназная активность переходила в супернатант; указанную процедуру повторяли еще 2 раза, после чего полученные после центрифугирования супернатанты объединяли и разбавляли буфером Г в 5 раз. Полученный экстракт фильтровали через нитроцеллюлозные мембраны 0.22 мкм типа “НА” и наносили на колонку (10x50 мм), содержащую 15 мл гепарин-агарозы (Sigma, США), которая была предварительно уравновешена буфером А, со скоростью 12 мл/час. После нанесения на колонку белковой фракции, содержащей родопсинкиназную активность, гепарин-агарозную колонку промывали 40 мл буфера А для элюирования не связавшихся с носителем белков; элюирование родопсинкиназы проводили буфером Б со скоростью 12 мл/час. Фракцию, содержащую родопсинкиназную активность, разбавляли в 5 раз буфером А и наносили на анионообменную колонку DE-52 10x50 (Pharmacia, Швеция), содержащую 5 мл носителя со скоростью 10 мл/час; далее колонку промывали 20 мл буфера А. Родопсинкиназу элюировали с колонки DE-52 буфером А, содержащим 400 мМ NaCl. Полученный препарат родопсинкиназы (около 70 мкг) с чистотой более 70% (по данным электрофореза в ПААГ в присутствии ДСН и аминокислотного анализа) хранили при 4°С в течение максимум 3 дней.

Полученные после экстрагирования родопсинкиназы мембраны НСП, содержащие родопсин, промывали буфером А, содержащим 6 М мочевины. Затем выдерживали на льду 10 мин, и центрифугировали (30 мин., 4°С, 20000g). После осаждения мембраны промывали буфером А, и центрифугировали (10 мин., 20000 g). Для удаления мочевины промывание буфером А повторяли 3-4 раза.

Полученные таким образом мембраны НСП не содержали собственной родопсинкиназной активности.

2.2.21. Фосфорилирование родопсина в суспензии НСП

Фосфорилирование родопсина в суспензии НСП проводили как описано в работе [153], с некоторыми изменениями. В реакционной смеси (общий объем 100 мкл), содержащей 50 мМ Трис рН 7.5, 100 мМ NaCl, 2 мМ MgCl₂, 1 мМ GTP, 1 мМ ЭГТА и 10 мкМ родопсин; рековерин или его мутантные формы, CaCl₂.

Перед проведением реакции алиquotы суспензии НСП инкубировали в описанной выше реакционной смеси в темноте в течение 10 мин при 0°C, затем еще 2-5 мин при 25°C. Реакцию начинали световой вспышкой и добавлением 0.5 - 1 мМ [γ -³²P]-АТФ с удельной активностью 5-10 x 10⁵ ед. в минуту/нмоль. Реакцию останавливали добавлением 20 мкл инкубационного буфера для электрофореза по Лэммли, содержащего 300 мМ Трис-НСl (рН 6.8), 10% ДСН, 15% β -меркаптоэтанол, 50% глицерин. После электрофореза образцов из геля вырезали участок, соответствующий родопсину, и полученный участок геля растворяли в 1 мл 30%-ной H₂O₂ в течение 6 часов при 65°C до получения гомогенного раствора; включение ³²P в родопсин определяли методом жидкостносцинтилляционного счета.

2.2.22. Определение активности родопсинкиназы в реконструированной системе

Определение активности родопсинкиназы в реконструированной системе, содержащей отмытые мочевиной мембраны НСП и очищенную родопсинкиназу, проводили как описано в работе [154] с некоторыми изменениями. Реакционная смесь (общий объем 50 мкл) содержала 50 мМ Трис-НСl рН 7.5, 100 мМ NaCl, 2 мМ MgCl₂, 1 мМ ЭГТА, 0-1.3 мМ CaCl₂, 10-20 мкМ родопсин, рековерин, родопсинкиназу (50-100 нМ).

Перед проведением реакции алиquotы реакционной смеси инкубировали в темноте в течение 10 мин при 25-30°C; реакцию начинали световой вспышкой и

добавлением [γ - ^{32}P]-АТР (удельная активность $4\text{-}10 \times 10^5$ ед. в минуту/нмоль) до конечной концентрации $0.2 - 3$ мМ. Все дальнейшие процедуры были описаны в предыдущем разделе.

2.2.23. Определение активности гуанилатциклазы в реконструированной системе

Относительную активность гуанилатциклазы определяют, измеряя количество образовавшегося сGMP, в зависимости от изменения компонентов реакционной смеси. При слабом красном свете к 10 мкл отмытых наружных сегментов палочек, содержащим ROS-GC, добавляют 5 мкМ GCAP-1 или GCAP-2, в присутствии, или отсутствии 5 мкМ Cav. Белки инкубируют в течение 5 мин. при комнатной температуре поддерживая концентрацию свободного Ca^{2+} в диапазоне от 0.017 мкМ (низкий уровень кальция) до 33 мкМ (высокий уровень кальция) [155]. Реакцию инициируют добавлением 20 мкл 2.5-кратного активирующего буфера (75 мМ MOPS/КОН (pH 7.2), 150 мМ KCl, 10 мМ NaCl, 2.5 мМ DTT, 8.75 мМ MgCl_2 , 2.5 мМ GTP, 0.75 мМ АТР, и 0.4 мМ Zaprinast), и инкубируют в течение 5 мин. при 30°C . Останавливают реакцию добавлением 50 мкл 0.1 М EDTA и инкубации смеси при 95°C в течение 5 мин. Препараты центрифугируют в течение 10 мин. при 13000 об/мин. Количество образовавшегося сGMP детектируют с помощью ВЭЖХ с использованием обращено-фазовой хроматографической колонки Luna C18(2) (100\AA , 250×4.6 mm) (Phenomenex, США).

2.2.24. Преципитация белков на аффинном сорбенте (Pull-down assay)

Связывание рековерина с Cav определяли методом «pull-down assay» по следующей методике. НКС иммобилизовали на аффинном сорбенте, на шейкере Eppendorf «Mix Mate» 1400 об/мин в течении 1 при 4°C , в рабочем буфере, содержащим: 20 мМ Tris-HCl pH = 8.0, 100 мМ NaCl (общий объём каждой пробы = 50 мкл.). Затем сорбент отмывали от не связавшегося белка 3 раза по 1 мл буфером для отмывки, в зависимости от реакционной системы:

«+Ca²⁺»: 20 mM Tris-HCl pH = 8.0, 100 mM NaCl, 2 mM Ca²⁺, 2 mM Mg²⁺

«-Ca²⁺»: 20 mM Tris-HCl pH = 8.0, 100 mM NaCl, 2 mM EGTA.

После каждого цикла отмывки сорбент осаждали в центрифуге Eppendorf «Mini Spin» 3000 об/мин 3 минуты.

Затем рековерин преципитировали с белками GST и GST-Cav, следующим образом. Добавляли к сорбенту 100 мкл раствора, в зависимости от реакционной системы:

«+Ca²⁺»: 200 мкг рековерина, 20 mM Tris-HCl pH = 8.0, 100 mM NaCl, 2 mM Ca²⁺, 2 mM Mg²⁺

«-Ca²⁺»: 200 мкг рековерина, 20 mM Tris-HCl pH = 8.0, 100 mM NaCl, 2 mM EGTA.

Инкубировали на шейкере Eppendorf «Mix Mate» 1400 об/мин в течении часа при 4°C. Затем сорбент отмывали от не связавшегося белка 3 раза по 1 мл буфером для отмывки, в зависимости от реакционной системы:

«+Ca²⁺»: 20 mM Tris-HCl pH = 8.0, 100 mM NaCl, 2 mM Ca²⁺, 2 mM Mg²⁺, 0.1% Tween-20

«-Ca²⁺»: 20 mM Tris-HCl pH = 8.0, 100 mM NaCl, 2 mM EGTA, 0.1% Tween-20

После каждого цикла отмывки сорбент осаждали на настольной центрифуге Eppendorf «Mini Spin» 3000 об/мин 3 минуты. Белки, оставшиеся на сорбенте после отмывки, тотально элюировали 20 мкл 4X Sample buffer, и проводили электрофорез в ПААГ, в денатурирующих условиях. Количество связавшегося рековерина определяли денситометрически с помощью программы GelAnalyzer 2010a

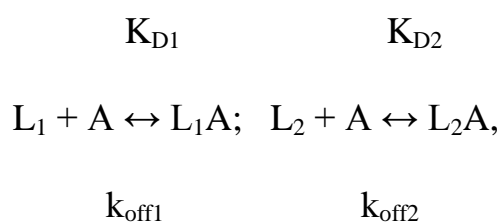
2.2.25. Взаимодействие функционального домена кавеолина-1 с НКС

Взаимодействие НКС с функциональным доменом кавеолина-1 (Cav81-101) проверяли методом изотермической калориметрии титрования (ИКТ) на приборах VP-ИКТ или ИКТ200 (MicroCal Ltd., США). Из-за ограниченной растворимости

пептида Cav81-101. Эксперименты проводили путем титрования раствора пептида различными концентрациями белков. Cav81-101 растворяли в 20% диметилсульфоксиде до предела его растворимости в 6 мМ и разбавляли до 270 мкМ буфером А (10мМ Tris-HCl pH 7.5, 150 мМ NaCl, 2 мМ MgCl₂, содержащий либо 2 мМ CaCl₂, либо 2 мМ EGTA). Рабочие концентрации НКС - 320 мкМ. Диметилсульфоксид добавляли к белковым растворам до конечной концентрации 0.9% для того, чтобы уравновесить его содержание в ячейке и шприце. Образцы дегазировали, титровали при 25°C 30-ю инъекциями по 10 мкл с 5-минутными интервалами для VP-ИКТ или 19 инъекций по 2 мкл с интервалами 80 с для ИКТ200. Расчёт изотерм связывания выполняли путём вычитания изотерм, зарегистрированных при титровании НКС, в соответствующий буфер без Cav81-101, и титрования буфера в Cav81-101. Данные были обчислены с использованием программного обеспечения OriginPro 2015 (OriginLab Corporation).

2.2.26. Взаимодействие функционального домена кавеолина-1 с рековерином методом ППР.

Измерения проводились на приборе «Bio-Rad ProteOn™ XPR36», с использованием «ProteOn GLH sensor chip» [156] при 25°C. В качестве иммобилизованного лиганда выступал тир-рековерин в 10 мМ Na-ацетатном буфере pH 4.5. Иммобилизация производилась по аминокетам, согласно методике производителя. Оставшиеся активные группы инактивировались раствором 1 М этаноламина. Cav в концентрациях 5-15 мкМ выступал в качестве аналита, в буферной системе: 10 мМ HEPES (pH 7.4), 150 мМ NaCl, 0.05% Tween 20 и 1 мМ CaCl₂/EGTA. Полученные сенсограммы обчисывались в соответствии с моделью гетерогенного лиганда, которая предполагает существование двух модификаций лиганда (L1 и L2), которые связывают молекулу аналита (A):



Где K_D – кинетическая, а k_{off} – равновесная, константы диссоциации. Выбор гетерогенной модели лиганда основывается на особенностях иммобилизации лиганда на поверхности сенсорного чипа, что может приводить к появлению конформаций лигандов, имеющих более низкое сродство к аналиту. Значения K_D и k_{off} , получены с использованием программного обеспечения Bio-Rad ProteOn Manager™ v.3.1. Поверхность сенсорного чипа регенерировали путем пропускания 0.5% раствора SDS в течение 50 с, затем промывали буфером: 10 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20.

2.2.27. Взаимодействие N-концевого фрагмента кавеолина-1 с миристиновой кислотой

Значения критической мицеллярной концентрации (КМК) миристиновой кислоты (МА) измеряли с использованием спектрофотометра Cary 100 (Varian Inc.), как описано в [157]. 200 мкл буфера (10 mM Трис-НСl-буфера, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA) или раствора Cav в том же буфере (20,81 или 129 мкМ) титрировали аликвотами (1 мкл) раствора МА в 96% этаноле (5-10 mM) при 25°C. Максимальная концентрация этанола была ниже 5% (v/v). После каждой порции МА сигнал уравнивался в течении 30 с. Мицеллообразование МА измерялось в соответствии с увеличением светового рассеяния, регистрируемым фотометрически при 340 нм. Способность Cav связывать МА, оценивали, как наклон кривой КМК МА от концентрации Cav, с использованием программного обеспечения OriginPro 2015:

$$КМК = КМК_0 + n_{max}[Cav]$$

Где $КМК_0$ измеряется в отсутствии Cav.

2.2.28. Дисульфидная димеризация рековерина дикого типа in vitro

Рековерин дикого типа, в концентрации 200 мкМ, в объеме 500 мкл. помещали в диализную кассету, и проводили ковалентную димеризацию в отсутствии и присутствии эквимольных количеств различных форм N-концевого фрагмента кавеолина-1 в течении 24 часов при температуре +4°C. Реакционная

система содержала 10 мМ Трис pH=9, 150 мМ NaCl, 5 мМ CaCl₂, 150 мкМ H₂O₂. Количество образовавшего димера оценивали с помощью денситометрического анализа электрофореграмм, полученных в невосстанавливающих условиях, в нескольких временных точках: 1, 2, 3, 5, 7 и 24 ч. Выход димерной формы составлял 60-75%. Разделение димерной и мономерной форм белка проводили методом гель-фильтрационной хроматографии на сорбенте Superose 12 (GE Healthcare, США) в изократическом режиме – 10 мМ Трис pH=7.5, 150 мМ NaCl, 2 мМ CaCl₂.

2.2.29. Дисульфидная димеризация рековерина при окислительном стрессе в клетках линии MDCK

Клетки линии Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) культивировали в среде DMEM-FBS: Dulbecco's modified Eagle's (DMEM), 10% FBS, 100 U/mL антибиотик-антимикотика, в 5% CO₂ при 37°C. Для снятия с подложки использовали раствор 0.25% трипсин/ЕДТА.

Клетки пересеивали с матрица на 96-луночный культуральный планшет (Costar, США) за сутки до трансфекции в среде DMEM-FBS. На одну лунку засеивали по 5*10⁴ клеток. Через 24 часа среду в лунках меняли на 90 мкл DMEM (без FBS, без Антибиотик-Антимикотика). В пробирке подготавливали смесь для трансфекции. Реагент ViaFect предварительно прогревали до комнатной температуры, для одной лунки 96-луночного планшета использовали 10 мкл смеси: 150 нг ДНК (плазмида pCI-neo-Res, содержащая ген рековерина была синтезирована ранее фирмой Евроген, Россия), 0.6 мкл ViaFect (соотношение ДНК:ViaFect = 1:4, мкг DNA : мкл reagent), DMEM до объема 10 мкл. Смесь интенсивно перемешивали, инкубировали 20 мин при комнатной температуре, повторно перемешивали и переносили в лунку культурального планшета. Далее снова перемешивали в течение 1 мин используя планшетный шейкер. Количество ДНК и соотношение ДНК-ViaFect определяли заранее экспериментальным путем.

Дальнейшие эксперименты с клетками проводили через 24 часа после внесения трансфекционной смеси. Для модулирования условий окислительного

стресса трансфецированные клетки инкубировали в растворе перекиси водорода в среде DMEM. В соответствии с экспериментом использовали различные концентрации перекиси водорода, и время инкубации. Далее, среду убирали и в лунки вносили по 20 мкл лизирующего буфера (140 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2.2% SDS, 10 mM ICH₂CONH₂), пипетировали, переносили в пробирки и анализировали методом вестерн-блоттинга.

2.3. Аналитические процедуры

2.3.1. Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ)

Электрофорез в ПААГ в присутствии 0.1 % SDS проводили по методу Лэммли при концентрациях разделяющего и концентрирующего гелей 12.5 или 15 % и 4 %, соответственно. В качестве стандартов молекулярных масс использовали набор белков-маркеров «PageRuler Prestained Protein Ladder» (Thermo Scientific, США). Белки в электрофоретическом геле окрашивали Куммасы G-250 в присутствии 10 % HClO₄, не связавшийся краситель отмывали водой.

2.3.2. Иммуноблоттинг

Перенос, электрофоретически разделённых белков, на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли в буфере для переноса: 25 mM Tris-HCl, 192 mM C₂H₅NO₂, 10% CH₃OH, pH = 8.3, в камере для переноса LKB (Швеция) в течение одного часа при 0.6 А и 70 В. Свободные центры связывания на нитроцеллюлозной мембране блокировали в растворе TBS-T (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20), содержащим 1% сухое молоко при 37°C в течение 1 ч. Контрольную полосу окрашивали амидочёрным. Образцы инкубировали с раствором моноклональных антител в TBS-T в соотношении 1:1000, соответственно, в течение 90 мин при 25°C. Отмывали нитроцеллюлозную мембрану от не связавшихся антител раствором TBS-T 3 раза по 5 мин при 25°C. Антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, разводили так же в растворе TBS-T в соотношении 1:1000 и инкубировали мембрану в этом растворе на протяжении 90 мин при 25°C, затем отмывали от не связавшихся антител так же,

как и в предыдущем случае. После промывки мембрану проявляли в растворе, содержащем 3.3-диаминобензидин, перекись водорода, конечной концентрации – 0.1 % и 100 мМ Tris-HCl, pH=7.5. Реакция останавливали промывкой образца дистиллированной водой, после чего образец высушивали на воздухе.

2.3.3. Определение концентрации белков

Концентрацию полученных белковых препаратов определяли спектрофотометрическим и методом Бредфорд.

Спектрофотометрический метод. Концентрацию белка определяли с помощью спектрофотометра ULTROSPEC-II (LKB, Швеция) следующим образом. Измеренное значение светопоглощения при длине волны 280 нМ делили коэффициент молярного поглощения, рассчитанный, для каждого белка, по следующей формуле:

$$\frac{Trp(W) \times 5690 + Tyr(Y) \times 1280 + Cys(C) \times 120}{Mr},$$

где Mr - молекулярная масса белка. Таким образом было получено численное значение концентрации белка в пробе, в размерности мг/мл.

Метод Бредфорд. Механизм метода основан на необратимом связывании белка с красителем Куммасы G-250. Реактив Бредфорд готовили следующим образом. 50 мг Куммасы G-250 растворяли в 25 мл 96% этилового спирта, добавляли 50 мл 85% ортофосфорной кислоты, и доводили объём до 500 мл деионизированной водой. Полученный раствор фильтровали через бумажный фильтр. Затем готовили пробы: 500 мкл раствора белка смешивали с 500 мл реактива Бредфорд и оставляли на 3 минуты для полного протекания реакции. Измеренное значение светопоглощения при длине волны 595 нМ пересчитывали на концентрацию в соответствии со значениями калибровочной кривой, построенной по известным концентрациям БСА для данного реактива Бредфорд.

2.3.4. Приготовление кальциевых буферов и определение количества кальция, связанного с рековерином

Кальциевые буферы были приготовлены на основе 2 мМ раствора ЭГТА (для получения $[Ca^{2+}]_{своб}$ в диапазоне 10 - 500 нМ) либо 100 мМ раствора цитрата натрия (для получения $[Ca^{2+}]_{своб}$ в диапазоне 0.5 - 500 мкМ). Величины $[Ca^{2+}]_{своб}$ в буферных растворах рассчитывали с помощью программы “Webmaxc 2.10” (Стэндфордский университет, США). Правильность рассчитанных соотношений Ca^{2+} / цитрат натрия, при $[Ca^{2+}]_{своб}$ выше 1 мкМ, проверяли с помощью Ca^{2+} -чувствительного электрода (World Precision Instruments, Inc, США.).

Связывание Ca^{2+} с рековерином определяли методом ультрафильтрации, который включал следующие стадии. В верхний отсек концентратора Centricon-10 (задерживает белки размером свыше 10 кДа) (Millipore, США) помещали 0.5 мл 50 или 100 мкМ раствора рековерина в 20 мМ HEPES буфере, pH 7.5, содержащем 100 мМ NaCl и 1 мМ ДТТ, в который были добавлены 10 мкл 0.2 мМ раствора $^{45}CaCl_2$ (0.4 – 0.5 мкКюри). Пробы центрифугировали (7000 об/мин, 1 мин) в настольной центрифуге BECKMAN TJ-6, из нижнего и верхнего отсеков концентратора отбирали по 15 мкл раствора и измеряли радиоактивность этих растворов методом жидкостносцинтилляционного счёта. Далее в верхний отсек концентратора, в котором присутствовал задержанный фильтром белок, добавляли 15 мкл 0.2 мМ раствора нерадиоактивного $CaCl_2$, после чего пробы вновь центрифугировали. Процедуру добавления раствора нерадиоактивного $CaCl_2$ и центрифугирования повторяли несколько раз таким образом, чтобы расчетная величина $[Ca^{2+}]_{своб}$ достигала примерно 300 мкМ (при более высоких значениях $[Ca^{2+}]_{своб}$ ошибка эксперимента значительно возрастает). Результаты описанного эксперимента обрабатывали по формуле:

$$Ca^{2+}_{своб} = R_f/R_p * Ca^{2+}_{total},$$

где R_f – уровень радиоактивности в растворе нижнего отсека, R_p – уровень радиоактивности в растворе верхнего отсека, $Ca^{2+}_{своб}$ и Ca^{2+}_{total} – соответственно, свободная и общая концентрация Ca^{2+} .

Количество моль Ca^{2+} (N), связанного на моль белка, рассчитывали по формуле:

$$N = (\text{Ca}^{2+}_{\text{total}} - \text{Ca}^{2+}_{\text{своб}}) / P_{\text{total}},$$

где P_{total} – общая концентрация белка в пробе.

2.3.5. Компьютерное моделирование и вычисления

Моделирование пространственных структур проводилось с помощью программного обеспечения и вычислительных мощностей сервиса «ZhangLab» (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu>).

Для моделирования пространственных структур N-концевого фрагмента кавеолина-1 (M1-R101), соответствующего нативной форме, и мимика фосфорилированной формы (Y-14-E) использовалась программа «I-Tasser» (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>)

Для моделирования пространственной структуры функционального домена кавеолина-1 (F81-R101) использовался сервис «Quark» (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/QUARK/>), а так же, сервис «PEP-FOLD» (<https://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD/>)

Анализ белковых последовательностей на наличие взаимодействий осуществлялся с помощью сервиса «MolBridge» (<http://nucleix.mbu.iisc.ernet.in/molbridge/index.php>), а так же с помощью программы «Ligplot+».

Определение степени неупорядоченности белковых структур по их аминокислотной последовательности выполнялось с помощью сервиса «PONDR» (<http://www.pondr.com>)

2.3.6. Вспомогательное программное обеспечение

При оформлении работы и обработке полученных результатов использовались следующие программы:

1. Sigmaplot 12.5 – построение графиков, диаграмм, вычисление констант и коэффициентов уравнений, статистический анализ результатов.
2. Photoshop 12, CorelDraw X6 – создание рисунков к работе.
3. GelAnalyzer 10a, imageJ – денситометрический анализ электрофореграмм.
4. PyMol – графическое представление трёхмерных белковых структур.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Совместная локализация белков семейства НКС с кавеолом-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 (рис.13). С учетом этого наблюдения, было высказано предположение, что НКС могут образовывать комплексы с кавеолом-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, GСАР1 и GСАР2 – и содержащих в своем составе стопку фоторецепторных дисков, обогащенных рафт-структурами.

NCS1	60-DPTK	F A T F V F N V F	DENKD-78
Рековерин	61-DPKA	Y A Q H V F R S F	DSNLD-79
GСАР1	51-SASQ	Y V E Q M F E T F	DFNKD-69
GСАР2	53-EASQ	Y V E G M F R A F	DKNGD-71

Рисунок 13. Выравнивание аминокислотных последовательностей, исследуемых НКС, с указанием сайта взаимодействия с кавеолом-1 – серый цвет. Аминокислотные остатки, ответственные за связывание указаны жирным крупным шрифтом.

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. 14). При этом аналогичные фракции, полученные в условиях высокой концентрации кальция, практически лишены GCAP1 и GCAP2, однако содержат повышенную концентрацию реоверина и NCS-1. Последнее, скорее всего, отражает низкоспецифичное связывание с мембранами Ca^{2+} -заполненных форм реоверина 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.

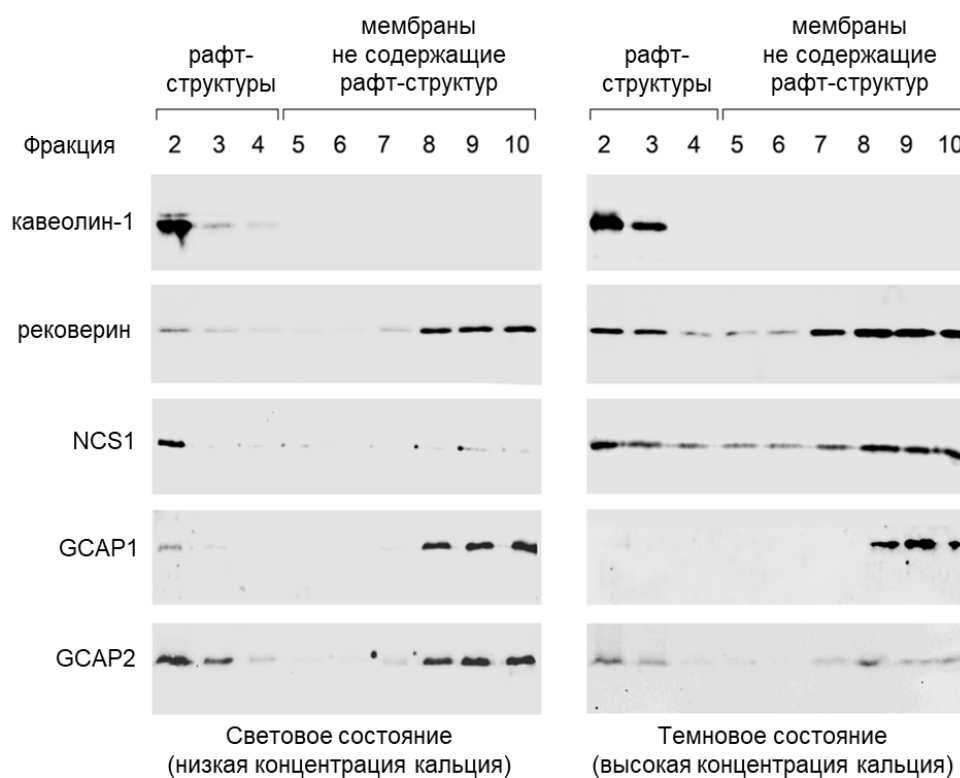


Рисунок 14. Распределение кавеолина-1 и белков НКС во образцах, полученных в результате фракционирования НСП в градиенте сахарозы, по данным метода иммуноблоттинга с использованием соответствующих антител.

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 свойственные им мишени при высокой концентрации внутриклеточного кальция.

В целом, можно заключить, что фоторецепторных клетках сетчатки бескальциевые формы белков семейства НКС – рековерина, NCS-1, GСАР1 и GСАР2 – локализуются в мембранных рафт-структурах совместно с кавеолином-1.

3.2. Очистка белков семейства НКС

Рекомбинантные формы белков - рековерин, NCS1, GPCA1 и GСАР2 были получены по методикам, разработанным ранее в нашем коллективе [44] [159] (рис. 15), с некоторыми усовершенствованиями. Так, была значительно улучшена методика экспрессии, с целью получения максимальной степени миристоилирования НКС. Кроме этого, были проведены исследования по оптимизации разделения миристоилированной и немиристоилированной формы НКС с использованием ряда гидрофобных сорбентов. Для обеспечения N-концевого миристоилирования в клетках используется N-миристоилтрансфераза из *Saccharomyces cerevisiae*, которая не в полной мере может распознавать N-концевые сигнальные последовательности НКС, что сказывается на степени миристоилирования (табл. 2).

К тому же, белки НКС интенсивно взаимодействуют с липидными мембранами, особенно в миристоилированном состоянии, что так же уменьшает обнаружение их миристоилированных форм в растворимой фракции. И если для рековерина степень миристоилирования белка, экспрессируемого в растворимую фракцию как правило, около 90-95%, то для GСАРs, а особенно для NCS1 этот показатель значительно ниже (до 10%), что естественно будет отрицательно сказываться на проведении функциональных тестов.

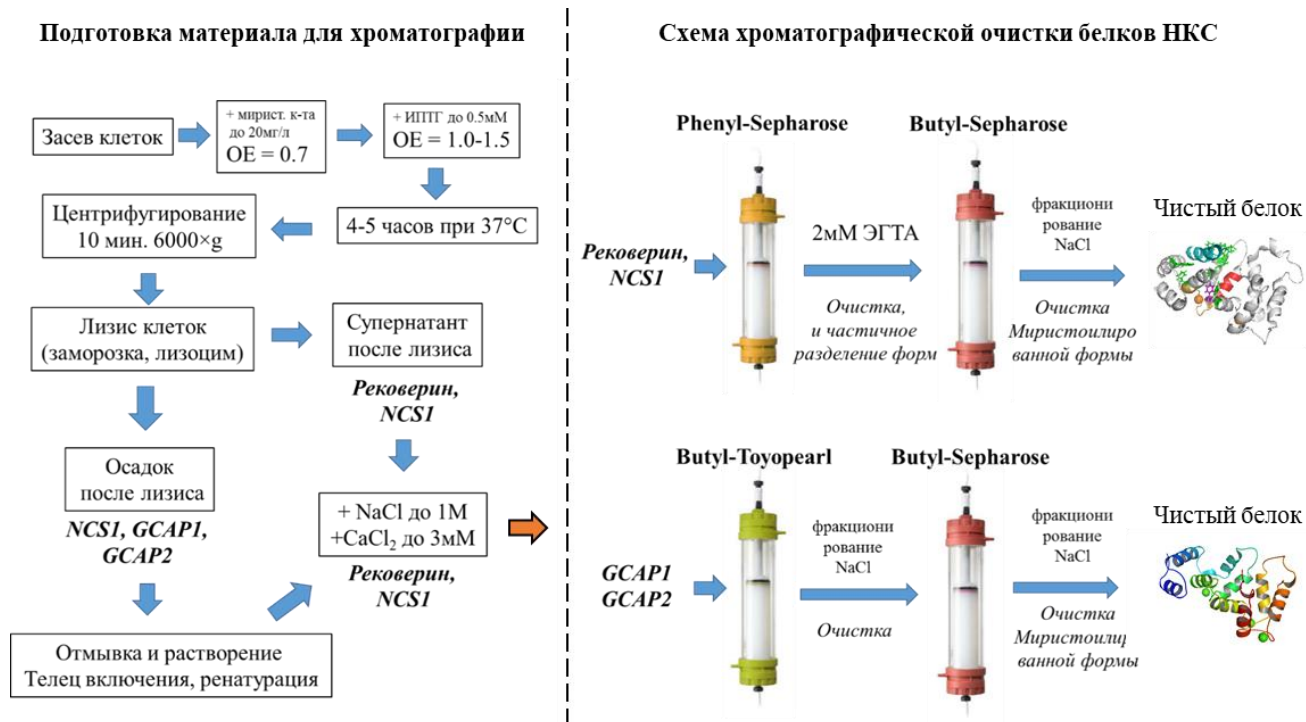


Рисунок 15. Принципиальная схема очистки НКС.

Таблица 2. Распределение белков НКС, и степени их миристоилирования, при экспрессии в растворимой форме (С) и в виде телец включения (О).

НКС	Рековерин		NCSI		GCAP1		GCAP2	
	С	О	С	О	С	О	С	О
Тип фракции	С	О	С	О	С	О	С	О
Общий белок, % ($\pm 10\%$)	70	30	50	50	25	75	0	100
Миристоилирование, % ($\pm 10\%$)	90	90	20	80	0	80	-	80

Было обнаружено, что при использовании гидрофобной хроматографии на сорбенте Butyl Sepharose (GE Healthcare, США) возможно разделить миристоилированные и немиристоилированные формы НКС, причём важно, что другие гидрофобные сорбенты, используемые на первых стадиях очистки (Phenyl Sepharose для рековерина и NCSI, и Butyl Toyopearl для GCAPs) не обладают этой способностью [160]. Так как разделение происходит за счёт слабых гидрофобных

взаимодействий, то для получения чёткого разделения необходимо использовать ступенчатый (рис. 16А), а не градиентный (рис. 16Б) метод элюции.

Кроме этого, для получения миристоилированной формы белка NCS1, помимо очистки из растворимой фракции целесообразно так же проводить экстракцию белка из мембранной фракции. Основная ценность разработанной методики заключается в том, что при экспрессии белка с любой степенью миристоилирования возможно, применяя описанный хроматографический цикл (в некоторых случаях несколько раз), получить в конечном счёте препарат белка со степенью чистоты и миристоилирования выше 95%.

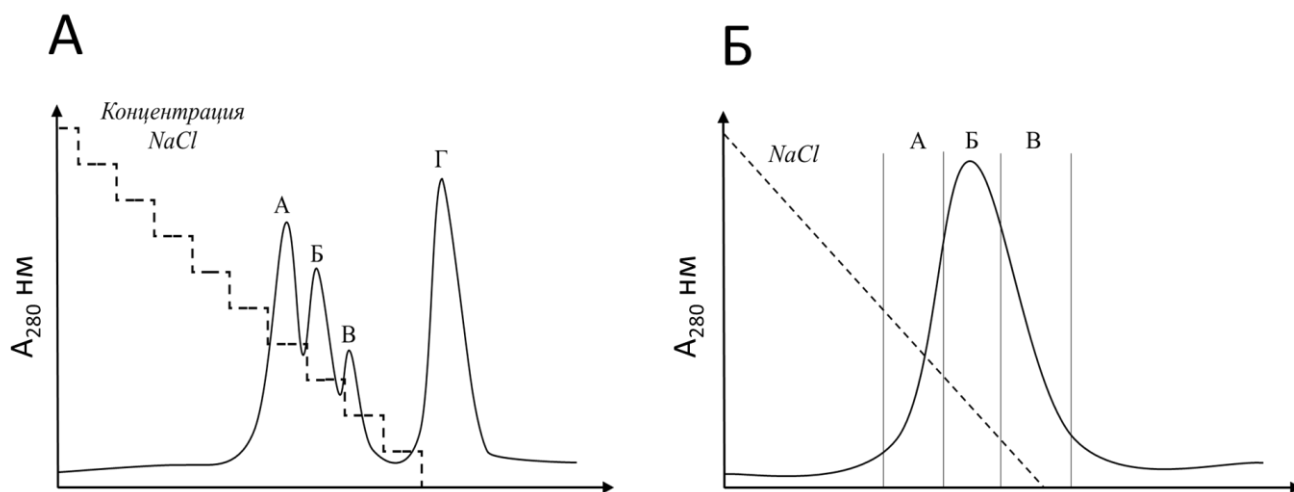


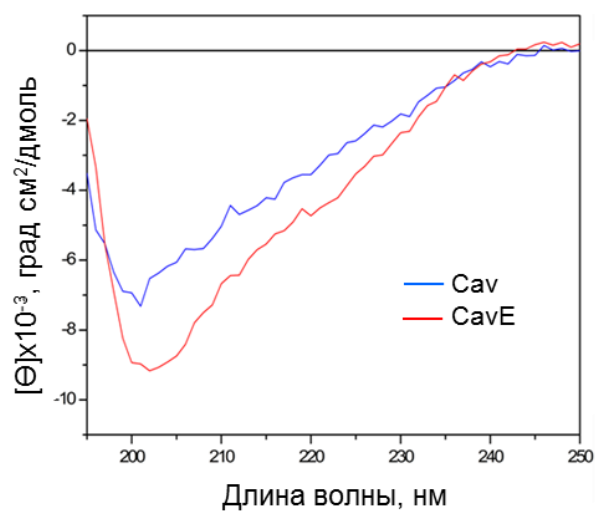
Рисунок 16. А - Профиль элюции NCS1, сорбент – Butyl Sepharose. Элюция, проводимая ступенчатым уменьшением концентрации NaCl с 1000 до 0 мМ, ступеньки – каждые 100мМ. Фракции со степенью миристоилирования: А - 2-5%, Б – 5-10%, В – 60-90%, Г – 90-99%. Б - Элюция проводилась непрерывным уменьшением концентрации NaCl с 1000 до 0 мМ. Фракции со степенью миристоилирования: А - 10-25%, Б – 25-50%, В – 50-95%.

3.3. 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. 17).

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. 18). 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.



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 17. Результаты анализа вторичной структуры Cav и CavE методом спектроскопии КД.

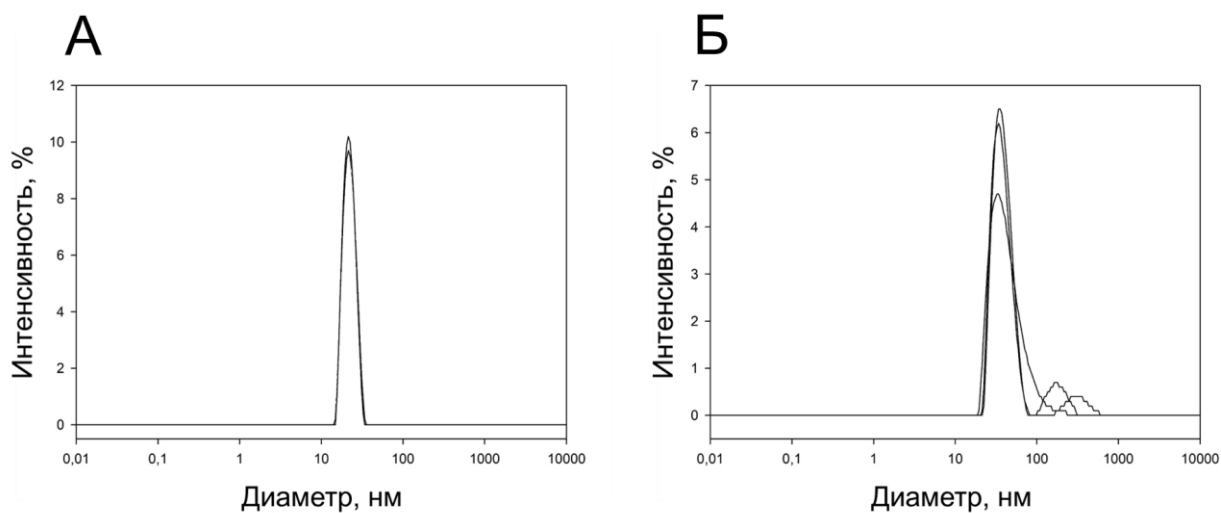


Рисунок 18. Результаты анализа мультимеризации Cav (А) и CavE (Б) методом ДРС

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

Первичная характеристика комплексов полученных НКС с кавеолином-1 была осуществлена с помощью метода аналитической аффинной хроматографии, где в качестве активной группы выступал C_{av}, ковалентно иммобилизованный на хроматографической матрице (рис. 19). Как видно из Рис. 20, все четыре исследуемых НКС связываются с иммобилизованным C_{av}, 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 кавеолином-1 специального сайта в структуре этих белков.

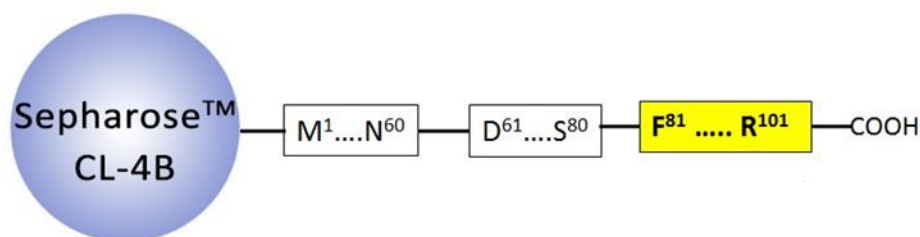


Рисунок 19. Принципиальная схема аффинного сорбента

Учитывая важность остатка N-концевой миристиновой кислоты (МА) для структуры и активности белков НКС, эксперименты были выполнены как с миристоилированными, так и с немиристоилированными формами белков. Было показано, что все четыре исследованные НКС, взаимодействуют с C_{av}, и эффект более выраженным в отсутствие Ca²⁺, независимо от миристоилирования НКС (рис. 20).

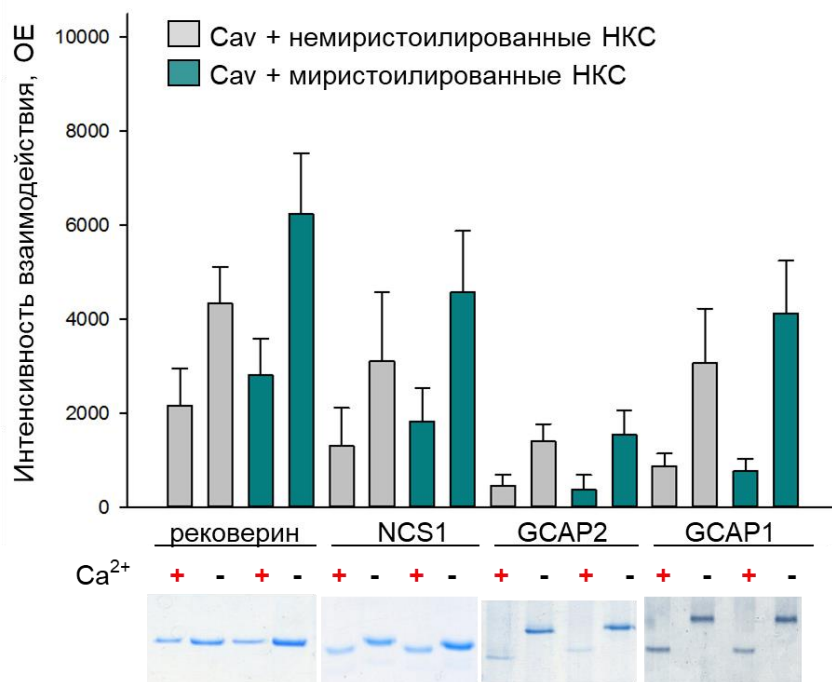


Рисунок 20. Взаимодействие различных форм НКС с аффинным сорбентом, содержащим иммобилизованный Cav в присутствии (2 мМ Ca²⁺) или в отсутствие (2 мМ ЭГТА) кальция.

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. 21). Полученные результаты обрабатывались с применением модели гетерогенного лиганда, учитывающей неспецифические взаимодействия (K_{D2} на Рис. 21). Оказалось, что рековерин образует комплекс с Cav только в отсутствие ионов кальция, при этом величина константы диссоциации этого комплекса (K_{D1} на Рис. 21) 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

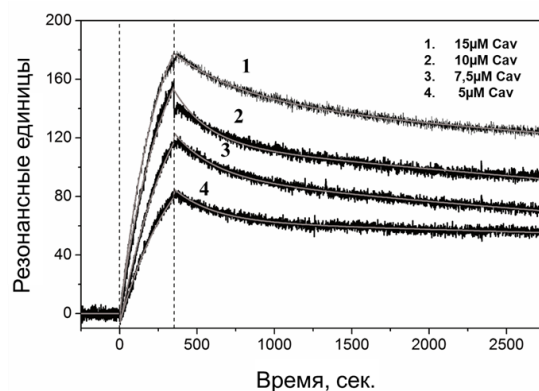


Рисунок 21. Кинетические и равновесные параметры взаимодействия бескальциевой формы рековерина с Cav, определенные с использованием ППР-биосенсора.

3.5. Взаимодействие N-концевого фрагмента кавеолина-1 с миристиновой кислотой

Наблюдаемый в предыдущем эксперименте эффект более интенсивного связывания миристоилированных форм НКС вполне мог быть вызван взаимодействием Cav с самой миристиновой кислотой миристиновой кислотой (МА). Что вполне логично, учитывая важную роль кавеолина-1 в транспорте холестерина и других гидрофобных молекул через липидную мембрану. Для исследования способности МА взаимодействовать с Cav использовали подход, разработанный ранее для исследования связывания олеиновой и линолевой кислоты с различными белками: α -лактальбумины, α -парвальбумин, β -лактоглобулин и человеческий сывороточный альбумин [157], [162]. Эффективные значения концентрации критической мицеллярной концентрации (КМК) МА получали с использованием метода титрования раствора МА, раствором N-концевого фрагмента кавеолина-1. Мицеллообразование МА регистрировали по увеличению рассеяния света, при длине волны 340 нм. (N_{max}) Cav, рассчитывалось, как наклон прямой эффективного КМК МА от концентрации белка, и был равен 1.8 (рис. 22), что указывает на то, что МА может участвовать во взаимодействии миристоилированных форм НКС в условиях насыщающих концентраций кальция, с Cav. Это объясняет частичное

взаимодействие НКС с кавеолином-1 наблюдаемое в системах с высокими концентрациями кальция.

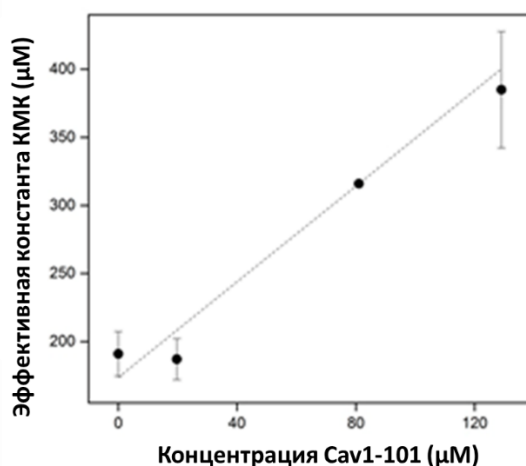


Рисунок 22. Взаимодействие Cav с миристиновой кислотой.

3.6. 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 функциональный домен F81-R101, мы предположили, что именно этот домен может выступать в роли сайта связывания НКС. Для проверки этого предположения была изучена способность реCOVERина, NCS-1, GCAP1 и GCAP2 взаимодействовать с соответствующим синтетическим пептидом (“Cav81-101”) методом ИКТ (рис 23). В отсутствие ионов кальция все исследуемые НКС демонстрируют выраженное эндотермическое связывание с Cav81-101 (Таблица 4). 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 > реCOVERин > 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 4. 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

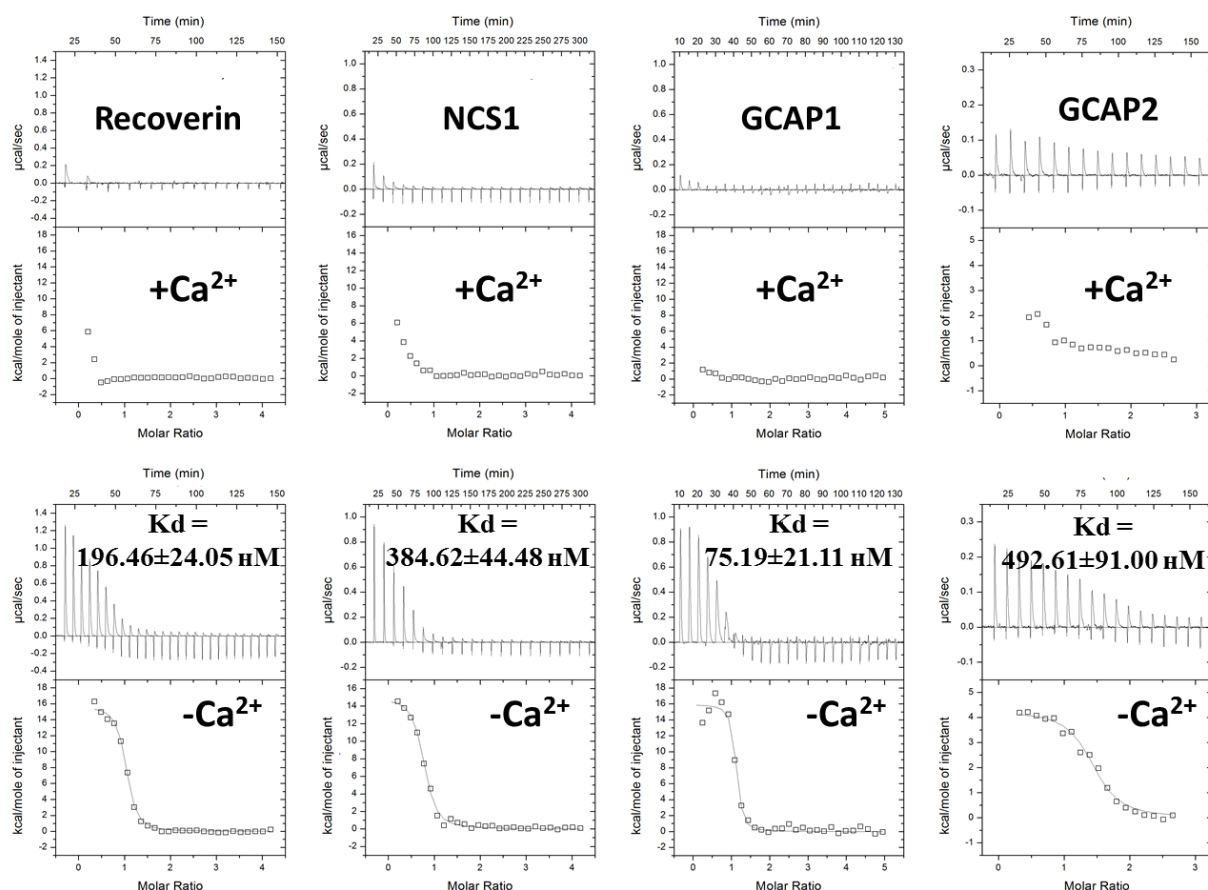


Рисунок 23. Исследование взаимодействия НКС с Cav81-101 методом изотермической калориметрии титрования, при разных концентрациях кальция.

В целом, на основании полученных данных можно заключить, что бескальциевые формы реоверина, 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.

3.7. 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. 24). 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 реоверина была проведена проверка возможной специфичности указанного сайта в отношении кавеолина-1. Для этого была получена мутантная форма реоверина 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 реоверина дикого типа (Таблица 5). Таким образом, аминокислотные остатки, формирующие специализированный сайт ArXXXXArXXAr, обнаруженный нами в структуре НКС, скорее всего, не участвуют во взаимодействии реоверина с кавеолином-1 (Таблица 5).

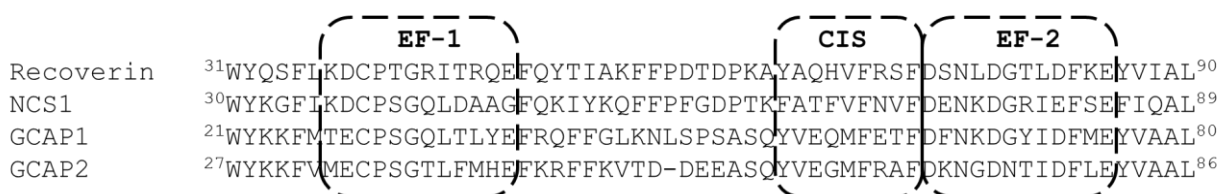


Рисунок 24. Выравнивание аминокислотных последовательностей N-концевого домена исследуемых НКС. Первый (неактивный) и второй Ca^{2+} -связывающие центры типа EF-hand, а также потенциальный кавеолин-1-связывающий сайт обозначены как EF-1, EF-2 и CIS (caveolin-1 interacting site), соответственно.

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

Для дальнейшего поиска сайта связывания кавеолина-1 в молекуле реCOVERина был использован следующий подход. Как известно, каждый из двух доменов немиристоилированной формы реCOVERина 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 реCOVERина 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 5), что указывает локализацию соответствующего сайта в C-концевом домене реCOVERина.

Для идентификации аминокислот C-концевого домена реCOVERина, непосредственно участвующих в связывании с кавеолином-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 5).

Таблица 5. 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.

3.9. 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 – функциональный 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, функциональный 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. 25А). 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. 25Б). 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 (таблица 6), что хорошо согласуется с его термодинамическими характеристиками.

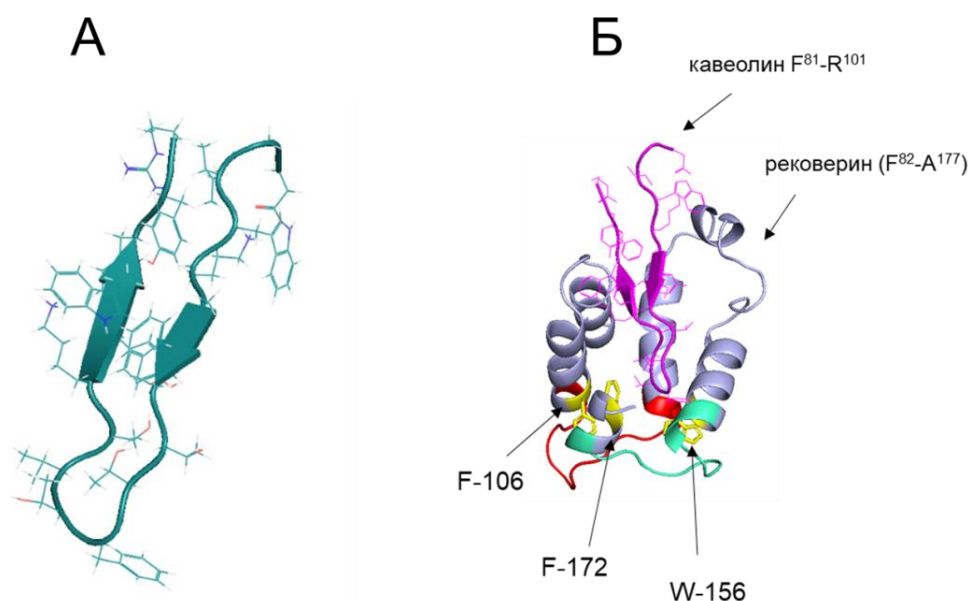


Рисунок 25. Пространственная структура комплекса бескальциевой формы рековерина с Cav81-101 по данным молекулярного моделирования. (А) Результаты моделирования структуры Cav81-101 с использованием сервисов «Quark» и «PEP-FOLD». (Б) Результаты молекулярного докинга С-концевого домена рековерина (F82-A177) 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 5). 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.

Таблица 6. Предположительные взаимодействия между аминокислотными остатками рековерина и кавеолина-1.

Вид взаимодействия	кавеолин-1	Рековерин	Длина связи
Водородные связи			
	Tyr96	Arg151	2,3 Å
Ионные взаимодействия	Asp81	His140	4,3 Å
	Lys85	Asp137	4,4 Å
Ароматические взаимодействия	Thr89	Phe106	6,1 Å
	Phe91	Phe158	4,7 Å
	Phe91	Phe159	6,3 Å
	Thr92	Phe172	4,3 Å
	Phe98	Thr93	3,1 Å
Катион-π взаимодействия	Tyr96	Arg151	4,2 Å
	Trp97	Lys101	3,5 Å
Гидрофобные взаимодействия	Thr89	Phe172	-
	Thr91	Phe172	-
	Val93	Val122	-
	Val93	Ile25	-
	Val93	Val126	-
	Val93	Ile155	-
	Tyr96	Ile129	-
	Tyr96	Ile133	-
	Tyr96	Leu141	-
	Trp97	Ala95	-
	Phe98	Ile133	-
	Phe98	Ala95	-
Tyr99	Ala95	-	

Таким образом, связывание бескальциевой формы реверина 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 реверина.

3.10. 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 реверина и NCS1 в качестве тест-системы была использована реакция фосфорилирования зрительного рецептора родопсина родопсинкиназой (G-protein coupled receptor kinase-1, GRK1). Как и ожидалось, реверин и NCS1 ингибировали активность GRK1 только при высокой концентрации Ca^{2+} (Рис. 26А). 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.

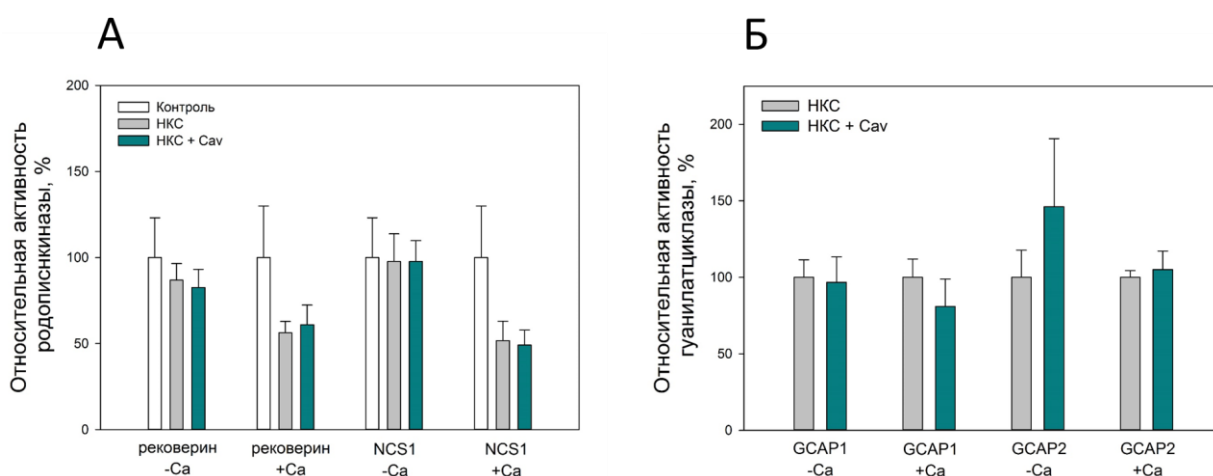


Рисунок 26. Влияние Cav на Ca^{2+} -зависимую регуляцию GRK1 (А) и ROS-GC1 (Б) под действием реверина/NCS1 и GCAP1/GCAP2, соответственно.

* - $p < 0,05$ по сравнению с активностью ферментов в отсутствие НКС/Сав (А) или в присутствии НКС, но в отсутствие Сав (Б) по результатам расчета непарного двустороннего t-критерия Стьюдента.

Для определения влияния кавеолина-1 на активность GСАР1 и GСАР2 было проведено исследование Ca^{2+} -зависимой регуляции фоторецепторной гуанилатциклазы-1 (ROS-GC1) под действием каждого из этих белков в присутствии и в отсутствие Сав (Рис. 26Б). Как видно, в случае бескальциевой формы GСАР2, предварительно проинкубированной с эквимоллярным количеством Сав, была зафиксирована заметная дополнительная активация ROS-GC1. Кроме того, в случае GСАР1 наблюдалось небольшое ингибирующее действие Сав 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 GСАР2 в отношении его мишени ROS-GC1.

3.11. 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 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (Рис. 27А) было установлено, что взаимодействие с Сав 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 Сав на координацию кальция в одном из EF-hand центров рековерине.

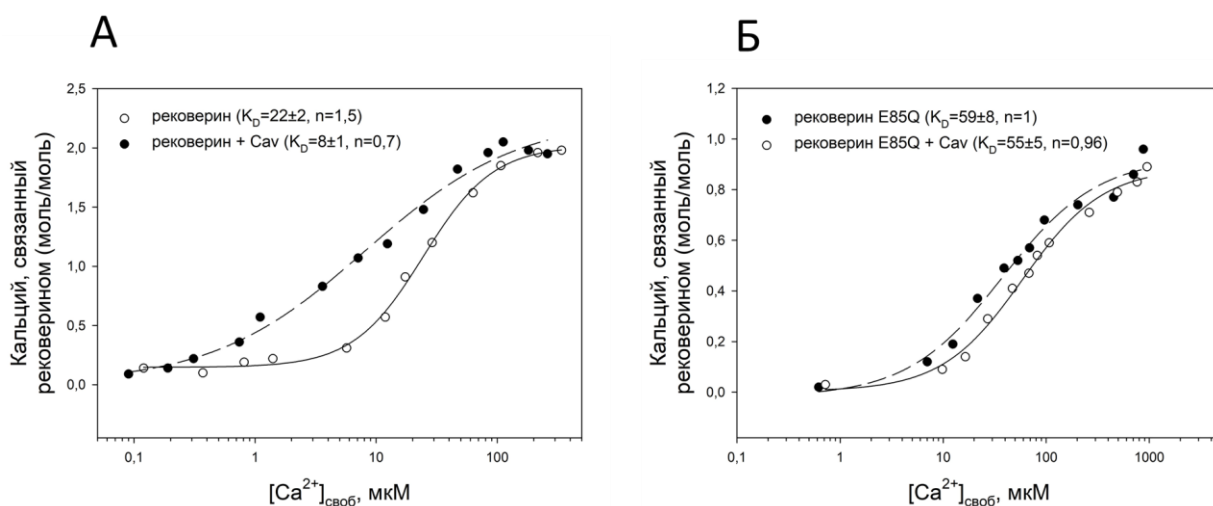


Рисунок 27. Влияние кавеолина-1 на связывание $^{45}\text{Ca}^{2+}$ с рековерином дикого типа (А) и его мутантной формы E85Q (Б).

Для идентификации этого центра было необходимо охарактеризовать влияние Cav на связывание $^{45}\text{Ca}^{2+}$ с мутантными формами рековерина, 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 рековерином (этот феномен связан с механизмом последовательного заполнения миристоилированного рековерина ионами кальция), что делает исследование этого мутанта нецелесообразным. Между тем, анализ мутанта рековерина E85Q показал, что произведенная замена полностью предотвращает эффект Cav на связывание Ca^{2+} с белком (Рис. 27Б). С учетом того, что взаимосвязь между доменами в рековерине определяется миристоильной группой, мы предполагаем, что связывание кавеолина-1 ослабляет взаимодействие этой группы с С-концевым доменом рековерина, что снижает междоменную кооперативность и повышает аффинность к ионам кальция центра EF-2 белка.

Для оценки влияния обнаруженного эффекта кавеолина-1 на регуляторную активность рековерина, 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.

3.12. Исследование редокс-чувствительности реверина *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 реверин 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 реверина *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 реверина у облученных животных (Рис. 28). 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. 29). 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.

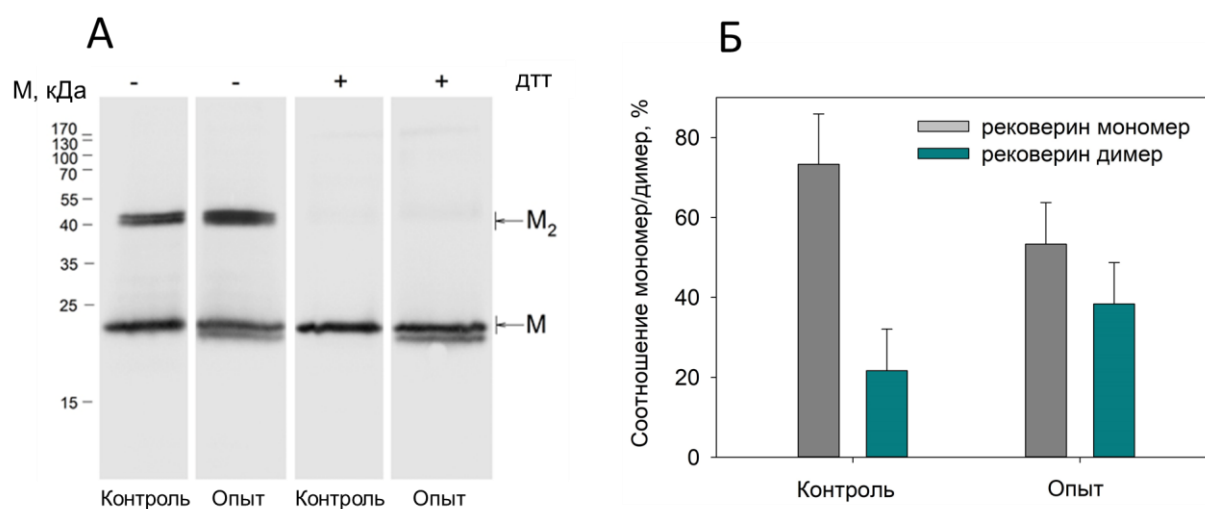


Рисунок 28. Дисульфидная димеризация рековерина в сетчатке крыс в условиях окислительного стресса, вызванного световым облучением (2500 люкс, 14 часов). (А) Иммуноблоттинг экстрактов сетчатки контрольных и облученных животных с использованием антител против рековерина, проведенный в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях. (Б) Соотношения фракций мономерной и димерной форм рековерина в сетчатке контрольных и облученных животных.

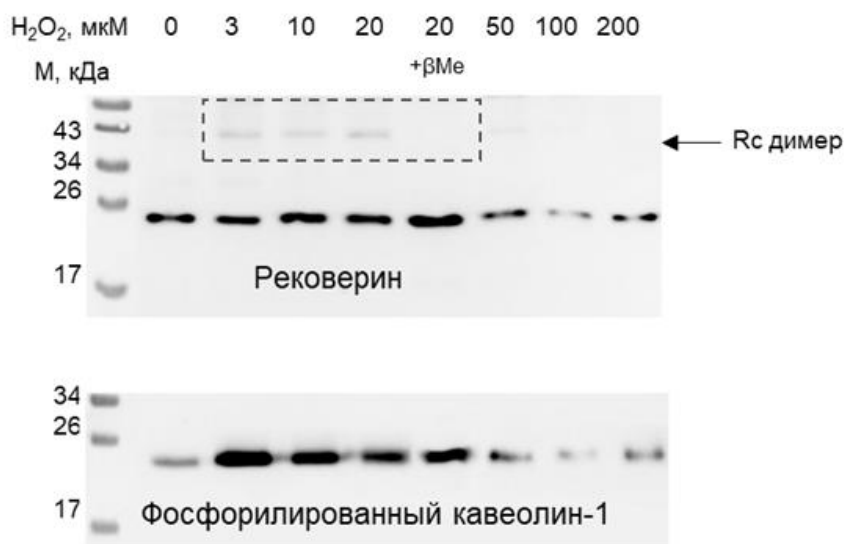


Рисунок 29. Дисульфидная димеризация рековерина в клетках MDCK. Иммуноблоттинг экстрактов клеток, проинкубированных в присутствии различных концентраций пероксида водорода (60 минут) в невосстанавливающих или восстанавливающих (проба $+\beta\text{Me}$) условиях. Визуализация белков произведена с использованием антител против рековерина (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. 30Б). 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. 30А). Важно отметить, что ни Ca_v , ни миметик его фосфорилированной формы Ca_vE не оказывают прямого влияния на процесс димеризации рековерина (Рис. 30В).

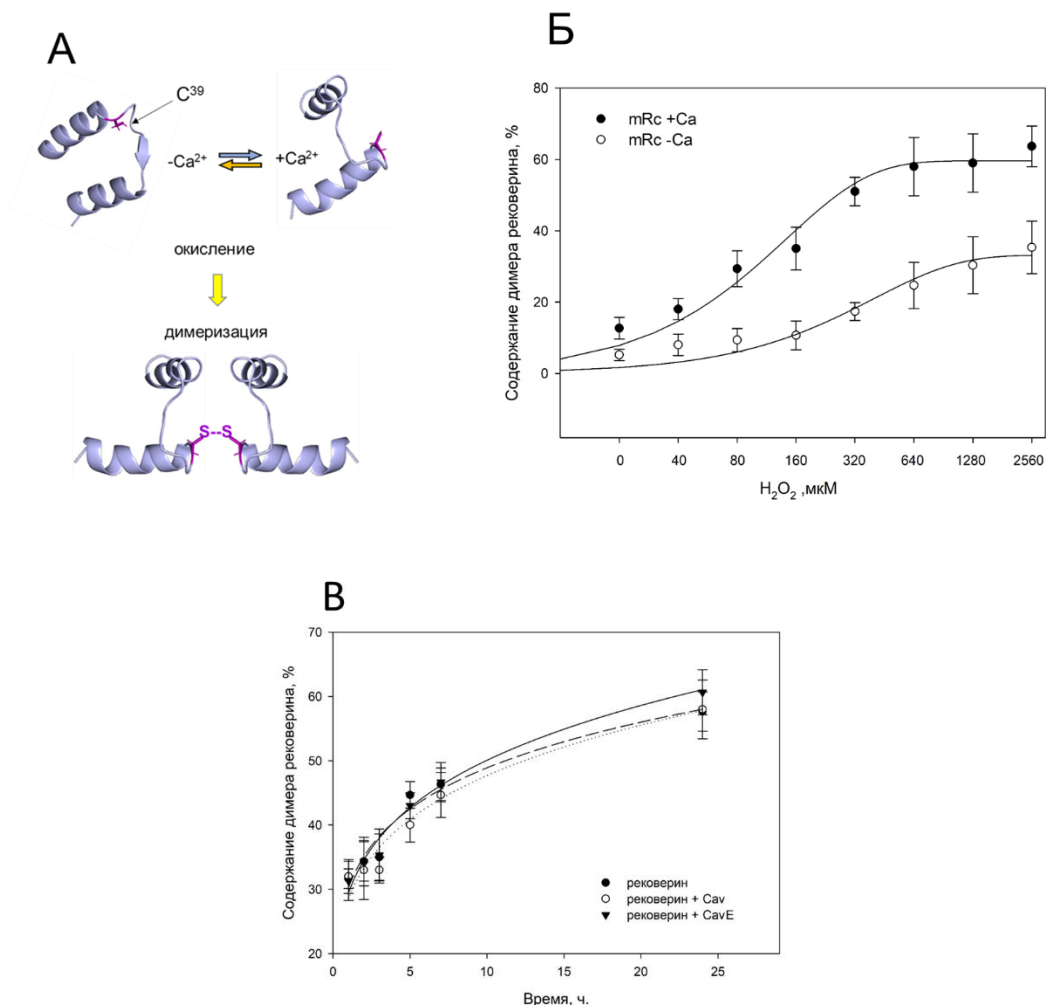


Рисунок 30. (А) Предполагаемый механизм дисульфидной димеризации рековерина. Показан фрагмент трёхмерной структуры E25-P58 N-концевого домена белка для бескальциевой (PDB 1IKU) и кальций-связанной (PDB 1JSA) форм рековерина. (Б) Дисульфидная димеризация рековерина *in vitro*. Зависимость степени дисульфидной димеризации бескальциевой и Ca²⁺-связанной форм рековерина от концентрации пероксида водорода. (В) Степень димеризации Ca²⁺-связанной формы рековерина в присутствии и в отсутствие Cav и CavE.

3.13. 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. 31), а также ППР-биосенсора (Таблица 7) 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 7). Полученные результаты могут указывать на наличие универсального сайта связывания кавеолина-1 среди белков НКС, прототип которого предсказан по результатам наших структурных исследований. Более того, на основании полученных данных можно впервые предположить наличие чувствительности сигнальной активности NCS1, GCAP1 и GCAP2 к условиям окислительного стресса.

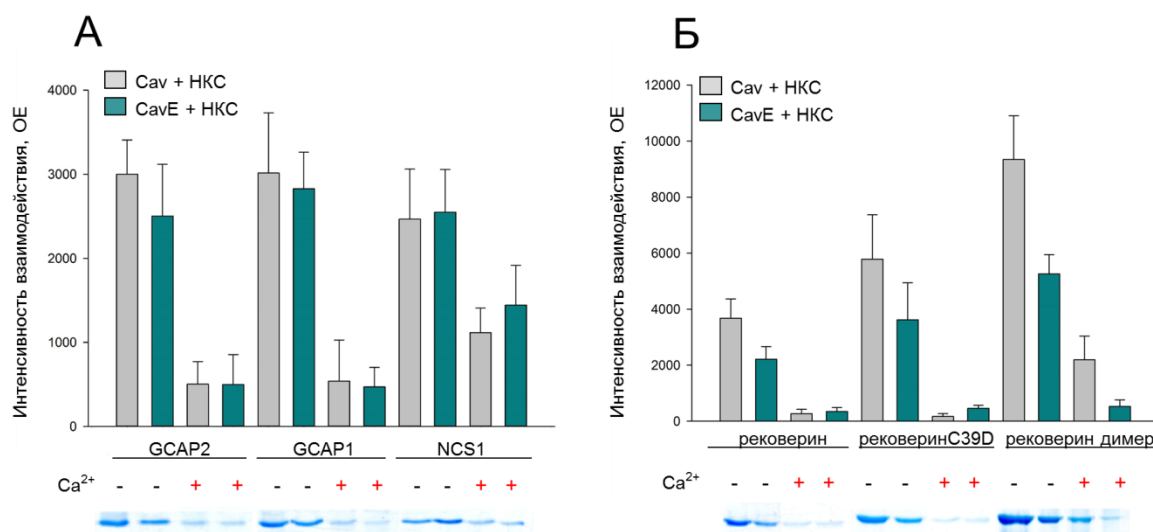


Рисунок 31. Взаимодействие GCAP1, GCAP2 и NCS1 (А), а также различных форм рековерина (Б) с аффинными сорбентами, содержащими иммобилизованный Cav или CavE в присутствии (2 мМ Ca²⁺) или в отсутствие (2 мМ ЭГТА) кальция.

Таблица 7. 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 С39D	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

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.

3.14 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 реCOVERIN (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 реCOVERIN высвобождается, запуская aberrantные сигнальные каскады, вызывающие апоптоз клетки. Альтернативной функцией обнаруженных комплексов может быть утилизация окисленного реCOVERINA, 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.

3.13. Компьютерное моделирование N-концевого фрагмента кавеолина-1

Не смотря на высокий интерес к изучению кавеолина-1, из-за методологических сложностей, трёхмерная структура молекулы белка до сих пор не разрешена. Однако был высказан ряд экспериментально-обоснованных предположений касательно структуры его цитоплазматического и трансмембранного участков (см. раздел 1.5.3.), и всё же этот вопрос до сих пор является предметом споров в научной среде. Используя вычислительные мощности и алгоритмы сервера I-Tasser (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>), широко используемого в научной среде инструмента компьютерного моделирования третичной структуры белка по его аминокислотной последовательности, была смоделирована структура N-концевого фрагмента (M1-R101) кавеолина-1 в нативной форме (рис. 32 А), и точечного мутанта Y14E (рис. 32 Б).

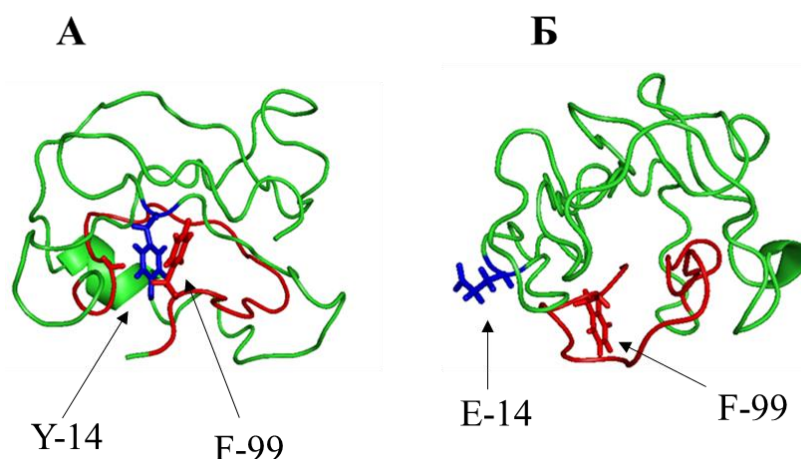


Рисунок 32. Компьютерное моделирование трёхмерной структуры кавеолина-1 в нативной форме (А) и точечного мутанта Y-14-E (Б). Красным цветом отмечены аминокислоты функционального домена F⁸¹-R¹⁰¹, синим цветом либо тирозин (А), либо его замена на глутаминовую кислоту (Б)

При анализе полученных структур было обнаружено, что в нативной форме N-конец фрагмент кавеолина-1 представлен в большей степени неупорядоченной структурой, с одним структурированным участком I⁸⁴-Y¹⁰⁰, представляющим собой β-гарпун, вокруг которой «обёрнут» неупорядоченный

участок, что очень хорошо согласуется с известными литературными данными [112][113][114][115].

Кроме этого, при анализе смоделированной структуры, с помощью программы PyMOL (<http://pymol.org/>) и сервиса MolBridge (<http://nucleix.mbu.iisc.ernet.in/molbridge/index.php>) было обнаружено анион-π-стэкинг взаимодействие между Y14 и F99. Учитывая, что фосфорилирование по Y14 является чрезвычайно важным триггером функциональной активности кавеолина-1, можно предположить, что обнаруженное π-стэкинг взаимодействие скорее всего действительно может существовать в реальной трёхмерной структуре кавеолина-1. На это указывает так же тот факт, что при замене Y14 на E происходит сильная реорганизация всей структуры белка, что выражается в пространственном удалении упорядоченного участка кавеолина-1 (I84-Y100) от остальной части молекулы. По нашим предположениям, обнаруженное π-стэкинг взаимодействие может объяснять эффекты, наблюдаемые при изменении функциональной активности, происходящие в следствии фосфорилирования кавеолина-1 по Y14, а также эксперименты в которых участвуют мутантные формы кавеолина-1 по Y14. Так, в нефосфорилированном состоянии взаимодействие между Y14 и F99 стабилизирует и упорядочивает не содержащий вторичных структур N-концевой участок, тогда как фосфорилирование приводит к дестабилизации взаимодействия, с последующим изменением конформации N-концевого домена. Это может служить объяснением результатам экспериментов иммунопреципитации и ППР спектроскопии, при сравнении взаимодействия НКС с Cav и CavE. Кроме этого, имеющиеся в литературе экспериментальные данные, показывают различное влияние фосфорилирования по Y14 на взаимодействие кавеолина-1 со своими мишенями (см. раздел 1.5.6.).

Выдвинутое предположение так же подтверждается анализом степени упорядоченности молекулярной структуры, проведённом с помощью сервиса PONDR (<http://www.pondr.com>). Полученные результаты так же указывают на то, что аминокислотная замена Y14E существенно уменьшает степень упорядоченности в N-концевом домене (рис. 33). Так, в нативной форме кавеолина-1 обнаруживается два коротких неупорядоченных участка - M1-V6 и

I66-E74 (рис. 33А). Введение точечной мутации Y14E значительно увеличивает степень неорганизованности первого участка (рис. 33Б), увеличивая его с 6 до 27 аминокислот - M1-P27.

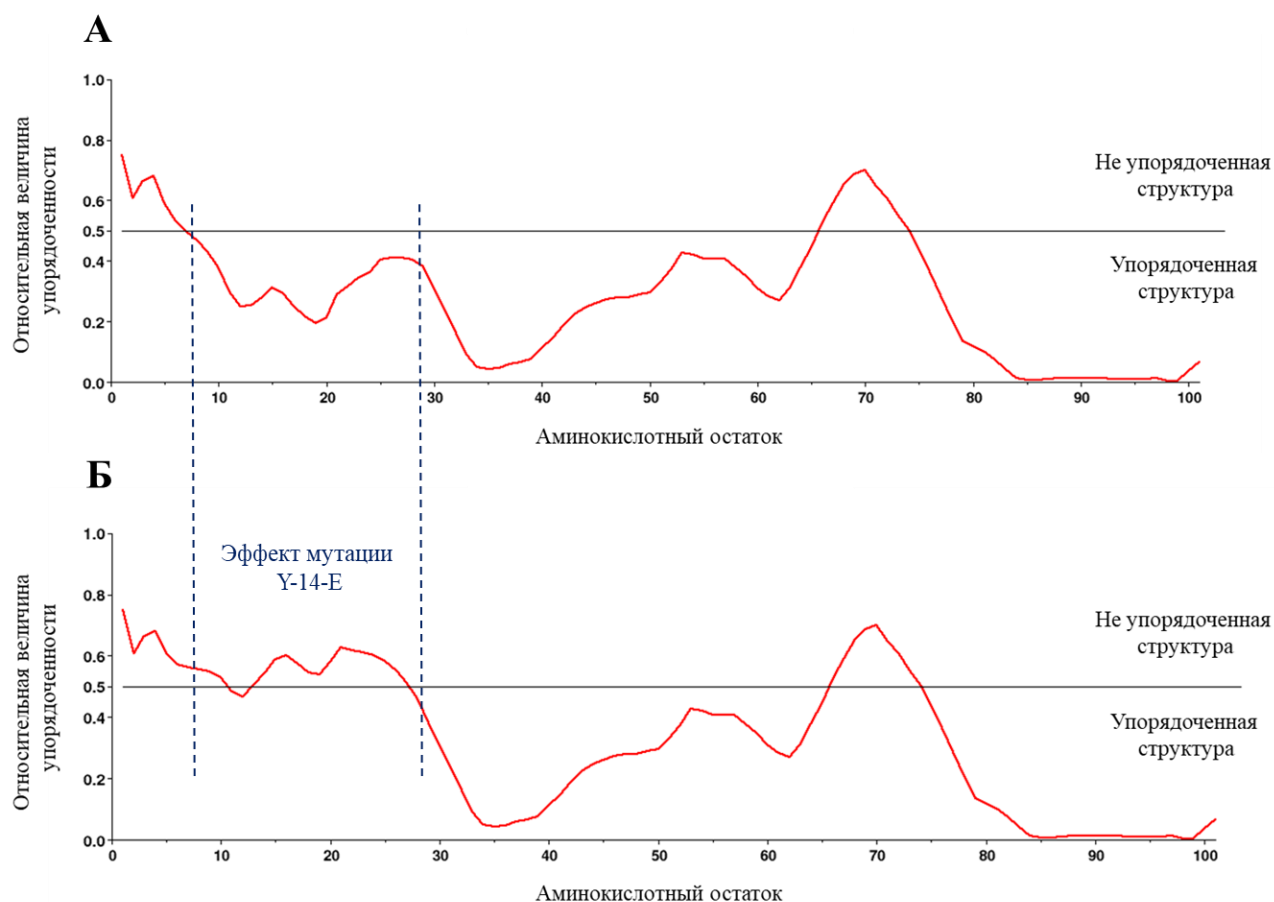


Рисунок 33. Анализ степени неупорядоченности N-концевого фрагмента кавеолина-1 в нативной форме (А), и с аминокислотной заменой Y14E (Б). Расчёт степени упорядоченности производился с помощью алгоритма VLXT сервиса PONDR.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В проведённом исследовании показано, что фоторецепторные Ca^{2+} -связывающие белки реCOVERIN, NCS1, GCAP1 и GCAP2, принадлежащие к семейству НКС, способны высокоаффинно взаимодействовать с кавеолином-1, основным регуляторный белком рафт-структур, а также показано влияние такого взаимодействия на функциональные свойства НКС [170]. Фоторецепторные клетки характеризуются чрезвычайно высоким содержанием, биологических мембран, в том числе содержат относительно высокое количество рафт-структур в которых содержатся почти все компоненты зрительного каскада, что указывает на важную роль этих мембранных структур в передачи сигнала.

Знания о функциональной роли кавеолина-1 в фоторецепторной системе, и взаимодействию с НКС являются важными для понимания функционирования как зрительной клетки, так и нейронов в норме и при патологиях. РеCOVERIN был ранее обнаружен в рафт-структурах, но его локализация в них объяснялась только повышенным содержанием холестерина, в таких мембранах [40]. Здесь впервые было продемонстрировано присутствие NCS1, GCAP1 и GCAP2 в фоторецепторных рафт-структурах. Основываясь на полученных данных, мы можем предположить, что локализация в рафт-структурах является общей чертой белков НКС и определяется их взаимодействием с кавеолином-1 при низких концентрациях кальция.

Показано, что все исследованные нами НКС демонстрируют схожий профиль взаимодействия как с Cav (содержащим функциональный домен $\text{F}^{81}\text{-R}^{101}$), так и с индивидуальным функциональным доменом Cav81-101. Причём это взаимодействие более выражено для бескальциевых форм белков. Известно, что кавеолин-1 распознает свои внутриклеточные мишени благодаря особому сайту взаимодействия, который присутствует во всех четырех исследованных белках НКС. Однако также утверждается, что такой канонический мотив, не является строго необходимым для взаимодействия, и наличие такого мотива в первичной структуре не гарантирует связывание. Что и подтвердилось в проведённых экспериментах, где замена ключевых ароматических остатков такого мотива в

рековерине не повлияла на связывание кавеолина-1 при низкой концентрации кальция. Было определено, что для взаимодействия рековерина с кавеолином-1 решающую роль оказывают структурные изменения, происходящими при связывании ионов кальция рековерином. С помощью введения точечных аминокислотных замен было установлено, что для связывания с кавеолином-1 опосредовано аминокислотными остатками F106, W156 и F172. Учитывая, что C-концевые домены НКС достаточно консервативны, и эти аминокислотные остатки являются общими для рековерина, NCS1, GCAP1 и GCAP2, то таким образом, возможно, был обнаружен общий механизм взаимодействия НКС и кавеолина-1. Кроме этого, на основе пространственных структур рековерина и смоделированных структур кавеолина-1 и кавеолина-1 Y14E было предложен механизм взаимодействия между исследуемыми белками.

Исходя из полученных данных функциональная активность НКС так же изменяется благодаря связыванию с кавеолином-1. Для GCAP2 отмечена дополнительная активация целевого фермента, рекомбинантной ROS-GC1, происходящая в отсутствие ионов кальция, с предварительной инкубацией белка с эквимлярным количеством Cav. По всей видимости, это происходит из-за интенсификации компарментализации GCAPs с гуанилатциклазой которая, по некоторым данным, присутствует исключительно в рафт-структурах.

В результате экспериментов по определению активности родопсинкиназы в реконструированной системе, содержащей отмытые мочевиной НСП и очищенную родопсинкиназу, было показано, что присутствие в системе Cav повышает активность рековерина по отношению к родопсинкиназе, но при этом не влияет на кальций-зависимую регуляторную функцию рековерина. Таким образом, кавеолин-1, не влияя на функциональную активность рековерина оказывает влияние на Ca²⁺-чувствительность последнего, облегчая процесс насыщения рековерина ионами кальция, и последующий за этим процесс ингибирования родопсинкиназы.

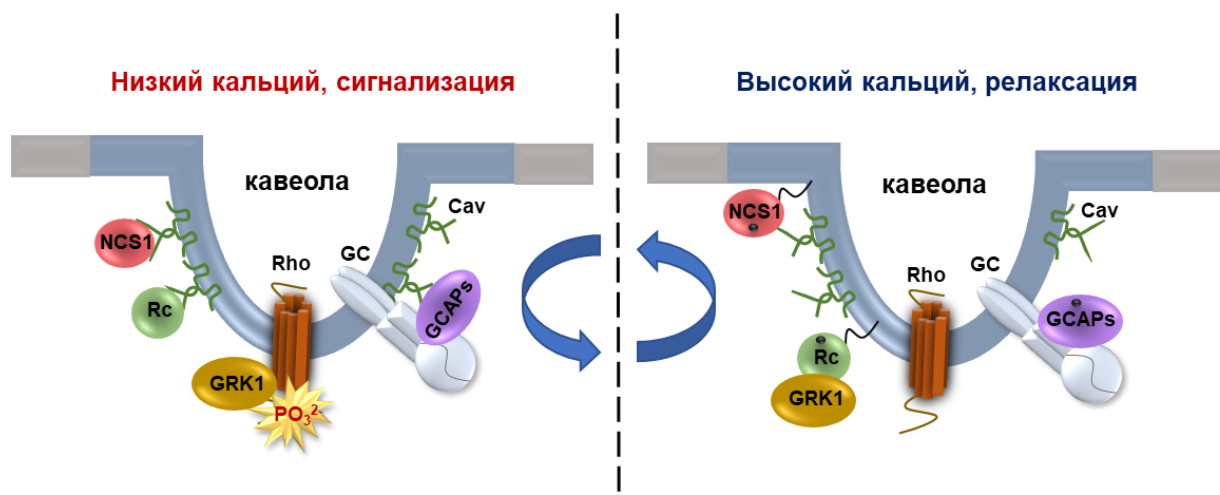
Связывание Cav с NCS1 не влияет на его ингибирующую способность по отношению к РК, как и случае рековерина, а установить влияние на кальций-

чувствительность NCS1 не представляется возможным из-за слишком узкого диапазона кальций-чувствительности. Тем не менее, в отличие от рековерина, NCS1 имеет множество мишеней и за пределами НСП, и его точные партнеры, регулирование которых может находиться под влиянием кавеолина-1, еще предстоит уточнить.

При моделировании условий окислительного стресса было показано сразу два эффекта этого процесса на сигнальный комплекс НКС-кавеолин-1. Во-первых, имитацией фосфорилирования Y-14E изменяет общий профиль взаимодействия с НКС. Так у NCS1 меняется кальций-зависимость взаимодействия, которое становится более интенсивным в присутствии ионов кальция. А константа взаимодействия НКС с кавеолином-1 уменьшая при имитации фосфорилирования последнего. Во-вторых, окисленные формы рековерина значительно более выражено взаимодействуют с Cav, чем рековерин дикого типа. Исходя из полученных данных и моделирования трёхмерных структур белков было высказано предположение касательно механизма взаимодействия кавеолина-1 с рековерином. Полученные данные указывают на то что функциональная роль кавеолина-1 по отношению к белкам НКС в фоторецепторной системе проявляется не только в норме, но и при окислительном стрессе, однако механизмы и последствия такого взаимодействия с белками активаторами гунилатциклазы (GCAPs), нейрональным кальциевым сенсором-1 (NCS1), и окисленными формами рековерина ещё предстоит выяснить (Рис. 34).

Работа является частью госзадания НИР ИБХ № госрегистрации 01201352446. Тема: «Механизмы регуляции функциональной активности отдельных нейрональных кальциевых сенсоров».

Функционирование фоторецепторной системы в норме



Окислительный стресс

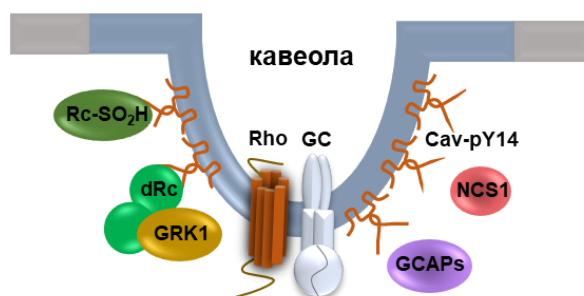


Рисунок 34. Участие caveолина-1 в процессе зрительной трансдукции в норме, и при окислительном стрессе. Cav – caveолин-1, Cav-pY14 – фосфорилированный caveолин-1, Rc – рековерин, dRc – димер рековерина. Rc-SO₂OH – крайне-окисленная форма рековерина, Rho – родопсин, GRK1 – родопсинкиназа, GCAPs – белки активаторы гуанилатциклазы 1 и 2, GC – гуанилатциклаза, NCS1 – нейрональный кальциевый сенсор 1.

5. 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.

6. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зинченко В.П., Долгачёва Л.П. Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Пушино: Аналитическая микроскопия, 2003. 84 р.
2. Schwaller B. The regulation of a cell's Ca²⁺ signaling toolkit: The Ca²⁺ homeostasome // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012.
3. Toutenhoofd S.L., Strehler E.E. The calmodulin multigene family as a unique case of genetic redundancy: Multiple levels of regulation to provide spatial and temporal control of calmodulin pools? // *Cell Calcium.* 2000.
4. McLachlan D.R. et al. Calmodulin and calbindin D28K in Alzheimer disease. // *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 1987.
5. Ali M. et al. Rheumatoid arthritis synovial T cells regulate transcription of several genes associated with antigen-induced anergy // *J. Clin. Invest.* 2001.
6. Gillis T.E., Marshall C.R., Tibbits G.F. Functional and evolutionary relationships of troponin C // *Physiol. Genomics.* 2007.
7. Fritz G. et al. Natural and amyloid self-assembly of S100 proteins: Structural basis of functional diversity // *FEBS Journal.* 2010.
8. Donato R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins // *Microsc. Res. Tech.* 2003.
9. Heizmann C.W., Ackermann G.E., Galichet A. Pathologies involving the S100 proteins and rage // *Subcell. Biochem.* 2007.
10. Schaub M.C., Heizmann C.W. Calcium, troponin, calmodulin, S100 proteins: From myocardial basics to new therapeutic strategies // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008.
11. Orrenius S., Zhivotovsky B., Nicotera P. Regulation of cell death: The calcium-apoptosis link // *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2003.
12. Haynes L.P., McCue H. V., Burgoyne R.D. Evolution and functional diversity of the Calcium Binding Proteins (CaBPs) // *Frontiers in Molecular Neuroscience.* 2012.
13. Arif S.H. A Ca²⁺-binding protein with numerous roles and uses: Parvalbumin in molecular biology and physiology // *BioEssays.* 2009.
14. Beard N.A., Wei L., Dulhunty A.F. Ca²⁺ signaling in striated muscle: The elusive roles of triadin, junctin, and calsequestrin // *European Biophysics Journal.* 2009.
15. Faggioni M., Knollmann B.C. Calsequestrin 2 and arrhythmias // *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology.* 2012.

16. Lamb T.D. Evolution of phototransduction, vertebrate photoreceptors and retina // Prog. Retin. Eye Res. Elsevier Ltd, 2013. Vol. 36. P. 52–119.
17. Nicholls J.G. et al. From neuron to brain, 5th ed. Sunderland, MA, US: Sinauer Associates, 2012. 621 p.
18. Hubel D.H. Eye, brain, and vision (Scientific American Library) // New York. 1988.
19. Chabre M. Trigger and Amplification Mechanisms in Visual Phototransduction // Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 1985.
20. Dratz E.A. et al. THE STRUCTURE OF RHODOPSIN AND ITS DISPOSITION IN THE ROD OUTER SEGMENT DISK MEMBRANE // Photochem. Photobiol. 1979.
21. Hamm H.E., Bownds M.D. Protein Complement of Rod Outer Segments of Frog Retina // Biochemistry. 1986.
22. Schwartz E.A. First events in vision: The generation of responses in vertebrate rods // Journal of Cell Biology. 1981.
23. Stryer L. Cyclic GMP Cascade of Vision // Annu. Rev. Neurosci. 1986.
24. Arshavsky V.Y., Lamb T.D., Pugh E.N. G Proteins and Phototransduction // Annu. Rev. Physiol. 2002.
25. Филиппов П.П., Аршавский В.Ю. Д.А.М. Биохимия зрительной рецепции // Итоги науки и техники. ВИНТИ. 1987. Vol. 26. P. 25–33.
26. Дижур А.М., Аршавский В.Ю., Шестакова И.К. Ф.П.П. Влияние фосфорилирования родопсина на светозависимую активацию фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов из наружных сегментов палочек сетчатки быка // Биологические мембраны. 1984. Vol. 10. P. 1051–1056.
27. Arshavsky V.Y., Gray-Keller M.P., Bownds M.D. cGMP suppresses GTPase activity of a portion of transducin equimolar to phosphodiesterase in frog rod outer segments: Light-induced cGMP decreases as a putative feedback mechanism of the photoresponse // J. Biol. Chem. 1991.
28. Senin I.I., Koch K.W., Akhtar M. P.P.P. Ca²⁺-dependent control of rhodopsin phosphorylation: recoverin and rhodopsin kinase // Adv. Exp. Med. Biol. 2002. Vol. 514. P. 69–99.
29. Haeseleer F. et al. Molecular characterization of a third member of the guanylyl cyclase-activating protein subfamily // J. Biol. Chem. 1999.
30. Frank An W. et al. Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors // Nature. 2000.

31. Tsvetkov P.O. et al. Functional Status of Neuronal Calcium Sensor-1 Is Modulated by Zinc Binding. 2018. Vol. 11, № December. P. 1–21.
32. Gifford J.L., Walsh M.P., Vogel H.J. Structures and metal-ion-binding properties of the Ca²⁺-binding helix-loop-helix EF-hand motifs // *Biochemical Journal*. 2007.
33. Palczewski K. G Protein–Coupled Receptor Rhodopsin // *Annu. Rev. Biochem.* 2006.
34. Dizhoor A.M., Olshevskaya E. V., Peshenko I. V. Mg²⁺/Ca²⁺cation binding cycle of guanylyl cyclase activating proteins (GCAPs): Role in regulation of photoreceptor guanylyl cyclase // *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2010.
35. Cox J.A. et al. Cation Binding and Conformational Changes in VILIP and NCS-1, Two Neuron-specific Calcium-binding Proteins // *J. Biol. Chem.* 1994.
36. Senin I.I. et al. Ca²⁺-myristoyl switch in the neuronal calcium sensor recoverin requires different functions of Ca²⁺-binding sites // *J. Biol. Chem.* 2002.
37. Zernii E.Y. et al. Involvement of the recoverin C-terminal segment in recognition of the target enzyme rhodopsin kinase // *Biochem. J.* 2011.
38. Falke J.J. et al. Molecular Tuning of Ion Binding to Calcium Signaling Proteins // *Q. Rev. Biophys.* 1994. Vol. 27, № 3. P. 219–290.
39. Ladant D. Calcium and membrane binding properties of bovine neurocalcin delta expressed in *Escherichia coli* // *J Biol Chem.* 1995.
40. Senin I.I. et al. Recoverin and rhodopsin kinase activity in detergent-resistant membrane rafts from rod outer segments // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279, № 47. P. 48647–48653.
41. Ames J.B. et al. Amino-terminal myristoylation induces cooperative calcium binding to recoverin // *J. Biol. Chem.* 1995.
42. Chen C., Nakatani K., Koutalos Y. Free magnesium concentration in salamander photoreceptor outer segments // *J. Physiol.* 2003.
43. Wingard J.N. et al. Structural Analysis of Mg²⁺ and Ca²⁺ Binding to CaBP1, a Neuron-specific Regulator of Calcium Channels. // *J. Biol. Chem.* 2005.
44. Zozulya S., Stryer L. Calcium-myristoyl protein switch. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1992.
45. Bastianelli E., Pochet R. Calbindin-D28k, calretinin, and recoverin immunoreactivities in developing chick pineal gland // *J Pineal Res.* 1994.
46. Burley, Stephen K., Kim, Joseph L. Signal transduction versus buffering activity in Ca(2+)-binding proteins. // *Nature.* 1994. Vol. 1, № 9. P. 638–653.

47. Ames J.B. et al. Structural basis for calcium-induced inhibition of rhodopsin kinase by recoverin // J. Biol. Chem. 2006.
48. McFerran B.W., Weiss J.L., Burgoyne R.D. Neuronal Ca²⁺ sensor 1. Characterization of the myristoylated protein, its cellular effects in permeabilized adrenal chromaffin cells, Ca²⁺- independent membrane association, and interaction with binding proteins, suggesting a role in rapid Ca²⁺ signal tr // J. Biol. Chem. 1999.
49. Hwang J.Y., Koch K.W. Calcium- and myristoyl-dependent properties of guanylate cyclase-activating protein-1 and protein-2 // Biochemistry. 2002.
50. Organisciak D.T., Vaughan D.K. Retinal light damage: Mechanisms and protection // Progress in Retinal and Eye Research. 2010.
51. Izzotti A., Bagnis A., Saccà S.C. The role of oxidative stress in glaucoma // Mutation Research - Reviews in Mutation Research. 2006.
52. Wenzel A. et al. Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration // Progress in Retinal and Eye Research. 2005.
53. Fliesler A.J., Anderson R.E. Chemistry and metabolism of lipids in the vertebrate retina // Progress in Lipid Research. 1983.
54. Beatty S. et al. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration // Surv. Ophthalmol. 2000.
55. Bazhin A. V. et al. Recoverin as a cancer-retina antigen // Cancer Immunology, Immunotherapy. 2007.
56. Myers W.K. et al. Double electron-electron resonance probes Ca²⁺-induced conformational changes and dimerization of recoverin // Biochemistry. 2013. Vol. 52, № 34. P. 5800–5808.
57. Lim L.L., Guymer R.H. Age-related macular degeneration // Garner and Klintworth's Pathobiology of Ocular Disease, Third Edition. 2008.
58. Ambati J., Fowler B.J. Mechanisms of age-related macular degeneration // Neuron. 2012.
59. Van Lookeren Campagne M. et al. Mechanisms of age-related macular degeneration and therapeutic opportunities // Journal of Pathology. 2014.
60. Varma R. et al. Biologic Risk Factors Associated with Diabetic Retinopathy. The Los Angeles Latino Eye Study // Ophthalmology. 2007.
61. Самойлов В.О. Медицинская биофизика: Учебник. Санкт-Петербург: СПб СпецЛит, 2004. 496с. р.

62. Северин С.Е. et al. Биологическая химия. Москва: Медицинское информационное агентство, 2008. 364 p.
63. Roux B. et al. Ion selectivity in channels and transporters // *J. Gen. Physiol.* 2011.
64. Hille B. *Ion Channel Excitable Membranes* // Sunderland Massachusetts USA. 2001.
65. Diamond J.M., Katz Y. Interpretation of nonelectrolyte partition coefficients between dimyristoyl lecithin and water // *J. Membr. Biol.* 1974.
66. Kusumi A. et al. Membrane mechanisms for signal transduction: The coupling of the meso-scale raft domains to membrane-skeleton-induced compartments and dynamic protein complexes // *Seminars in Cell and Developmental Biology.* 2012.
67. Nelson D.L., Cox M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry* 5th ed. // Book. 2008.
68. Borchman D., Yappert M.C. Lipids and the ocular lens // *J. Lipid Res.* 2010.
69. Reichow S.L., Gonen T. Lipid-protein interactions probed by electron crystallography // *Current Opinion in Structural Biology.* 2009.
70. Ovchinnikov Y.A. Bioorganic chemistry of rhodopsins // *Pure Appl. Chem.* 1986.
71. Subczynski W.K. et al. High Cholesterol/Low Cholesterol: Effects in Biological Membranes: A Review // *Cell Biochem. Biophys.* 2017. Vol. 75, № 3–4. P. 369–385.
72. Bloom M., Mourtsen O.G. The evolution of membranes // *Handb. Biol. Phys.* 1995.
73. Hannich J.T., Umebayashi K., Riezman H. Distribution and functions of sterols // *Cold Spring Harb. Lab. Press.* 2011.
74. Iaea D.B., Maxfield F.R. Cholesterol trafficking and distribution // *Essays Biochem.* 2015. Vol. 57. P. 43–55.
75. Raguz M. et al. Using spin-label electron paramagnetic resonance (EPR) to discriminate and characterize the cholesterol bilayer domain // *Chem. Phys. Lipids.* 2011.
76. Mainali L., Raguz M., Subczynski W.K. Formation of cholesterol bilayer domains precedes formation of cholesterol crystals in cholesterol/dimyristoylphosphatidylcholine membranes: EPR and DSC studies // *J. Phys. Chem. B.* 2013.
77. Mason R.P., Tulenko T.N., Jacob R.F. Direct evidence for cholesterol crystalline domains in biological membranes: Role in human pathobiology // *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes.* 2003.

78. Jacob R.F., Cenedella R.J., Mason R.P. Direct evidence for immiscible cholesterol domains in human ocular lens fiber cell plasma membranes // *J. Biol. Chem.* 1999.
79. Miao L. et al. From lanosterol to cholesterol: Structural evolution and differential effects on lipid bilayers // *Biophys. J.* 2002.
80. Subczynski W.K. et al. Three-dimensional dynamic structure of the liquid-ordered domain in lipid membranes as examined by pulse-EPR oxygen probing // *Biophys. J.* 2007.
81. Singer S.J., Nicolson G.L. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes // *Science* (80-.). 1972.
82. Kusumi A. et al. Dynamic Organizing Principles of the Plasma Membrane that Regulate Signal Transduction: Commemorating the Fortieth Anniversary of Singer and Nicolson's Fluid-Mosaic Model // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2012.
83. Nicolson G.L. The Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 2014.
84. Lisanti, M. P., Frank, P. G, Jasmin J.-F. Caveolins and caveolae. Roles in Signaling and Disease Mechanisms. New York, NY: Springer US., 2011. 183 (Vol.729) p.
85. Simons K., Ikonen E. Functional rafts in cell membranes // *Nature.* 1997.
86. Brown D.A., London E. Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes // *Journal of Membrane Biology.* 1998.
87. Rajendran L., Simons K. Lipid rafts and membrane dynamics. // *J. Cell Sci.* 2005.
88. Harder T., Engelhardt K.R. Membrane domains in lymphocytes - From lipid rafts to protein scaffolds // *Traffic.* 2004.
89. Hooper N.M. Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains, lipid rafts and caveolae // *Molecular Membrane Biology.* 1999.
90. PALADE G.E. An electron microscope study of the mitochondrial structure // *J. Histochem. Cytochem.* 1953.
91. Filippini A., Sica G., D'Alessio A. The caveolar membrane system in endothelium: From cell signaling to vascular pathology // *Journal of Cellular Biochemistry.* 2018.
92. Parton R.G., Simons K. The multiple faces of caveolae // *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2007.
93. Pilch P.F., Liu L. Fat caves: Caveolae, lipid trafficking and lipid metabolism in adipocytes // *Trends in Endocrinology and Metabolism.* 2011.

94. Simons K., Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2000.
95. Hansen C.G., Nichols B.J. Exploring the caves: Cavins, caveolins and caveolae // *Trends in Cell Biology.* 2010.
96. Parton R.G. Caveolae and caveolins // *Current Opinion in Cell Biology.* 1996.
97. Hayer A. et al. Biogenesis of caveolae: Stepwise assembly of large caveolin and cavin complexes // *Traffic.* 2010.
98. Williams T.M., Lisanti M.P. The caveolin proteins // *Genome Biology.* 2004.
99. Briand N., Dugail I., Le Lay S. Cavin proteins: New players in the caveolae field // *Biochimie.* 2011.
100. Williams T.M. et al. Loss of Caveolin-1 Gene Expression Accelerates the Development of Dysplastic Mammary Lesions in Tumor-Prone Transgenic Mice // *Mol. Biol. Cell.* 2003.
101. Xiwei Zheng, Cong Bi, Marissa Brooks and D.S.H. Caveolae-mediated Delivery of Therapeutic Nanoparticles across Blood-endothelial Barrier // *Anal Chem.* 2015. Vol. 25, № 4. P. 368–379.
102. Jin Y. et al. Caveolin-1: a critical regulator of lung injury. // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2011.
103. Parolini I. et al. Expression of caveolin-1 is required for the transport of caveolin-2 to the plasma membrane. Retention of caveolin-2 at the level of the Golgi complex // *J. Biol. Chem.* 1999.
104. Tang Z. et al. Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle // *J. Biol. Chem.* 1996.
105. Steinberg S.F. β 2-Adrenergic receptor signaling complexes in cardiomyocyte caveolae/lipid rafts // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2004.
106. Dietzen D.J., Hastings W.R., Lublin D.M. Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae // *J. Biol. Chem.* 1995.
107. Schlegel A., Lisanti M.P. A molecular dissection of caveolin-1 membrane attachment and oligomerization. Two separate regions of the caveolin-1 c-terminal domain mediate membrane binding and oligomer/oligomer interactions in vivo // *J. Biol. Chem.* 2000.
108. Wishart D.S., Sykes B.D. The ^{13}C Chemical-Shift Index: A simple method for the identification of protein secondary structure using ^{13}C chemical-shift data // *J. Biomol. NMR.* 1994.

109. Plucinsky S.M., Glover K.J. Secondary Structure Analysis of a Functional Construct of Caveolin-1 Reveals a Long C-Terminal Helix // *Biophys. J.* Biophysical Society, 2015. Vol. 109, № 8. P. 1686–1688.
110. Kim M.K., Kang Y.K. Positional preference of proline in alpha-helices. // *Protein Sci.* 1999.
111. Uittenbogaard A., Smart E.J. Palmitoylation of caveolin-1 is required for cholesterol binding, chaperone complex formation, and rapid transport of cholesterol to caveolae // *J. Biol. Chem.* 2000.
112. Fernandez I. et al. Mechanism of caveolin filament assembly // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002. Vol. 99, № 17. P. 11193–11198.
113. Epanand R.M., Sayer B.G., Epanand R.F. Caveolin scaffolding region and cholesterol-rich domains in membranes // *J. Mol. Biol.* 2005.
114. Hoop C.L. et al. Structural characterization of the caveolin scaffolding domain in association with cholesterol-rich membranes // *Biochemistry.* 2012.
115. Spisni E. et al. Structural insights into the function of human caveolin 1 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005.
116. Root K.T., Plucinsky S.M., Glover K.J. Recent Progress in the Topology, Structure, and Oligomerization of Caveolin: A Building Block of Caveolae // *Curr. Top. Membr.* 2015.
117. Glenney J.R. Tyrosine phosphorylation of a 22-kDa protein is correlated with transformation by Rous sarcoma virus // *J. Biol. Chem.* 1989.
118. Insel P.A. et al. Caveolae and lipid rafts: G protein-coupled receptor signaling microdomains in cardiac myocytes // *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2005.
119. Wüstner D. Intracellular cholesterol transport // *Cellular Lipid Metabolism.* 2009.
120. NAVARRO A. A role for caveolae in cell migration // *FASEB J.* 2004.
121. Ju H. et al. Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity // *J. Biol. Chem.* 1997.
122. Huang S. et al. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-rich plasma membrane patches organize active zones of endocytosis and ruffling in cultured adipocytes. // *Mol. Cell. Biol.* 2004.
123. Lajoie P., Nabi I.R. Lipid rafts, caveolae, and their endocytosis // *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 2010.
124. Quest A.F.G., Gutierrez-Pajares J.L., Torres V.A. Caveolin-1: An ambiguous partner in cell signalling and cancer // *Journal of Cellular and Molecular*

- Medicine. 2008.
125. Lajoie P. et al. Plasma membrane domain organization regulates EGFR signaling in tumor cells // *J. Cell Biol.* 2007.
 126. Fernández M.A. et al. Caveolin-1 is essential for liver regeneration // *Science* (80-). 2006.
 127. Lin H.H. et al. Mechanical phenotype of cancer cells: Cell softening and loss of stiffness sensing // *Oncotarget.* 2015.
 128. Sohn J., Brick R.M., Tuan R.S. From embryonic development to human diseases: The functional role of caveolae/caveolin // *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews.* 2016.
 129. Frank P.G. et al. Caveolin-1 and regulation of cellular cholesterol homeostasis // *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 2006.
 130. Rudick M., Anderson R.G.W. Multiple functions of caveolin-1 // *Journal of Biological Chemistry.* 2002.
 131. Couet J. et al. Identification of Peptide and Protein Ligands for the Caveolin-scaffolding Domain // *Biochemistry.* 1997. Vol. 272, № 10. P. 6525–6533.
 132. Byrne D.P., Dart C., Rigden D.J. Evaluating Caveolin Interactions: Do Proteins Interact with the Caveolin Scaffolding Domain through a Widespread Aromatic Residue-Rich Motif? // *PLoS One.* 2012.
 133. Collins B.M. et al. Structure-Based Reassessment of the Caveolin Signaling Model: Do Caveolae Regulate Signaling through Caveolin-Protein Interactions? // *Dev. Cell.* 2012. Vol. 23, № 1. P. 11–20.
 134. Yue L., Mazzone T. Endogenous adipocyte apolipoprotein E is colocalized with caveolin at the adipocyte plasma membrane // *J. Lipid Res.* 2011.
 135. Lee H. et al. Constitutive and Growth Factor-Regulated Phosphorylation of Caveolin-1 Occurs at the Same Site (Tyr-14) *in Vivo*: Identification of a c-Src/Cav-1/Grb7 Signaling Cassette // *Mol. Endocrinol.* 2000.
 136. Radcliff C., Rizzo V. Integrin mechanotransduction stimulates caveolin-1 phosphorylation and recruitment of Csk to mediate actin reorganization. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2005.
 137. Zimnicka A.M. et al. Src-dependent phosphorylation of caveolin-1 Tyr-14 promotes swelling and release of caveolae // *Mol. Biol. Cell.* 2016.
 138. Couet J., Sargiacomo M., Lisanti M.P. Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins. Caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/threonine kinase activities // *J. Biol. Chem.* 1997.

139. Yamamoto M. et al. Caveolin is an activator of insulin receptor signaling // *J. Biol. Chem.* 1998.
140. Rathor N. et al. Src-mediated caveolin-1 phosphorylation regulates intestinal epithelial restitution by altering Ca²⁺ influx after wounding // *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 2014.
141. F.G. Quest A. et al. The Caveolin-1 Connection to Cell Death and Survival // *Curr. Mol. Med.* 2013.
142. Liu J. et al. Caveolin-1 expression sensitizes fibroblastic and epithelial cells to apoptotic stimulation // *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 2001.
143. Wehinger S. et al. Phosphorylation of caveolin-1 on tyrosine-14 induced by ROS enhances palmitate-induced death of beta-pancreatic cells // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 2015.
144. Wang S. et al. Caveolin-1: An Oxidative Stress-Related Target for Cancer Prevention // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2017.
145. Bernatchez P. et al. A noninhibitory mutant of the caveolin-1 scaffolding domain enhances eNOS-derived NO synthesis and vasodilation in mice // *J. Clin. Invest.* 2011.
146. Mougeolle A. et al. Oxidative stress induces Caveolin 1 degradation and impairs Caveolae functions in skeletal muscle cells // *PLoS One.* 2015.
147. Shiroto T. et al. Caveolin-1 is a critical determinant of autophagy, metabolic switching, and oxidative stress in vascular endothelium // *PLoS One.* 2014.
148. Zargarov A.A. et al. Preparation of myristoylated and nonmyristoylated recombinant recoverins in escherichia-coli and comparison of their functional activities // *Bioorganicheskaya Khimiya.* 1996.
149. Kavran J.M., Leahy D.J. Coupling antibody to cyanogen bromide-activated sepharose // *Methods Enzymol.* 2014.
150. Hanks S.K., Quinn A.M., Hunter T. The protein kinase family: Conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains // *Science (80-.).* 1988.
151. Lisanti M.P. et al. Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: Implications for human disease // *J. Cell Biol.* 1994.
152. Kawamura S., Cox J.A., Nef P. Inhibition of rhodopsin phosphorylation by non-myristoylated recombinant recoverin // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994.
153. Kawamura S. Rhodopsin phosphorylation as a mechanism of cyclic GMP phosphodiesterase regulation by S-modulin // *Nature.* 1993.

154. Sanada K. et al. Role of heterogeneous N-terminal acylation of recoverin in rhodopsin phosphorylation // *J. Biol. Chem.* 1995.
155. Helten A., Säftel W., Koch K.-W. Expression level and activity profile of membrane bound guanylate cyclase type 2 in rod outer segments // *J. Neurochem.* 2007.
156. Kazakov A.S. et al. Interleukin-11 binds specific EF-hand proteins via their conserved structural motifs // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2017.
157. Knyazeva E.L. et al. Who Is Mr . HAMLET? Interaction of Human R-Lactalbumin with Monomeric // *Biochemistry.* 2008. Vol. 47. P. 13127–13137.
158. Pearing J.N. et al. Protein sorting, targeting and trafficking in photoreceptor cells // *Prog. Retin. Eye Res.* Elsevier Ltd, 2013. Vol. 36. P. 24–51.
159. Schrem A. et al. Identification of a domain in guanylyl cyclase-activating protein 1 that interacts with a complex of guanylyl cyclase and tubulin in photoreceptors // *J. Biol. Chem.* 1999.
160. Vladimirov V.I. et al. A Novel Approach to Bacterial Expression and Purification of Myristoylated Forms of Neuronal Calcium Sensor Proteins // *Biomolecules.* 2020. Vol. 10, № 7. P. 1–21.
161. Ortiz R. et al. Extracellular matrix-specific Caveolin-1 phosphorylation on tyrosine 14 is linked to augmented melanoma metastasis but not tumorigenesis // *Oncotarget.* 2016.
162. Nemashkalova E.L. et al. Modulation of linoleic acid-binding properties of human serum albumin by divalent metal cations // *BioMetals.* 2017.
163. Zernii E.Y. et al. Regulatory function of the C-terminal segment of guanylate cyclase-activating protein 2 // *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics.* 2015.
164. Olshevskaya E. V., Ermilov A.N., Dizhoor A.M. Dimerization of guanylyl cyclase-activating protein and a mechanism of photoreceptor guanylyl cyclase activation // *J. Biol. Chem.* 1999.
165. Peshenko I. V. et al. Calcium-myristoyl tug is a new mechanism for intramolecular tuning of calcium sensitivity and target enzyme interaction for guanylyl cyclase-activating protein 1: Dynamic connection between n-fatty acyl group and EF-hand controls calcium sensitivity // *J. Biol. Chem.* 2012.
166. Permyakov S.E. et al. Recoverin as a redox-sensitive protein // *J. Proteome Res.* 2007.
167. Masuda T., Shimazawa M., Hara H. Retinal Diseases Associated with Oxidative Stress and the Effects of a Free Radical Scavenger (Edaravone) // *Oxidative*

Medicine and Cellular Longevity. 2017.

168. Zernii E.Y. et al. Light-induced disulfide dimerization of recoverin under ex vivo and in vivo conditions // *Free Radic. Biol. Med.* 2015.
169. Berta Á.I. et al. Localization of caveolin-1 and c-src in mature and differentiating photoreceptors: Raft proteins co-distribute with rhodopsin during development // *J. Mol. Histol.* 2011.
170. Vladimirov V.I. et al. Photoreceptor calcium sensor proteins in detergent-resistant membrane rafts are regulated via binding to caveolin-1 // *Cell Calcium*. Elsevier Ltd, 2018. Vol. 73. P. 55–69.