МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ имени М.В. ЛОМОНОСОВА

Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского

На правах рукописи

Бакшеева Виктория Егоровна

НЕЙРОНАЛЬНЫЙ КАЛЬЦИЕВЫЙ СЕНСОР-1 В НОРМАЛЬНОЙ И ПАТОЛОГИЧЕСКОЙ ФОТОРЕЦЕПТОРНЫХ СИСТЕМАХ

03.01.04 – Биохимия

ДИССЕРТАЦИЯ на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научные руководители:

к.х.н. Е.Ю. Зерний д.б.н. А.А. Замятнин

Москва 2021

оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	7
I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
1.1. ФРЕКВЕНИН И NCS-1	
1.2. СТРУКТУРА ГЕНА И ИЗОФОРМНЫЙ СОСТАВ NCS-1	15
1.2.1. Регуляция экспрессии NCS-1 и фреквенина	
1.2.2. Дупликация гена	
1.2.3. Альтернативный сплайсинг	
1.2.4. РНК-редактирование	
1.3. ЛОКАЛИЗАЦИЯ NCS-1	
1.3.1. Локализация в нервной ткани	
1.3.2. Локализация вне нервной системы	
1.3.3. Экспрессия в клеточных линиях	20
1.3.4. Внутриклеточная локализация	20
1.4. ФУНКЦИЯ NCS-1 В НОРМЕ	21
1.4.1. Синаптическая пластичность	
1.4.2. Развитие нервной ткани	24
1.4.3. Механизмы обучения и памяти	25
1.4.4. Регуляция рецепторов, сопряженных с G-белками	27
1.4.5. Секреция	
1.4.6. Регуляция ионных каналов	
1.4.7. NCS-1 как аналог кальмодулина	
1.4.8. Выживание в условиях стресса	
1.4.9. Функция в сердечной мышце	40
1.4.10. Функция в сетчатке	41
1.5. ФУНКЦИЯ NCS-1 ПРИ ПАТОЛОГИЯХ	46
1.5.1. Психические расстройства	47
1.5.2. Наркотическая зависимость	49
1.5.3. Умственная отсталость, связанная с Х-хромосомой	49
1.5.4. Расстройства аутистического спектра	
1.5.5. Болезнь Паркинсона	
1.5.6. Воспалительные заболевания	51
1.5.7. Онкологические заболевания	
1.5.8. Побочные эффекты противораковой терапии	53
1.5.9. Другие заболевания	54
1.6. МОЛЕКУЛЯРНАЯ СТРУКТУРА И СВОЙСТВА NCS-1	55
1.6.1. Общие представления о структуре белков НКС	
1.6.2. Структурные особенности NCS-1	
1.6.3. Миристоилирование	

	63
1.6.5. Взаимодействие с белками-мишенями	65
1.6.6. Связывание с мембранами	69
1.6.7. Редокс-чувствительность	72
II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	73
2.1. МАТЕРИАЛЫ И РЕАКТИВЫ	73
2.2. ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ	74
2.2.1. Получение генетических конструкций для экспрессии белков	74
2.2.2. Получение миристоилированного NCS-1 дикого типа	76
2.2.3. Получение других белков	79
2.3. ХАРАКТЕРИСТИКА СТРУКТУРНЫХ И МЕТАЛЛСВЯЗЫВАЮЩИХ СВОЙСТВ NCS-1	81
2.3.1. Связывание NCS-1 с ионами кальция, магния и цинка	81
2.3.2. Структурная характеристика металлсвязанных форм NCS-1	82
2.4. ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФОТОРЕЦЕПТОРНОГО NCS-1	84
2.4.1. Связывание NCS-1 с очищенными клеточными мембранами	84
2.4.2. Связывание NCS-1 с фосфолипидами	85
2.4.3. Поиск и идентификация мишеней NCS-1 среди белков экстракта сетчатки	87
2.4.4. Получение и характеристика комплексов NCS-1 с мишенями	88
2.4.5. Регуляция родопсинкиназы в реконструированной системе	89
2.5. ХАРАКТЕРИСТИКА РЕДОКС-СТАТУСА NCS-1 В МОДЕЛЯХ СВЕТОИНДУЦИРОВАННО ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА СЕТЧАТКИ	ого 90
2.5.1. Создание модели светоиндуцированной ретинопатии	90
2.5.2. Определение редокс-статуса NCS-1 в сетчатке при окислительном стрессе	91
2.5.2. Определение редокс-статуса NCS-1 в сетчатке при окислительном стрессе	91 92
 2.5.2. Определение редокс-статуса NCS-1 в сетчатке при окислительном стрессе 2.5.3. Исследование дисульфидной димеризации NCS-1 <i>in vitro</i> 2.5.4. Исследование редокс-чувствительности NCS-1 в клеточной модели 	91 92 93
 2.5.2. Определение редокс-статуса NCS-1 в сетчатке при окислительном стрессе 2.5.3. Исследование дисульфидной димеризации NCS-1 <i>in vitro</i> 2.5.4. Исследование редокс-чувствительности NCS-1 в клеточной модели 2.5.5. Определение внутриклеточной локализации NCS-1 при окислительном стрессе 	91 92 93 94
 2.5.2. Определение редокс-статуса NCS-1 в сетчатке при окислительном стрессе	91 92 93 94 94
 2.5.2. Определение редокс-статуса NCS-1 в сетчатке при окислительном стрессе	91 92 93 94 94 95
 2.5.2. Определение редокс-статуса NCS-1 в сегчатке при окислительном стрессе	91 92 93 94 94 95 95
 2.5.2. Определение редокс-статуса NCS-1 в сегчатке при окислительном стрессе	91 92 93 94 94 95 95 95
 2.5.2. Определение редокс-статуса NCS-1 в сегчатке при окислительном стрессе	91 92 93 94 94 95 95 95 96 96
 2.5.2. Определение редокс-статуса NCS-1 в сетчатке при окислительном стрессе	91 92 93 94 94 95 95 95 96 97
 2.5.2. Определение редокс-статуса NCS-1 в сегчатке при окислительном стрессе. 2.5.3. Исследование дисульфидной димеризации NCS-1 <i>in vitro</i>. 2.5.4. Исследование редокс-чувствительности NCS-1 в клеточной модели	91 92 93 94 94 95 95 96 96 97 97
 2.5.2. Определение редокс-статуса NCS-1 в сегчатке при окислительном стрессе	91 92 93 94 95 95 95 96 96 97 97 98
 2.5.2. Определение редокс-статуса NCS-1 в сегчатке при окислительном стрессе	91 92 93 94 95 95 95 96 96 97 97 97 98 99
 2.5.2. Определение редокс-статуса NCS-1 в сегчатке при окислительном стрессе	91 92 93 94 94 95 95 95 96 97 97 97 98 99 99
 2.5.2. Определение редокс-статуса NCS-1 в сегчатке при окислительном стрессе	91 92 93 94 95 95 95 96 97 97 97 98 99 99 99
 2.5.2. Определение редокс-статуса NCS-1 в сегчатке при окислительном стрессе	91 92 93 94 94 95 95 95 96 97 97 97 97 97 99 99 99 99 99 99
 2.5.2. Определение редокс-статуса NCS-1 в сегчатке при окислительном стрессе	91 92 93 94 94 95 95 96 96 97 97 97 97 97 97 99 99 99 99 99 99 99 99
 2.5.2. Определение редокс-статуса NCS-1 в сегчатке при окислительном стрессе	91 92 93 94 94 95 95 95 96 97 97 97 97 97 97 99 99 99 99 99 99 99 91

3.1.2. Получение миристоилированной формы рекомбинантного NCS-1 и поликлональных моноспецифических антител
3.1.3. Определение локализации NCS-1 в сетчатке млекопитающих110
3.1.4. Характеристика связывания NCS-1 с фоторецепторными мембранами и их компонентами 112
3.1.5. Поиск потенциальных регуляторных мишеней NCS-1 в фоторецепторной клетке116
2.2. СПЕЦИФИЧНОСТЬ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ NCS-1 В ФОТОРЕЦЕПТОРНОЙ КЛЕТКЕ121
3.2.1. Исследование роли N-концевых структурных элементов NCS-1 в обеспечении специфичности функциональных свойств белка
3.2.2. Исследование роли С-концевого сегмента NCS-1 в обеспечении специфичности функциональных свойств белка
3.2.3. Исследование роли металлсвязывающих центров NCS-1 в обеспечении специфичности функциональных свойств белка
3.2.4. NCS-1 и рековерин как Zn ²⁺ -связывающие белки
3.3. АБЕРРАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ФОТОРЕЦЕПТОРНОГО NCS-1 В ПАТОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ
3.3.1. Определение редокс-статуса фоторецепторного NCS-1 в условиях светоиндуцированного окислительного стресса <i>in vivo</i>
3.3.2. Характеристика редокс-чувствительности NCS-1 in vitro
3.3.3. Характеристика редокс-чувствительности NCS-1 в условиях клеточной модели164
3.4. ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ NCS-1 В НОРМАЛЬНОЙ И ПАТОЛОГИЧЕСКОЙ ФОТОРЕЦЕПТОРНЫХ СИСТЕМАХ170
ВЫВОДЫ
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- а.о. аминокислотные остатки
- АТФ аденозинтрифосфат
- бис-АНС 4,4'-дианилино-1,1'-бинафтил-5,5'-дисульфоновая кислота
- БСА бычий сывороточный альбумин
- ВМД возрастная макулодистрофия
- ВЭЖХ высокоэффективная жидкостная хроматография
- ГАФД глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа
- ДСН додецилсульфат натрия
- ДСФ дифференциальная сканирующая флуориметрия
- ДТТ дитиотреитол
- ИКТ изотермическая калориметрия титрования
- ИПТГ изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид
- КД круговой дихроизм
- КМ/ММ квантовая механика/молекулярная механика
- МАЛДИ матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация
- НКС нейрональные кальциевые сенсоры
- НСП наружные сегменты палочек
- п.о. пары нуклеотидных оснований
- ППР поверхностный плазмонный резонанс
- ПЦР полимеразная цепня реакция
- ФИ фосфатидилинозитол
- ФКС флуоресцентная корреляционная спектроскопия
- $\Phi MC\Phi \varphi$ енилметилсульфонилфторид
- $\Phi C \phi oc \phi a \tau u д u л c e p u н$
- $\Phi X \phi oc \phi$ атидилхолин
- $\Phi \Theta \phi$ осфатидилэтаноламин
- ЦНС центральная нервная система
- ЭГТА этиленгликоль-бис(β-аминоэтиловый эфир)-N,N,N',N'-тетрауксусная кислота
- ЭДТА N,N,N',N'-этилендиаминтетрауксусная кислота
- ЭПР эндоплазматический ретикулум
- ЯМР ядерный магнитный резонанс
- BDNF нейтротрофический фактор мозга (англ. brain-derived neurotrophic factor)
- D2R рецептор дофамина D2
- DAPI 4',6-диамидино-2-фенилиндол (англ. 4',6-diamidino-2-phenylindole)
- EF(1-4) EF-hand мотив 1-4
- GCAP белки-активаторы гуанилатциклаз (англ. guanylate cyclase-activating proteins)
- GDNF глиальный нейротрофический фактор (англ. glial cell line-derived neurotrophic factor)

GPCR – рецептор, сопряженный с G-белком (англ. G-protein coupled receptor)

GRK – протеинкиназа рецепторов, сопряженных с G-белками (англ. G-protein-coupled receptor kinase) GRK1¹⁻²⁵ – фрагмент родопсинкиназы M1-S25

GRK1^{N-C} – химерный белок, представляющий собой N- (1-181) и С-концевой (512-557) домены родопсинкиназы, соединенные линкерной последовательностью GSGS

GST – глутатион-S-трансфераза (англ. glutathione-S-transferase)

GST-NCS-1 – химерный белок

HEPES – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота (англ. 4-(2-hydroxyethyl)-1piperazineethanesulfonic acid)

IL1RAPL1 – гомолог-1 корецептора интерлейкина-1 (англ. interleukin-1 receptor accessory protein-like 1)

InsP₃R – рецепторы инозитолтрифосфата (англ. Inositol triphospate receptor)

IP₃ – инозитолтрифосфат (англ. inositol triphospate)

KchIP – белки, взаимодействующие с К+-каналами (англ. К+-channel interacting proteins)

LC/ESI-MS – жидкостная хроматография/масс-спектрометрия с электроспрейной ионизацией (англ. liquid chromatography/mass-spectrometry electrospray ionization)

LTD – долговременная потенциация (англ. long-term potentiation)

NCS-1 – нейрональный кальциевый сенсор-1 (англ. Neuronal calcium sensor-1)

NMT1p – N-миристоилтрансфераза-1 белков (англ. myristoyl-CoA:protein N-myristoyl transferase)

PBS – фосфатно-солевой буфер (англ. phosphate buffer saline)

PDB - Protein Data Bank

PI(4,5)P₂ – фосфатидилинозитол-4,5-бифосфат (англ. phosphatidyl inositol-4,5-bisphosphate)

PI3P – фосфатидилинозитол-3-фосфат (англ. phosphatidyl inositol-3-phosphate)

PI4P – фосфатидилинозитол-4-фосфат (англ. phosphatidyl inositol-4-phosphate)

PI5P – фосфатидилинозитол-5-фосфат (англ. phosphatidyl inositol-5-phosphate)

РІ4К β – фосфатидилинозитол-4-киназа β (англ. phosphatidyl inositol-4-kinase β)

Pik1 – дрожжевая фосфатидилинозитол-4-киназа-1 (англ. phosphatidyl inositol-4-kinase-1)

PLC – фосфолипаза C (англ. phospholipase C)

RACE – метод быстрой амплификации концов кДНК (англ. rapid amplification of cDNA ends)

RU – единицы резонанса (англ. resonance units)

TBST – Tris-солевой буфер с Tween-20 (англ. Tris buffer saline with Tween-20)

TCEP – трис(2-карбоксиэтил)фосфин (англ. tris(2-carboxyethyl)phosphine)

Tris – трис(гидроксиметил)аминометан (англ. tris(hydroxymethyl)aminomethan)

TUNEL – мечение разрывов ДНК с помощью концевой дезоксинуклеотидилтрансферазы (англ. terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling)

VILIР – визинин-подобные белки (англ. visinin-like proteins)

введение

1. Актуальность и степень разработанности темы

Нейрональные кальциевые сенсоры (НКС) – семейство сигнальных белков, принимающих участие в регуляции различных аспектов жизнедеятельности и функционирования нейронов. НКС характеризуются сходством первичной структуры и пространственной организации, включая наличие четырех Ca²⁺-связывающих мотивов типа EF-hand (первый всегда нефункционален) и остатка миристиновой кислоты на N-конце. Для многих НКС характерен механизм Ca²⁺-миристоильного переключателя – обратимого экспонирования миристоильной группы в ответ на связывание Ca²⁺, за счет которого обеспечивается связывание этих белков с клеточными мембранами и их компартментализация с мишенями. Эволюционным родоначальником семейства считается нейрональный кальциевый сенсор-1 (neuronal calcium sensor-1, NCS-1). NCS-1 связывает более 20-ти различных мишеней, тем самым принимая участие в регуляции нейротрансмиссии, рецепции, роста и выживаемости нейронов, а также синаптической пластичности. Нарушения экспрессии и функции NCS-1 ассоциированы с развитием целого ряда психоневрологических заболеваний. Значительная доля экспрессии NCS-1 приходится на сетчатку глаза, однако его функция в этой ткани долгое время оставалась неисследованной. Между тем, каскад зрительной трансдукции в наружных сегментах фоторецепторных нейронов сетчатки представляет собой яркий пример системы, управляемой сигналами Ca²⁺. Регуляция каскада осуществляется несколькими НКС, один из которых, рековерин, отвечает за десенситизацию зрительного рецептора родопсина, Ca²⁺-зависимым образом ингибируя активность родопсинкиназы (GRK1). С учетом того, что NCS-1 является доказанным регулятором рецепторов семейства GPCR в других нейронах, можно предположить наличие у него специфической функции в зрительной системе, исследование которой имеет важное фундаментальное значение.

Необходимо добавить, что из-за светочувствительности и высокой метаболической активности фоторецепторный нейроны являются чрезвычайно уязвимыми к окислительному стрессу, который лежит в основе патогенеза распространенными офтальмологическими заболеваний, таких как возрастная макулодистрофия. В условиях окислительного стресса в клетках высвобождается еще один физиологический катион – Zn^{2+} – вследствие его массовой диссоциации из окисленных буферных белков. Поскольку по нашим предварительным данным NCS-1 является одновременно редокс-чувствительным и Zn^{2+} -связывающим белком, важной и актуальной задачей является исследование его роли в патологических процессах, связанных с окислительным повреждением фоторецепторов сетчатки.

2. Целью настоящей работы являлось определение функции NCS-1 в фоторецепторной клетке в норме и в условиях светоиндуцированного окислительного стресса.

Для достижения поставленной цели в работе решались следующие Задачи:

- 1. Получение рекомбинантного NCS-1 и антител к нему, определение изоформного состава и локализации этого белка в сетчатке.
- 2. Выявление механизма мембранной ассоциации и сигнальных мишеней NCS-1 в фоторецепторной клетке.
- 3. Характеристика структурных и металлсвязывающих свойств NCS-1, определяющих его функциональную специфичность в фоторецепторной клетке.
- 4. Выявление окисленных форм фоторецепторного NCS-1 и определение их структурных и функциональных свойств.
- 5. Определение роли NCS-1 в механизме окислительного повреждения клеток.

3. Объект и предмет исследования

Объектом исследования является NCS-1 – регуляторный Ca²⁺-связывающий белок, широко представленный в нервной системе. Роль NCS-1 в зрительной системе остается неизученной. Предметом исследования является изоформный состав, локализация и мишени NCS-1 в фоторецепторной клетке, способность этого белка взаимодействовать с фоторецепторными мембранами, структурные особенности, обеспечивающие специфичность функционирования фоторецепторного NCS-1, а также его редокс-чувствительность и сигнальная активность в условиях окислительного стресса.

4. Научная новизна

В работе впервые проведено исследование функции NCS-1 в фоторецепторной системе. Определена локализация NCS-1 в сетчатке, показана его способность связываться с фоторецепторными мембранами. Впервые выявлено повышенное сродство NCS-1 к сигнальным фосфолипидам, что может указывать на участие белка в фосфоинозитид-зависимой В мишени NCS-1 в сигнализации. качестве вероятной фоторецепторах впервые идентифицирована родопсинкиназа. Найдены регуляторные последовательности в N- и Сконцевой областях NCS-1, обуславливающие уникальный механизм связывания этого белка с компонентами мембран и специфичность узнавания им родопсинкиназы. Впервые обнаружена способность NCS-1 координировать Zn²⁺. Показано, что заполнение высокоаффинных сайтов связывания Zn²⁺ стабилизирует NCS-1, в то время как заполнение низкоаффинных сайтов приводит к денатурации белка. Впервые продемонстрирована редокс-чувствительность NCS-1. Показано, что в присутствии высоких концентраций Zn²⁺, характерных для окислительного стресса фоторецепторной клетки, NCS-1 образует дисульфидный димер, который отличается

повышенной Ca²⁺-чувствительностью и активностью в отношении родопсинкиназы. Впервые продемонстрировано, что в клетках димер NCS-1 восстанавливается при участии тиоредоксиновой системы, в то время как высокомолекулярные окисленные агрегаты белка утилизируются протеасомой. Впервые показано, что накопление окисленных форм белка ассоциировано с апоптозом клеток, развитие которого не наблюдается при подавлении экспрессии NCS-1.

5. Теоретическая и практическая значимость работы

В настоящей работе NCS-1 идентифицирован как новый компонент зрительной системы, функционирующий совместно с НКС рековерином и белками активаторами гуанилатциклаз. Полученные данные с одной стороны расширяют представления о механизмах Ca²⁺-зависимой регуляции фототрансдукции позвоночных животных, а с другой – предлагают решение фундаментального вопроса о том, каким образом достигается специфичность действия нескольких Ca²⁺-сенсоров, совместно локализованных в одном клеточном компартменте. В частности, в работе показано, что NCS-1 и рековерин регулируют одну и ту же мишень родопсинкиназу, однако условия, в которых происходит регуляция, отличаются за счет разного механизма мембранной ассоциации и разной чувствительности к физиологическим катионам этих белков. Обнаружение регуляторных участков в структуре NCS-1, отвечающих за подобную функциональную специфичность, может иметь прикладное значение, поскольку они могут рассматриваться как мишени для таргетного подавления его активности в рамках специфической терапии заболеваний, ассоциированных с избыточной экспрессией этого белка, таких как шизофрения, биполярное расстройство, а также некоторые нейроофтальмологические патологии. Важнейшим фундаментальным результатом работы является выявление Zn²⁺-связываюших свойств NCS-1. Этот результат дополняет растущее количество данных о роли Zn²⁺ не только как структурного металла в белках, но и как регуляторного катиона, который способен обратимо связываться с сигнальными белками и оказывать влияние на их активность в клетке. Показанный в работе дестабилизирующий эффект низкоаффинного связывания Zn²⁺ в отношении структуры NCS-1 может объяснить патологические изменения в нейронах при глаукоме, болезни Альцгеймера и других заболеваниях, сопровождающихся повышением концентрации свободного Zn²⁺ в нервной ткани. Наконец, еще одним ключевым результатом работы является демонстрация редокс-чувствительности NCS-1. Изучение обнаруженных дисульфидных комплексов белка может способствовать выявлению новых механизмов Ca²⁺- и редоксзависимой регуляции в нейронах, а также более глубокому пониманию нейродегенеративных процессов в сетчатке и других частях нервной системы, уязвимых к окислительным повреждениям.

6. Методология и методы исследования

При выполнении работы применялся широкий спектр молекулярно-биологических, биохимических и биоинженерных подходов. Использовался ряд клеточных и животных моделей, исследования которых производились с помощью цитологических и гистологических методов, световой и флуоресцентной микроскопии и проточной цитофлуориметрии. Характеристика структуры и функции белков, а также белок-белковых взаимодействий осуществлялась с использованием высокотехнологичных инструментальных методов, включая массспектрометрию, флуоресцентную корреляционную спектрометрию, спектроскопию поверхностно-плазмонного резонанса, изотермическую калориметрию титрования, спектроскопию кругового дихроизма, дифференциальную сканирующую флуориметрию, а также электронную микроскопию. Кроме того, в работе использовались методы молекулярного моделирования, включая глобальный слепой гибкий докинг, предсказание оптимальной геометрии хелаторов на основе массива данных из базы Protein Data Bank, а также гибридное квантово-механическое/молекулярно-механическое (КМ/ММ) моделирование.

7. Положения, выносимые на защиту

- 1. В сетчатке быка и кролика NCS-1 экспрессируется в виде единственной изоформы, которая соответствует канонической структуре ортолога человека.
- 2. NCS-1 локализуется в наружных сегментах фоторецепторов сетчатки совместно с белками зрительного каскада.
- NCS-1 связывается с фоторецепторными мембранами Ca²⁺-независимым образом, при этом демонстрируя чувствительность к фосфолипидному составу мембран и повышенное сродство к сигнальным фосфоинозитидам.
- 4. Потенциальной сигнальной мишенью NCS-1 в фоторецепторной клетке является родопсинкиназа (GRK1).
- 5. Структурные особенности N-концевого и С-концевого сегментов, а также металлсвязывающих сайтов NCS-1 обуславливают его функциональные отличия от рековерина.
- 6. Связывание Zn²⁺ в высокоаффинных сайтах стабилизирует NCS-1 и усиливает его сигнальную активность, а в низкоаффинных приводит к денатурации и агрегации белка.
- 7. При индукции окислительного стресса клеток сетчатки и модельных клеток, а также при повышении редокс-потенциала среды и концентрации Zn²⁺ in vitro (т.е. в условиях характерных для окислительного стресса), образуется дисульфидный димер NCS-1, который демонстрирует повышенное сродство к Ca²⁺ и ингибирует родопсинкиназу более эффективно, чем мономер.

8. В клетке дисульфидные димеры NCS-1 восстанавливаются при участии тиоредоксиновой системы, в то время как его высокомолекулярные окисленные формы (агрегаты) утилизируются протеасомой. Накопление окисленных форм NCS-1 может быть связано с развитием апоптоза клеток.

8. Степень достоверности результатов

Все результаты были получены в ходе трех или более независимых экспериментов. Методы исследования и статистическая обработка данных соответствуют современным стандартам.

9. Апробация диссертации

Результаты диссертации были представлены на следующих научных мероприятиях: международной конференции "Биология – наука XXI века" (Пущино, 2013 г.); Европейском Съезде по Фототрансдукции (Дельменхорст, Германия, 2013 г.; Аскона, Швейцария, 2016 г.); конгрессе FEBS (Санкт-Петербург, 2013 г.; Прага, Чехия, 2018 г.); Съезде Биохимиков России (Сочи, 2019 г.)

Апробация диссертационной работы прошла 5 апреля 2021 года на заседании кафедры Биохимии Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

10. Личный вклад автора

Основная часть работы планировалась и выполнялась автором самостоятельно в отделе сигнальных систем клетки НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва с 2013 по 2020 год.

Отдельные эксперименты выполнялись совместно с сотрудниками других отделов и организаций:

- отдела математических методов в биологии НИИФХБ имени А.Н. Белозерского (молекулярный докинг и моделирование);
- отдела биоэнергетики НИИФХБ имени А.Н. Белозерского (создание липосом и флуоресцентная корреляционная спектроскопия);
- филиала Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.
 Овчинникова РАН, Пущино (экспрессия и очистка белков);
- Института биологического приборостроения РАН, Пущино (спектральные исследования белков);
- Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, Москва (гистологические исследования и исследования на клеточных моделях);

 Института нейрофизиопатологии Марсельского университета, Марсель, Франция (изотермическая калориметрия титрования и дифференциальная сканирующая флуориметрия).

Имена и вклад всех соавторов указаны в опубликованных работах.

11. Публикации

По материалам диссертации было опубликовано 7 статей в международных рецензируемых научных журналах из Q1 и Q2, и 6 тезисов конференций.

Научные статьи по теме диссертации, опубликованные в журналах Scopus и WoS:

- <u>Baksheeva V.E.</u>, Nazipova A.A., Zinchenko D.V., Serebryakova M.V., Senin I.I., Permyakov S.E., Philippov P.P., Li Y., Zamyatnin A.A. Jr., Zernii E.Yu., Aliev G. Ca2+-myristoyl switch in neuronal calcium sensor-1: a role of C-terminal segment. *CNS and Neurological Disorders – Drug Targets* 2015;14(4):437-51.
- Zernii E.Yu., <u>Baksheeva V.E.</u>, Iomdina E.N., Averina O.A., Permyakov S.E., Philippov P.P., Zamyatnin A.A. Jr. and Senin I.I. Rabbit models of ocular diseases: new relevance for classical approaches. *CNS and Neurological Disorders – Drug Targets* 2016;15(3):267-91.
- Tsvetkov P.O., Roman A.Y., <u>Baksheeva V.E.</u>, Nazipova A.A., Shevelyova M.P., Vladimirov V.I., Buyanova M.F., Zinchenko D.V., Zamyatnin A.A. Jr., Devred F., Golovin A.V., Permyakov S.E., Zernii E.Yu. Functional Status of Neuronal Calcium Sensor-1 Is Modulated by Zinc Binding. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 2018 Dec 14;11:459.
- 4. <u>Baksheeva V.E.</u>, Tiulina V.V., Tikhomirova N.K., Gancharova O.S., Komarov S.V., Philippov P.P., Zamyatnin A.A. Jr., Senin I.I., Zernii E.Yu. Suppression of light-Induced oxidative stress in the retina by mitochondria-targeted antioxidant. *Antioxidants (Basel)* 2018 Dec 21;8(1):3.
- Zernii E.Y., Nazipova A.A., Nemashkalova E.L., Kazakov A.S., Gancharova O.S., Serebryakova M.V., Tikhomirova N.K., <u>Baksheeva V.E.</u>, Vladimirov V.I., Zinchenko D.V., Philippov P.P., Senin I.I., Permyakov S.E. Light-Induced Thiol Oxidation of Recoverin Affects Rhodopsin Desensitization. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 2019 Jan 7;11:474.
- Baksheeva V.E., Nemashkalova E.L., Firsov A.M., Zalevsky A.O., Vladimirov V.I., Tikhomirova N.K., Philippov P.P., Zamyatnin A.A. Jr., Zinchenko D.V., Antonenko Yu.N., Permyakov S.E., Zernii E.Yu.. Membrane Binding of Neuronal Calcium Sensor-1: Highly Specific Interaction with Phosphatidylinositol-3-Phosphate. *Biomolecules* 2020 Jan 21;10(2):164.
- Vladimirov V.I., <u>Baksheeva V.E.</u>, Mikhailova I.V., Ismailov R.G., Litus E.A., Tikhomirova N.K., Nazipova A.A., Permyakov S.E., Zernii E.Yu., Zinchenko D.V. A Novel Approach to Bacterial Expression and Purification of Myristoylated Forms of Neuronal Calcium Sensor Proteins. *Biomolecules* 2020 Jul 10;10(7):1025.

І. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Сигналы внутриклеточного Ca^{2+} играют ключевую роль в регуляции структуры и функции нервной системы. Особый интерес для исследования представляют контроль возбудимости и пластичности нейронов при участии ионов кальция, поскольку эти процессы лежат в основе механизмов высшей нервной деятельности. С момента открытия роли циклических нуклеотидов и связанных с ними сигнальных путей, предполагалось, что Ca^{2+} также может выполнять функцию вторичного мессенджера в нейронах. Спустя некоторое время были идентифицированы первичные Ca^{2+} -сенсоры в цепочке стимул-ответ, которые способны трансформировать информацию, содержащуюся в потоке ионов кальция, в регуляцию каналов, ферментов, рецепторов и факторов транскрипции. В течение последних 30-ти лет было открыто целое семейство таких Ca^{2+} -сенсоров, ярким представителем которых является нейрональный кальциевый сенсор-1 (neuronal calcium sensor-1, NCS-1).

1.1. ФРЕКВЕНИН И NCS-1

NCS-1 (neuronal calcium sensor-1) был впервые охарактеризован как белок дрозофилы (Drosophila melanogaster), кодируемый геном, локализующимся в т.н. Shaker-локусе Ххромосомы [1]. Ранее было показано, что мутации в этом локусе у мух фенотипа V7 связаны с дисфункцией потенциал-зависимых K⁺-каналов, которая выражается в чрезмерной возбудимости мотонейронов и приводит к судорогам. Поскольку активность K⁺-каналов у V7 подавлялась лишь частично, было высказано предположение, что в этом фенотипе затронут не сам ионный канал, а связанный с ним ранее неизвестный регуляторный белок. Было проведено секвенирование соответствующего участка хромосомы и получена последовательность нового гена. Анализ продукта его трансляции длиной 187 а.о. показал наличие четырех Ca²⁺-связывающих мотивов типа EF-hand, гомологичных таковым у кальмодулина [2]. Методом гибридизации in situ был показан паттерн экспрессии нового белка в нервной системе дрозофилы и выявлена его локализация в синаптических окончаниях. Выяснилось, что у фенотипа V7 разрыв хромосомы вблизи сигнала полиаденилирования обнаруженного гена способствует ~4-кратному увеличению его экспрессии [3]. Примечательно, что характерный для V7 «взрывной» выброс нейромедиатора запускается стимуляцией моторных нейронов в определенном диапазоне частот (>5 Гц). Такой же эффект наблюдается у генетически модифицированных животных с избыточной экспрессией нового белка. В связи с этим свойством последнему было присвоено название «фреквенин» (от англ. «frequency»).

Не осталось незамеченным сходство фреквенина с универсальным Ca²⁺-сенсором кальмодулином и открытыми на тот момент рековерином и визинин-подобным белком (visinin-

like protein-1, VILIP-1). Фреквенин, рековерин и VILIP-1 специфичны для нервной ткани, содержат четыре Ca^{2+} -связывающих EF-hand мотива и N-концевой сигнал миристоилирования – ацилирования остатком 14-звенной насыщенной жирной (миристиновой) кислоты. На основании этого сходства авторы предположили, что указанные белки относятся к новому семейству примембранных белков, отвечающих за регуляцию чувствительности различных типов нейронов к внешним стимулам в ответ на сигналы Ca^{2+} . Это семейство получило название «нейрональные кальциевые сенсоры» (НКС) [4].

Открытый впоследствии ортолог фреквенина (72% идентичности) из нервной системы курицы (Gallus gallus), получил название NCS-1 . Кроме того, были охарактеризованы гомологи NCS-1 лягушки (Xenopus laevis), крысы (Rattus norvegicus), мыши (Mus musculus), человека (Homo sapiens), рыбки-зебры (Danio rerio), речного рака (Procambarus clarkii), морского зайца (Aplysia californica), нематоды (Caenorhabditis elegans), пекарских (Saccharomyces cerevisiae) и делящихся (Schizosaccharomyces pombe) дрожжей и т.д [5-14]. Также Ca²⁺-связывающие белки, обладающие сходной структурной организацией, были открыты в растениях и получили название SCaBP (SOS3-like calcium-binding protein, кальций-связывающие белки из группы SOS3, где SOS3 – первый открытый белок этого семейства) [15, 16]. Особенно примечательно, что близкородственные фреквенину/NCS-1 белки встречаются у одноклеточных организмов. При этом наблюдаемая степень консервативности NCS-1 (60% идентичности для белков человека и дрожжей) может указывать, во-первых, на близкое родство этого белка с общим предком семейства HKC, а во-вторых – на фундаментальность его функции (Рис. 1). Действительно, при экспрессии в дрожжевых клетках, NCS-1 млекопитающих способен частично заменять собой фреквенин [17].

Ортологи NCS-1 известны под множеством разных названий: для дрозофилы, лягушки, ракообразных используется название «фреквенин», для дрожжей – Frq1, для человека, курицы и нематоды – NCS-1, для моллюска морского зайца – апликальцин и т.д. В настоящей работе для удобства название «NCS-1» будет использоваться для белка позвоночных (>95% идентичности человеческому), а «фреквенин» – для всех прочих вариантов белка (даже в случае, если оригинальное наименование в литературе отличается, как в случае фреквенина лягушки или NCS-1 нематоды).

Наибольшие различия в последовательности между NCS-1 и фреквенином сосредоточены в области 1-ой α-спирали белка, а также в петлях между 2-ой и 3-ей и 7-ой и 8-ой α-спиралями. Участок после 185-ого остатка совпадает у позвоночных и дрожжей, однако варьирует среди беспозвоночных. Интересным свойством NCS-1 по сравнению с фреквенином является полное отсутствие остатков гистидина в белке, в то время как для беспозвоночных консервативными являются несколько остатков гистидина, включая H102. Возможно, причиной является высокая чувствительность остатков гистидина к изменениям внутриклеточного pH (pK_a боковой цепи гистидина равен 6), который в нейронах млекопитающих может значительно варьировать [18]. Согласно результатам молекулярного моделирования, замена R102H делает структуру NCS-1 чувствительной к колебаниям pH, что может быть несовместимо с его ролью универсального Ca^{2+} -сенсора, присутствующего в самых разнообразных типах клеток и клеточных компартментов [19].



Рис. 1. Подсемейство фреквенинов семейства нейрональных кальциевых сенсоров. Выравнивание аминокислотных последовательностей NCS-1 человека и его ортологов из многоклеточных организмов и дрожжей с раскраской по гомологии: α-спирали белка пронумерованы.

1.2. СТРУКТУРА ГЕНА И ИЗОФОРМНЫЙ СОСТАВ NCS-1

Ген NCS-1 человека расположен на 9-ой хромосоме в локусе 9q34.1, и по своей экзонинтронной организации аналогичен гену фреквенина дрозофилы [20]. Ген имеет длину около 64 тыс. пар оснований и содержит 8 экзонов и 7 интронов. Только 8% гена фреквенина дрозофилы представляет собой кодирующую последовательность – эта доля еще меньше для гена NCS-1 человека (<1%).

1.2.1. Регуляция экспрессии NCS-1 и фреквенина

обладают Некодирующие области NCS-1/фреквенина генов крайне низкой консервативностью, за исключением нескольких участков двух первых интронов. В гене фреквенина дрозофилы некоторые из этих консервативных участков содержат сайты связывания факторов транскрипции: dorsal-2, Broad-complex, экдизон-зависимого белка 74EF, Ultrabitorax, Hunchback, Snail и белка теплового шока-1 [21]. В клетках грибка Neurospora crassa фактор транскрипции CRZ-1 связывается с последовательностью в промоторе гена фреквенина за 216 п.о. от старт-кодона и стимулирует экспрессию белка [22]. В C.elegans экспрессия фреквенина и других белков-регуляторов нейротрансмиссии контролируется белком Fax-1, ряда близкородственным ретиноспецифическому фактору транскрипции PNR [23]. Механизмы регуляции транскрипции NCS-1 млекопитающих остаются невыясненными. Показано, что у человека промоторная область гена NCS-1 расположена на отрезке длиной 2000 п.о. перед старткодоном и что ингибирование фосфорилирования неизвестного фактора транскрипции протеинкиназой Gsk3^β повышает экспрессию NCS-1 [24]. В промоторной области NCS-1 также обнаружен сайт связывания субъединицы RelA-p65 комплекса NFкВ [25]. Противоопухолевые микро-РНК miR-144-5р и miR-144-3р связываются в некодирующей 3'-концевой области мРНК NCS-1 и подавляют синтез белка [26]. В мозге крысы экспрессия NCS-1 регулируется микро-РНК, связанными с ангиогенезом и синаптогенезом [27].

1.2.2. Дупликация гена

У ряда животных было обнаружено два гена NCS-1. В каждом случае появление двух вариантов гена, вероятнее всего, было результатом независимой дупликации, при этом вторая копия сохранилась в процессе эволюции благодаря тому, что соответствующий ей белок приобрел новую, уникальную функцию и/или локализацию. Так, у рыбки-зебры две формы белка идентичны на 97%: NCS-1a присутствует в нервной ткани повсеместно, а NCS-1b – только в обонятельных луковицах [8]. У дрозофилы также был обнаружен второй ген фреквенина, идентичный первому на 95% [28]. У взрослых животных продукты трансляции этих генов обладают одинаковыми паттернами экспрессии и функциями, но фреквенин-1 преобладает во время развития организма [29]. Биоинформатический анализ показал, что, несмотря на сходство первичной структуры, скорее всего, функции двух фреквенинов дрозофилы различны, поскольку их гены накапливают мутации с разной скоростью [21]. Действительно, именно экспрессия фреквенина-2 драматически повышена у фенотипа V7, который характеризует избыточной активностью синаптической передачи, в то время как экспрессия фреквенина-1 остается неизменной.

1.2.3. Альтернативный сплайсинг

Анализ человеческого транскриптома выявил наличие двух альтернативных мРНК NCS-1: первая мРНК соответствует белку, идентичному NCS-1 млекопитающих (190 a.o.), в то время как вторая мРНК кодирует вариант NCS-1, у которого первые 22 остатка полипептидной цепи, включающие в себя сигнал миристоилирования и первую α-спираль белка, заменены на последовательность из 4 аминокислот MATI [30]. Полученная укороченная изоформа NCS-1 (172 а.о.), называемая здесь и далее NCS-1^{MATI}, является продуктом альтернативного сплайсинга: последовательность ДНК, соответствующая 5'-концевому участку укороченной мРНК, расположена внутри первого интрона гена NCS-1. Укороченная мРНК NCS-1 присутствует в клеточных линиях человека, но ее содержание на 3 порядка ниже, чем содержание полноразмерной мРНК, а экспрессию соответствующего ей белкового продукта детектировать не удалось [31]. Изоформа NCS-1^{МАТІ} отличается от основной изоформы белка своими Ca²⁺связывающими свойствами: она связывает на один Ca²⁺ меньше и обладает примерно на 2 порядка более низким сродством к этому катиону (K_D=8,6 мкМ). Несмотря на это, при экспрессии рекомбинантного NCS-1 в клетках SHSY5Y разницы в жизнеспособности клеток, преимущественно экспрессирующих первую или вторую изоформы белка, не наблюдается. Таким образом, скорее всего, преобладающей *in vivo* изоформой NCS-1 является классический миристоилированный вариант белка длиной 190 а.о.

1.2.4. РНК-редактирование

мРНК обоих вариантов фреквенина дрозофилы подвергаются ADAR-зависимому $A \rightarrow I$ редактированию, результатом которого является замена I178M в финальном белковом продукте [32]. Остаток I178 строго консервативен среди всех ортологов NCS-1 и образует ряд внутримолекулярных контактов, участвующих в стабилизации белка и его комплексов с регуляторными мишенями [33, 34]. Таким образом, хотя изолейцин и метионин близки по размеру и свойствам своих боковых цепей, замена в этом положении может иметь функциональное значение. Тем не менее, роль PHK-редактирования фреквенина до сих пор остается невыясненной: отсутствие замены как минимум не препятствует связыванию одной из ключевых мишеней фреквенина, белка Ric8a (синембрина) [32]. У млекопитающих PHK-редактирование NCS-1 пока не было выявлено ([35], настоящая работа). Однако следует учитывать, что PHK-редактирование в нейронах является регулируемым процессом, и доля модифицированных мPHK может зависеть от множества условий, включая тип клетки или наличие факторов стресса [36].

1.3. ЛОКАЛИЗАЦИЯ NCS-1

По сравнению с другими белками семейства НКС, многие из которых встречаются исключительно или преимущественно в сетчатке или гиппокампе, NCS-1 обладает достаточно широкой локализацией (Рис. 2А-В) [37]. Больше всего NCS-1 содержится в отделах мозга, отвечающих за процессы обработки информации, обучения, памяти и контроля эмоций: коре больших полушарий, таламусе, миндалевидном теле, гиппокампе и мозжечке (Рис. 2Б). У человека содержание NCS-1 в нейронах коры в несколько раз превышает его экспрессию NCS-1 в других отделах мозга, что отражает важность белка для когнитивной функции [7]. Внутриклеточная концентрация NCS-1 в нейронах при этом составляет от 0,5 до 5 мкМ и может сильно варьировать даже внутри одной популяции нейронов [38].



Рис. 2. Локализация NCS-1 в организме человека. Карта экспрессии NCS-1 в (А) организме и (Б) мозге человека (по данным Human Protein Atlas). (В) Распределение NCS-1 между разными тканями организма по данным транскриптомного анализа (Gierke P. et al., Biochemical and Biophysical Research Communications 2004).

1.3.1. Локализация в нервной ткани

Наиболее точно локализация NCS-1 в нервной системе была определена у грызунов. Изначально было обнаружено выраженное окрашивание антителами против NCS-1 пирамидальных нейронов гиппокампа и аксональных кисточек корзинчатых нейронов мозжечка, а также уздечки таламуса [38, 39]. Дальнейшие исследования показали высокое содержание белка в миелинизированных аксонах мозолистого тела, внутренней капсулы, передней спайки, пирамидной системы, а также белого вещества мозжечка [40]. Значительное окрашивание также наблюдается в телах и дендритах нейронов коры мозга, базальных ядер (ганглиев) переднего мозга (в т.ч. полосатого тела и бледного шара), обонятельных луковиц, зубчатой извилины гиппокампа, среднего мозга, варолиева моста, продолговатого мозга, коры и глубоких ядер мозжечка, ствола мозга [40].

На уровне мРНК экспрессия NCS-1 выражена в гранулярных и митральных клетках обонятельных луковиц; передних обонятельных ядрах; пирамидном слое обонятельной коры; всех слоях коры кроме слоя I (самого наружного); перегородке между боковыми желудочками мозга; базальных ядрах – путамене, хвостатом ядре и прилежащем ядре; отделах CA1-CA3 (пирамидальные нейроны) и зубчатой извилине (гранулярные нейроны) гиппокампа; уздечке и ядрах таламуса; ядрах гипоталамуса; верхнем и нижнем двухолмиях среднего мозга; глубинных ядрах мозжечка; стволе мозга [41]. У мыши NCS-1 выявлен повсеместно в центральной нервной системе (ЦНС) и преобладает в коре переднего мозга, корзинчатых клетках и клетках Пуркинье мозжечка, пирамидальных нейронах и гранулярных клетках зубчатой извилины гиппокампа, а также в сером веществе спинальных ганглиев и передних рогах спинного мозга [6].

Во внутреннем ухе NCS-1 локализуется в пре- и постсинаптических нервных окончаниях вестибулярного аппарата и кортиева органа [42]. NCS-1 ассоциирован с цитоскелетом в отростках (нейритах) и синапсах обонятельных нейронов [43]. Экспрессия NCS-1 также наблюдается в клетках глии: незрелых астроцитах гиппокампа и Бергмановских глиальных клетках мозжечка [6]. NCS-1 содержится в радиальных астроцитах, которые отвечают за передачу сигналов между разными структурами спинного мозга в процессе его развития [44]. За пределами ЦНС NCS-1 преимущественно локализуется в нервно-мышечных окончаниях и мышечных веретенах – рецепторах, которые направляют в нервную систему информацию о скорости сокращения и длине мышц, а также в энтеральной нервной системе кишечника [45-47]. В коже NCS-1 сконцентрирован в нервных окончаниях вблизи кровеносных сосудов [48].

1.3.2. Локализация вне нервной системы

На нервную ткань приходится немногим более 60% от общей экспрессии NCS-1 [37]. В организме человека мРНК NCS-1 в небольших количествах обнаружена в почках, кишечнике и предстательной железе [7]. У крысы NCS-1 присутствует в костной ткани, почках и сердечной мышце, хотя его содержание в последней (~1 нг/мг тотального белка) значительно ниже, чем в мозге (~14 нг/мг) [39, 49]. У мыши экспрессия NCS-1 наблюдается в гладких мышечных клетках желудочно-кишечного тракта, хотя она примерно в 10 раз ниже, чем в мозге [50]. У морского зайца высокий уровень экспрессии фреквенина (апликальцина) обнаружен в половой системе [10]. Несколько противоречивы сведения о локализации NCS-1 в сердечной мышце. Выявить экспрессию белка в сердце длительное время не удавалось, однако впоследствии было показано,

19

что NCS-1 в небольших количествах присутствует в миоцитах желудочков [6, 11, 51]. Оказалось, что содержание NCS-1 в сердце значительно выше до рождения, чем во взрослом организме: в кардиомиоцитах NCS-1 локализуется в области мембраны (сарколеммы) и связан с системой Т-трубочек [52].

1.3.3. Экспрессия в клеточных линиях

NCS-1 найден во многих клеточных культурах, широко используемых в лабораторных исследованиях, например, в клетках почки Мадин-Дарби (Madin-Darby canine kidney, MDCK) и в хромаффинных клетках надпочечников быка (Bos taurus), что значительно облегчает разработку клеточных моделей для исследования его функции [53, 54]. В нейроэндокринных клетках феохромоцитомы (опухоли надпочечников) PC12, NCS-1 локализуется на поверхности синаптофизин-содержащих мембранных пузырьков в конусе роста клетки, а также на внутренней поверхности плазматической мембраны [55, 56]. В иммортализованных клетках почек COS-7 NCS-1 присутствует в приядерной области и в точечных структурах в цитоплазме, где колокализуется с маркером транс-Гольджи у-адаптином [20, 57]. В клетках нейробластомы мыши NG108-15 NCS-1 обнаружен на плазматической мембране и на поверхности крупных гранул в цитоплазме, и колокализуется с синаптическим белком SNAP-25 [58]. Железистые клетки Att-20 мыши содержат гранулы, иммунопозитивные по NCS-1 [59]. NCS-1 присутствует в цитоплазме и приядерной области тучных клеток (базофильных клеток лейкемии RBL-2H3), хотя и в несколько меньших количествах, чем в нейроэндокринных клетках [60]. NCS-1 был обнаружен и в других иммунных клетках: зрелых нейтрофилах человека и в клеточной линии лейкемии HL-60 [61]. Экспрессия NCS-1 также наблюдается в клетках-предшественниках остеобластов MC3T3-E1 [49]. NCS-1 в больших количествах присутствует в раковых клеточных линиях человека: клетках нейробластомы SHSY5Y и клетках рака молочной железы MB231 [31]. На уровне РНК экспрессия NCS-1 была выявлена в клетках пигментного эпителия сетчатки ARPE-19 и в родственных фоторецепторам клетках ретинобластомы У79 [62].

1.3.4. Внутриклеточная локализация

Основная доля внутриклеточного NCS-1 содержится в мембранах эндоплазматического ретикулума (ЭПР) и Гольджи, однако небольшое количество белка также присутствует в растворимой фракции цитоплазмы [63]. В телах нейронов коры, гиппокампа и мозжечка NCS-1 сосредоточен в приядерной области, на поверхности мембранных цистерн комплекса Гольджи, наиболее удаленных от ядра (т.н. транс-Гольджи) [40]. В мозге NCS-1 преобладает в постсинаптических окончаниях по сравнению с пресинаптическими окончаниями – исключение

составляют богатые NCS-1 окончания аксонов мшистых ядер мозжечка. В аксонах NCS-1 колокализуется с нейрофиламентами, микротрубочками и ЭПР. Особенно много NCS-1 в вблизи перехватов Ранвье [48]. NCS-1 не является компонентном синаптосом, хотя колокализуется с белками SV2 и синаптофизином, маркерами синаптических пузырьков [40]. NCS-1, как правило, отсутствует в ядре, однако небольшое количество этого белка обнаруживается в ядрах кардиомиоцитов [64].

1.4. ФУНКЦИЯ NCS-1 В НОРМЕ

Чтобы определить функцию фреквенина/NCS-1 для целого ряда организмов были созданы фенотипы, в которых полностью подавлена его экспрессия. Такие делеции, как правило, не вызывают летальность соответствующего фенотипа в лабораторных условиях. Исключение составляют дрожжи S. cerevisiae: без фреквенина их клетки прекращают деление через 3-4 поколения [13]. В отсутствие фреквенина клетки целого ряда грибков характеризуются нарушениями механизмов полового размножения, пониженной устойчивостью к избытку Ca²⁺ в среде и повышенной уязвимостью к УФ-излучению [14, 65-67]. У паразитического грибка Beauveria bassiana в отсутствие фреквенина значительно снижается вирулентность вследствие утраты способности регулировать рН тканей организма-хозяина [68]. Дрозофилы без обеих копий гена фреквенина характеризуются снижением подвижности [29]. Нематоды C.elegans в отсутствие фреквенина демонстрируют нарушения термотаксиса [69]. У рыбки-зебры в отсутствие NCS-1-1а не развивается полукруглый канал внутреннего уха [8]. Примерно треть мышей с фенотипом NCS-1^{-/-} погибает вскоре после рождения, а особи, доживающие до взрослого возраста, склонны к ожирению и диабету II типа [70, 71]. У животных с делецией NCS-1 также нарушена когнитивная функция: такие мыши демонстрируют тревожное поведение и намного менее охотно исследуют новую среду [72-74].

В целом, фенотипы, делеционные по NCS-1, характеризуются многочисленными дефектами развития, что отражает широкое разнообразие функций этого белка. Действительно, NCS-1 обладает набором из более чем 20 различных регуляторных мишеней – рецепторов, ионных каналов, ферментов и не только – и задействован во множестве внутриклеточных сигнальных путей: он принимает участие в регуляции нейротрансмиссии, рецепции, роста и развития нейрональных отростков, а также секреции, синтеза фосфоинозитидов, гомеостаза Ca²⁺, клеточной мобильности и выживания в условиях стресса (Рис. 3). Одним из важнейших аспектов функциональной активности NCS-1 является регуляция процессов синаптической пластичности, лежащих в основе механизмов высшей нервной деятельности.

21



Рис. 3. Многообразие функций NCS-1. Основные белки-мишени NCS-1 и процессы, в которых они участвуют.

1.4.1. Синаптическая пластичность

Синаптической пластичность представляет собой изменение силы и чувствительности синапса в ответ на определенную последовательность стимулов и обеспечивается его морфологической и функциональной перестройкой. Эти явления играют ключевую роль при формировании нейронных связей в ходе роста и развития организма, а также в рамках механизмов обучения и памяти.

Как было сказано выше, у дрозофилы фреквенин обеспечивает прямую зависимость между частотой возбуждающей стимуляции и интенсивностью выброса нейромедиатора в нервномышечных окончаниях – т.е. способствует развитию кратковременной потенциации, одной из составляющих синаптической пластичности [3]. Похожую активность белок демонстрирует и в других организмах. Инъекция рекомбинантного NCS-1 в клетки лягушки приводит к увеличению частоты спонтанных нервно-мышечных импульсов и амплитуды индуцированных импульсов [12]. В смешанной культуре клеток нейробластомы NG108-15 и миоцитов избыток NCS-1 способствует увеличению числа нервно-мышечных синапсов и значительному (в ~10 раз) росту выброса клетками нейробластомы нейромедиатора ацетилхолина в ответ на потенциал действия [58]. В самых крупных синапсах мозга млекопитающих – чашечках Хельда – NCS-1 уменьшает время отклика на стимул и значительно увеличивает приток ионов Ca²⁺ в пресинаптические

окончания нейронов [75]. Воздействие NCS-1 на активность нейронов повторяет регуляторный эффект факторов роста, секретируемых мышечными клетками, таких как GDNF и нейротрофин-3. Действительно, было показано, что GDNF стимулирует экспрессию NCS-1 в мотонейронах, и что долговременная потенциация нейронов лягушки под действием GDNF опосредована именно активностью NCS-1 [76]. Нейроны без выраженных морфологических отличий иногда демонстрируют разный уровень экспрессии NCS-1, и это может служить объяснением для разных паттернов активности этих клеток в одной популяции [6, 63, 77-79]. Например, у речного рака выражена разница в экспрессии фреквенина между фазическими и тоническими мотонейронами [9]. Высокое содержание фреквенина/NCS-1 может обуславливать низкий порог возбуждения, высокую амплитуду сигнала и быстрое развитие кратковременной депрессии, характерные для фазических нейронов, а регуляция его экспрессии – обеспечивать переключение между типами активности нейронов в ответ на изменение внешних условий [29].

Основными типами синаптической пластичности являются кратковременная потенциация, кратковременная депрессия, долговременная потенциация (long-term potentiation, LTP) и долговременная депрессия (long-term depression, LTD) (для обзора см. [80]). NCS-1 вовлечен сразу в несколько этих процессов.

1.4.1.1. Долговременная потенциация

Хотя NCS-1 присутствует в головном мозге повсеместно, наиболее богаты этим белком нейроны различных отделов гиппокампа. Особенно много NCS-1 в мшистых волокнах – пучках немиелинизированных аксонов, которые передают информацию из зубчатой извилины в отдел гиппокампа CA3 [78]. Зубчатая извилина гиппокампа – одна из немногих структур мозга, где возможен нейрогенез во взрослом организме. Благодаря этому свойству, зубчатая извилина является основной зоной пластичности во взрослом мозге [81]. При индуцировании NMDA-зависимой LTP в гиппокампе крысы, экспрессия NCS-1 в нейронах зубчатой извилины заметно повышается [82]. В свою очередь, избыток NCS-1 снижает пороговое значение стимуляции, необходимое для запуска LTP, которое лежит в основе механизмов обработки информации в гиппокампе, позволяющих мозгу распознавать элементы окружения и отличать «новое» от «знакомого» [83, 84].

1.4.1.2. Кратковременная потенциация

NCS-1 индуцирует кратковременную потенциацию в гиппокампальных нейронах CA1-CA3, отвечающих, в том числе, за пространственную память [85]. За счет этой регуляции NCS-1 может способствовать «пробуждению» синапсов, которые прежде являлись неактивными [86].

1.4.1.3. Долговременная депрессия

Известно, что экспрессия NCS-1 в нейронах гиппокампа регулируется активацией метаботропных рецепторов глутамата [87]. В свою очередь, NCS-1 непосредственно задействован в регуляции глутамат-зависимой LTD, которая развивается в ответ на активацию этих рецепторов [88]. Группой К. Сho предложена следующая модель запуска глутамат-зависимой LTD при участии NCS-1. Показано, что для развития глутамат-зависимой LTD в нейронах гиппокампа необходимо взаимодействие NCS-1 с Ca²⁺-связывающим белком PICK1. Активация глутаматных рецепторов приводит к локальному высвобождению Ca²⁺ из внутриклеточных резервов, что позволяет NCS-1 Ca²⁺-зависимым образом связывать PICK1. В свою очередь, PICK1 индуцирует фосфорилирование и интернализацию ионотропных рецепторов глутамата AMPA и таким образом способствует развитию LTD [89]. Примечательно, что альтернативный, или NMDA-зависимый, путь развития LTD не требует наличия NCS-1 [88].

NCS-1 может также принимать участие в регуляции LTD в нейронах мозжечка. Кора мозжечка разделена на продольные компартменты (кластеры), и механизмы двигательного обучения связаны в том числе с Ca²⁺-зависимой индукцией LTD между нейронами, принадлежащим к разным кластерам [90]. NCS-1 входит в число белков, уровень экспрессии которых значительно варьирует между соседними кластерами, и, таким образом, рассматривается как возможный участник этих механизмов [77].

1.4.1.4. Взаимодействие с Ric8a

Несмотря на то, что фреквенин/NCS-1 был открыт именно как активатор синаптической передачи, остаются неизвестными конкретные сигнальные партнеры, опосредующие его активность. В роли такого партнера может выступать белок Ric8a. Этот небольшой белок участвует в регуляции G-белок-сопряженных рецепторов и непосредственно связывается с α -субъединицей G-белков у беспозвоночных [91, 92]. Ric8a колокализуется с фреквенином-2 в нервной системе дрозофилы и связывается с ним в низком Ca²⁺ [32]. Как и фреквенин-2, Ric8a стимулирует нейротрансмиссию и регулирует развитие нейрональных отростков в нервномышечных окончаниях. Предполагается, что фреквенин-2 может играть роль Ca²⁺-зависимого регулятора Ric8a, ингибируя его активность в состоянии покоя и высвобождая его в ответ на сигнал Ca²⁺.

1.4.2. Развитие нервной ткани

Поскольку экспрессия NCS-1 значительно выше в развивающемся мозге, чем в зрелом, было сделано предположение о его особой роли в процессах роста и дифференцировки нейронов [52]. Действительно, NCS-1a необходим для формирования внутреннего уха у рыбки-зебры [8].

У млекопитающих NCS-1 является одним из самых ранних маркеров нервных клеток [42]. Паттерн экспрессии NCS-1 в нервно-мышечных окончаниях, спинном мозге, сердце, а также слуховой, обонятельной и зрительной системах значительно меняется в ходе их развития и часто коррелирует с такими процессами, как рост аксонов и синаптогенез [42-45, 52, 79, 93].

Тем более примечательно, что в зрелом организме NCS-1, напротив, подавляет рост и ветвление нейритов. Вероятно, это связано с тем, что после созревания нейронов запускаются механизмы, ограничивающие их рост и регенерацию, и NCS-1 может быть задействован в этих Исследования фенотипа дрозофилы V7, избыточного по механизмах. фреквенину, продемонстрировали изменение морфологии нервных окончаний, сокращение числа и длины отростков мотонейронов [94]. Аксоны нейронов с избытком рекомбинантного фреквенина обладают меньшим числом синаптических бутонов (структур, осуществляющих выброс нейромедиатора), однако ультраструктура бутонов сохранена, а сами они несколько увеличены в размерах [95]. При этом было показано, что такие изменения под действием фреквенина происходят за счет открытия Ca²⁺-каналов в конусах роста нейронов и смещения уровня внутриклеточного Ca²⁺ в неоптимальную для роста и ветвления нейритов область [29, 96, 97]. Уменьшение числа отростков на фоне избыточной экспрессии NCS-1 наблюдается и в нервных клетках млекопитающих [58]. В нейроэндокринных клетках, которые способны приобретать некоторые черты нейронов под действием фактора роста NGF, подавление активности NCS-1 повышает эффективность роста нейритов [98]. Однако при полной инактивации NCS-1 в нервных окончаниях спинальных ганглиев рост нейритов полностью прекращается [98]. По-видимому, NCS-1 оказывает комплексное воздействие на морфологию нейрональных отростков за счет регуляции гомеостаза Ca²⁺, в результате чего и избыток, и критический недостаток этого белка приводят к серьезным нарушениям структуры и функции нейронов.

1.4.3. Механизмы обучения и памяти

1.4.3.1. Беспозвоночные

В качестве модели для исследования роли NCS-1 в нервной деятельности были выбраны круглые черви-нематоды (*C.elegans*) благодаря своей простой и хорошо изученной нервной системе. Фреквенин нематоды (идентичен NCS-1 человека на 74%) локализуется, в основном, в сенсорных нейронах, входящих в состав головных амфид – обонятельно-осязательных органов червя [69]. При делеции гена фреквенина животные сохраняют жизнеспособность и даже чувствительность к запахам, т.е. белок не является незаменимым. Однако у таких нематод наблюдаются серьезные нарушения поведения. Так, здоровые особи способны к своеобразному обучению: они запоминают зависимость между температурой окружающей среды и обилием пищи и предпочитают перемещаться в пределах наиболее благоприятной для них температурной

зоны (т.е. демонстрируют термотаксис). Хотя в отсутствие фреквенина термочувствительные клетки нематод продолжают функционировать (например, такие животные избегают слишком жарких зон), черви перестают искать пищу в пределах одной зоны и начинают двигаться хаотично (Рис. 4). Показано, что для нормального термотаксиса необходима экспрессия фреквенина в промежуточных нейронах AIY, которые осуществляют обработку информации, полученной от термочувствительных клеток, а избыток фреквенина даже способствует увеличению скорости обучения и улучшению «памяти» у генетически модифицированных червей [99, 100].



Рис. 4. Роль NCS-1 в механизмах высшей нервной деятельности. Нарушение механизмов термотаксиса и памяти у *C.elegans* вследствие подавления экспрессии фреквенина выражается в хаотичном перемещении червя между температурными зонами вместо целенаправленного поиска пищи внутри одной температурной зоны (Gomez M. et al. Neuron 2001).

1.4.3.2. Позвоночные

Участие NCS-1 в механизмах обучения и памяти было продемонстрировано и для млекопитающих. Так, у мышей селективное повышение экспрессии NCS-1 в зубчатой извилине гиппокампа повышает склонность к исследованию и способствует улучшению краткосрочной и долгосрочной пространственной памяти [83]. У животных дикого типа исследование новой среды и регулярная физическая активность стимулируют увеличение уровня NCS-1 в гиппокампе [73, 101]. Недостаток NCS-1, напротив, подавляет интерес к исследованию, мотивированность, ухудшает пространственную память, провоцирует тревожность и депрессивное состояние [72-74, 102].

1.4.4. Регуляция рецепторов, сопряженных с G-белками

1.4.4.1. Рецепторы дофамина

Нейромедиатор дофамин играет ключевую роль в управлении памятью, вниманием и системой вознаграждения. Нарушения дофаминовой сигнализации связаны с рядом психоневрологических расстройств, таких как шизофрения, биполярное расстройство и болезнь Паркинсона. Семейство дофаминовых рецепторов (относятся к рецепторам, сопряженным с Gбелками; G-protein coupled receptor (GPCR)) включает пять трансмембранных рецепторов (D1-D5), которые отличаются локализацией, чувствительностью к агонисту, предпочтениями в отношении G-белков и характером регуляции (активацией или ингибированием) аденилатциклаз. В сигнальные комплексы с дофаминовыми рецепторами входят белки из группы DRIP (dopamine receptor-interacting proteins), включающие в себя шапероны, другие клеточные рецепторы, белки цитоскелета, протеинкиназы GPCR (G-protein coupled receptor kinase, GRK), и Ca²⁺-связывающие регуляторные белки [103].

Группой R. Levenson NCS-1 был впервые идентифицирован в качестве потенциального регулятора дофаминовой сигнализации [104]. Сначала методом дрожжевого скрининга было выявлено взаимодействие Ca²⁺-сенсора с C-концевым участком рецепторов D2, D3 и D5. Связывание NCS-1 с рецептором D2 (D2R) подтверждается методом аффинного соосаждения (pull-down assay), причем для образования комплекса необходим N-концевой домен NCS-1 (остатки 1-71), включающий в себя нефункциональный центр EF1. Затем на клеточной модели было продемонстрировано, что избыток NCS-1 препятствует агонистзависимой интернализации D2R. NCS-1 также нивелирует эффект избыточной экспрессии протеинкиназ GRK2 и GRK3, которые осуществляют фосфорилирование D2R и D3R, на интернализацию этих рецепторов. В присутствии ионов Ca²⁺, NCS-1 ко-иммунопреципитирует с D2R и GRK2 из клеточного лизата, что говорит об образовании этими белками тройного комплекса. При этом NCS-1 взаимодействует с GRK2 и в отсутствие рецептора и, в теории, может регулировать ее активность в отношении как D2R, так и альтернативных субстратов [105].

В некоторых отделах мозга D2R образует гетеродимеры с аденозиновыми рецепторами $A_{2A}R$ [106]. Такой гетеродимер может функционировать как агонистзависимый активатор или ингибитор аденилатциклазы в зависимости от сочетания доступных агонистов или присутствия дополнительных регуляторных белков. Показано, что в нейронах полосатого тела NCS-1 и еще один Ca²⁺-связывающий EF-hand белок – кальневрон-1 – конкурируют за связывание с гетеродимером D2R/A_{2A}R при разных концентрациях внутриклеточного Ca²⁺: Ca²⁺-NCS-1 предотвращает аллостерическое ингибирование D2R на фоне активации A_{2A}R и способствует

снижению уровня цАМФ, в то время как кальневрон-1 связывается с гетеродимером при большом избытке Ca²⁺ и блокирует оба рецептора [107].



Рис. 5. Участие НКС в Са²⁺-зависимой регуляции каскадов рецепторов, сопряженных с Gбелками. (A) Регуляция рецептора дофамина D2 (D2R) при участии NCS-1 и протеинкиназы GRK2. В присутствии Ca²⁺ NCS-1 образует тройной комплекс с D2R и GRK2, предотвращая фосфорилирование рецептора. В свою очередь, D2R ингибирует аденилатциклазу и таким образом блокирует ряд цАМФ-зависимых сигнальных путей в нейронах. (Б) Регуляция зрительного рецептора родопсина при участии рековерина и родопсинкиназы. В темноте (в высоком Ca²⁺) рековерин связывает родопсинкиназу. На свету активируется каскад родопсин – трансдуцин – цГМФ-фосфодиэстераза. В результате происходит закрытие цГМФ-зависимых ионных каналов, гиперполяризация мембраны и падение уровня Ca²⁺. Рековерин высвобождает родопсинкиназу, которая фосфорилирует родопсин что приводит к связыванию аррестина и инактивации рецептора. Уровень цГМФ постепенно восстанавливается за счет фоторецепторных гуанилатциклаз.

А

Поскольку NCS-1 также колокализуется с D2R в синаптических окончаниях нейронов префронтальной коры головного мозга – области высокой пластичности, тесно связанной с когнитивной функцией – их взаимодействие может играть важнейшую роль в процессах высшей нервной деятельности [108]. Действительно, влияние NCS-1 на механизмы обучения и памяти связано с его участием в дофаминергической сигнализации [83]. Ингибирование взаимодействия между NCS-1 и D2R в нейронах зубчатой извилины гиппокампа при помощи минимального пептида D2R, способного связываться с NCS-1, приводит к снижению уровня экспрессии дофаминового рецептора на мембранах гиппокампальных нейронов, подавлению NCS-1-индуцированной синаптической пластичности и снижению когнитивной функции у экспериментальных животных. В отсутствие NCS-1 также снижен уровень дофаминергической активности в нейронах прилежащего ядра головного мозга, участвующих в системе вознаграждения и мотивации [72].

1.4.4.2. Другие GPCR и GRK

Семейство GPCR характеризуется сходством структуры и некоторыми общими механизмами активации/десенситизации. Поэтому ожидаемо, что, помимо дофаминовых рецепторов, фреквенин/NCS-1 может связывать и другие мишени среди белков этого семейства. Предполагается, что фреквенин из *S. pombe* может регулировать десенситизацию рецептора Git3p, участвующего в глюкозозависимой сигнализации, управляющей половым размножением у этих одноклеточных организмов [109]. Нейроэндокринные клетки, содержащие избыток NCS-1, демонстрируют усиленный ответ на стимуляцию мускариновых рецепторов [110]. NCS-1 и кальневрон-1 конкурируют за связывание рецептора каннабиоидов CB₁R в нейронах полосатого тела [111]. Помимо гетеродимеров с D2R, NCS-1 связывает гомодимеры $A_{2A}R$ и осуществляет Ca²⁺-зависимую регуляцию связанных с ним процессов: фосфорилирование протеинкиназ ERK1/ERK2 и Akt [112].

NCS-1 обладает способностью регулировать протеинкиназы из семейства GRK [105]. Поскольку на семь генов GRK в геноме человека приходится более 800 генов GPCR, каждая GRK участвует во множестве сигнальных путей – и не только за счет своей ферментативной активности [113]. Также стоит отметить, что NCS-1 стимулирует синтез фосфатидилинозитол-(4,5)-бифосфата (PI(4,5)P₂), который является не только фактором мембранной ассоциации, но и непосредственным активатором для ряда GRK [114, 115]. Таким образом, образование комплекса NCS-1 с этими ферментами не является необходимым условием для их регуляции [115]. Активность NCS-1 в отношении GRK является одним из наименее изученных и наиболее перспективных направлений исследования этого Ca²⁺-сенсора.

1.4.5. Секреция

Одним из первых открытых свойств NCS-1 была его способность заметно ускорять время отклика моторных нейронов на стимул [12]. Было высказано предположение, что NCS-1 является регулятором экзоцитоза и, таким образом, напрямую воздействует на скорость выброса нейромедиатора. Действительно, в нейроэндокринных клетках надпочечников, механизмы секреции в которых во многом аналогичны нейрональным, NCS-1 колокализуется с секреторными гранулами и стимулирует выброс их содержимого в ответ на возбуждение пуринергических и гистаминовых рецепторов [54, 56, 116]. NCS-1 также стимулирует секрецию адренокортикотропного гормона клетками таламуса, повышая число образуемых клеткой секреторных пузырьков [59]. В спинном мозге NCS-1 преимущественно локализуется в клетках, осуществляющих секрецию нейропептида CGRP, и, возможно, является участником ее регуляции [48].

Избыточная экспрессия NCS-1 влияет только на агонистзависимую секрецию в интактных нейроэндокринных клетках, но не на секрецию в пермеабилизованных клетках (в которых экзоцитоз запускается напрямую ионами кальция) [117]. По-видимому, воздействие NCS-1 на механизм секреции происходит не напрямую, а при участии белков-посредников. Например, NCS-1 может способствовать запуску экзоцитоза, высвобождая Ca^{2+} из внутриклеточных резервуаров [116]. Чтобы определить возможный механизм этой регуляции, был выполнен поиск сигнальных партнеров NCS-1 в хромаффинных клетках быка. При этом были выявлены как Ca^{2+} зависимые, так и Ca^{2+} -независимые потенциальные мишени NCS-1, но ни один из этих белков не был идентифицирован [117].

1.4.5.1. Регуляция Pik1

Методом дрожжевого скрининга было показано взаимодействие фреквенина *S. cerevisiae* с фосфатидилинозитол-4-киназой Pik1. В присутствии Ca^{2+} фреквенин повышает активность Pik1 в 7-10 раз [13]. Подобно фреквенину, Pik1 локализуется в транс-Гольджи и принимает участие в регуляции секреции [118, 119]. Функция этого фермента состоит в синтезе фосфатидилинозитол-4-фосфата (PI4P), который, в свою очередь, является предшественником PI(4,5)P₂. Последний является одним из мажорных фосфолипидов и участвует в путях G-белок-зависимой сигнализации и регуляции Ca^{2+} -зависимого экзоцитоза: например, регулирует кривизну мембраны, управляет ростом актиновых филаментов вокруг мембранных пузырьков и способствует внутриклеточному распределению белков за счет их накопления в мембранных рафт-структурах [120]. Фреквенин не только коиммунопреципитирует с Pik1, но и обнаруживается в препарате очищенного фермента при выделении последнего из дрожжевого

экстракта. Это позволяет считать фреквенин практически регуляторной субъединицей Pik1, опосредующей чувствительность фермента к сигналам Ca²⁺.

1.4.5.2. Регуляция РІ4КВ в нейроэндокринных клетках

Было высказано предположение, что, подобно фреквенину, NCS-1 может регулировать синтез PI(4,5)P2 в нейронах млекопитающих за счет активации фосфатидилинозитол-4-киназы β Pik1 гомологичной [13]. ΡΙ4Κβ И Pik1 (PI4Kβ), характеризуются отсутствием мембраносвязывающих элементов, в отличие от альтернативных им PI4Ka и Stt4, которые содержат собственный фосфоинозитидсвязывающий домен (pleckstrin homology domain, PH). Поскольку фреквенин взаимодействует с Pik1, но не с Stt4, возможно, его роль состоит именно в обеспечении мембранной локализации Pik1/PI4K_β. Похожий механизм был, в частности, описан для PI4Kβ и фактора АДФ-рибозилирования (ARF1): эта небольшая, содержащая миристоильную группу ГТФаза обеспечивает накопление РІ4КВ на поверхности мембран транс-Гольджи и таким образом стимулирует синтез PI(4,5)P2 [121]. В свою очередь, скопления PI(4,5)P₂ привлекают на мембрану Гольджи белки, участвующие в формировании клатриновой оболочки секреторных пузырьков, такие как AP1 и эпсин R [122, 123]. Действительно, впоследствии было показано, что в нейроэндокринных клетках Ca²⁺-связанный NCS-1 способствует мембранной ассоциации РІ4КВ в ответ на возбуждение пуринергических рецепторов клетки [63, 124].

NCS-1 колокализуется и взаимодействует с PI4Kβ в ряде клеточных линий [53, 57, 60, 116, 125, 126]. Более того, наличие функционально активной PI4Kβ необходимо для формирования гранулярных структур в приядерной области, на поверхности которых накапливается NCS-1 [57]. Однако механизм действия NCS-1 для разных модельных систем может отличаться. Так, в большинстве случаев NCS-1 выступает в роли универсального активатора секреции за счет Ca²⁺-зависимой регуляции PI4Kβ [13, 57, 60, 116, 125]. Однако в определенных условиях, NCS-1 и PI4Kβ, напротив, замедляют внутриклеточный транспорт ряда секретируемых белков между aппаратом Гольджи и поверхностью клетки [53, 126]. Таким образом, обнаружена тесная связь между NCS-1 и PI4Kβ, однако роль этого взаимодействия в разных органах и тканях, а также в рамках различных сигнальных путей (кальцийзависимых, либо агонистзависимых) может отличаться.

Группой R. Burgoyne была предложена модель регуляции экзоцитоза в нейроэндокринных клетках под действием NCS-1/PI4Kβ (Рис. 6), которая подтверждается многочисленными экспериментальными данными [55, 56, 63, 114, 124]. Согласно этой модели, NCS-1 способствует более эффективному высвобождению внутриклеточного Ca²⁺ при стимуляции клеток молекулами агониста (например, АТФ или брадикинина). Это происходит за счет NCS-1-

зависимой активации PI4Kβ и повышения уровня фосфоинозитидов PI4P и PI(4,5)P₂. Последний является субстратом для фосфолипазы C (PLC) и основным источником сигнальной молекулы инозитолтрифосфата (IP₃). Связываясь с рецепторами на поверхности ЭПР, IP₃ запускает высвобождение внутриклеточных запасов Ca²⁺, что, в свою очередь, стимулирует секрецию. В клетках с избыточной экспрессией NCS-1 увеличен запас субстрата для PLC – следовательно, повышен уровень сигнала при воздействии агониста.



Рис. 6. Участие NCS-1 в фосфоинозитид-зависимой регуляции секреции. Схема Ca^{2+} зависимой регуляции секреции в нейроэндокринных клетках (Weiss L., Hui H., Burgoyne R. Cellular and Molecular Neurobiology 2010). В присутствии Ca^{2+} NCS-1 стимулирует фосфорилирование фосфатидилинозитола и накопление в мембранах фосфатидилинозитол-4,5бифосфата (PIP₂). При связывании АТФ с пуринергическими рецепторами P2Y происходит активация фосфолипазы С (PLC), которая способствует образованию из PIP₂ сигнальной молекулы инозитолтрифосфата (IP₃). Связываясь с рецепторами на поверхности эндоплазматического ретикулума, IP₃ запускает высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных резервуаров. При повышении внутриклеточного Ca^{2+} возрастает мобильность секреторных везикул и их склонность к слиянию с плазматической мембраной и выбросу содержимого. Также NCS-1 участвует в регуляции гомеостаза Ca^{2+} , предотвращая закрытие потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов в ответ на активацию P2Y.

1.4.5.3. Регуляция PI4Кβ в нейронах

Сведения о взаимодействии NCS-1 с РІ4Кβ в нервных клетках противоречивы. Так, у дрозофилы не выявлено взаимодействие фреквенина с РІ4Кβ, и инактивация фермента не

оказывает существенного влияния на фреквенинзависимую регуляцию выброса нейромедиатора [29]. Однако у позвоночных взаимодействие NCS-1 с PI4Kβ в нейронах было показано методом коиммунопреципитации [63]. Более того, в нервной системе крысы NCS-1 и PI4Kβ колокализуются в дендритах нейронов спинального ганглия и телах и дендритах нейронов гиппокампа [63, 127]. Также выяснилось, что NCS-1 при посредничестве PI4Kβ стимулирует синтез PI4P и регулирует выброс нейромедиаторов норэпинефрина и глутамата из нервных окончаний [128]. В отсутствие NCS-1 в нейронах гиппокампа мышей *in vivo* снижается уровень фактора роста BDNF и число секреторных гранул, содержащих BDNF и дофамин [102].

1.4.5.4. Регуляция секреции в клетках иммунитета

В клетках иммунной системы множество процессов находится под управлением фосфоинозитидзависимой сигнализации [129]. Показано, что NCS-1 совместно с PI4Kβ стимулирует агонистзависимый выброс метаболитов арахидоновой кислоты из тучных клеток [60, 130]. При этом функция NCS-1 в тучных клетках не ограничивается общей активацией секреции. Показано, что NCS-1 локализуется в эндоцитарном отделе и способствует ускорению переработки трансферрина, захваченного из питательной среды [130]. Трансферрин необходим для активации MAPK-киназ ERK1/2, которые, в свою очередь, регулируют ответ клетки на возбуждение рецепторов FcεRI антителами IgE. В частности ERK2 связывается с PI4Kβ и транслоцируется в приядерную область тучных клеток, где может колокализоваться с потенциальными мишенями из числа белков – участников эндоцитоза [131]. Эффект NCS-1 на скорость переработки трансферрина и активацию MAPK-киназ полностью блокируется биосенсорами, содержащими PI4P-связывающий PH-домен, что указывает на роль фосфоинозитидзависимой регуляции в этом процессе [130]. Таким образом, NCS-1 может осуществлять вклад в иммунный ответ за счет своего участия в мембранной транслокации PI4Kβ и синтезе фосфоинозитидов.

1.4.5.5. Дополнительные сигнальные партнеры NCS-1 в рамках механизма секреции

В синаптических окончаниях нейронов воздействие антител против NCS-1 нарушает Ca²⁺зависимую секрецию норэпинефрина, но не глутамата [128]. Это может быть связано с различным строением и белковым составом секреторных комплексов, содержащих эти нейромедиаторы: например, в состав норэпинефриновых секреторных гранул входит еще один Ca²⁺-чувствительный белок – CAPS. Действительно, CAPS задействован в NCS-1-зависимой сигнализации: так, в β-клетках поджелудочной железы антитела против CAPS полностью блокируют эффект NCS-1 на секрецию инсулина [125].

Помимо CAPS, был выявлен ряд других потенциальных участников NCS-1/PI4Kβзависимой регуляции секреции, в частности, кальневрон-1, белки-адаптеры клатрина AP1 и AP2, синаптобревин-2, белки группы ARF и APOL3 [132-136]. Кальневрон-1 конкурирует с NCS-1 за связывание с РІ4КВ в низком кальции (<400 нМ) и ингибирует активность фермента, тем самым предотвращая спонтанную активацию комплекса NCS-1/PI4Kβ [133]. Аполипопротеин APOL3 связывается с Ca²⁺-заполненным NCS-1 и способствует образованию комплекса NCS-1/PI4Kβ [132]. NCS-1 колокализуется со всеми белками ARF и Ca^{2+} -зависимым образом связывает ARF1 – доказанный сигнальный партнер PI4Kβ [137]. По отдельности, и NCS-1, и ARF1 стимулируют активность PI4KB, однако в присутствии NCS-1 эффективность ARF1 как активатора фермента значительно снижается. В свою очередь, при совместной экспрессии в нейроэндокринных клетках ARF1 препятствует активации секреции под действием NCS-1. По-видимому, NCS-1 и РІ4Кβ могут конкурировать за связывание с ARF1. Таким образом, становится невозможной одновременная активация фермента обоими регуляторными белками и может достигаться дифференцировка сигнальных путей, запускаемых различными стимулами и/или в пределах различных сегментов комплекса Гольджи. Примечательно, что NCS-1 способен нивелировать негативный эффект мутаций в гене ARF1, которые закрепляют последний в конститутивно активной или неактивной формах и приводят к нарушениям структуры комплекса Гольджи [137]. Взаимодействие между всеми тремя компонентами системы NCS-1/PI4Kβ/ARF1 обеспечивает формирование вестибулярного аппарата у костных рыб и термотаксис у круглых червей [134, 138]. Таким образом, регуляция синтеза фосфоинозитидов под действием NCS-1 может играть ключевую роль в развитии сложных сенсорных систем.

1.4.6. Регуляция ионных каналов

1.4.6.1. Потенциалзависимые К⁺-каналы

Потенциалзависимые K⁺-каналы А-типа в мышечных волокнах дрозофилы активируются в ответ на рост внутриклеточного Ca²⁺, и эта регуляция нарушена у особей фенотипа V7, избыточного по фреквенину [139]. При этом фреквенин не оказывает влияния на другие параметры K⁺-каналов, помимо их чувствительности к сигналам Ca²⁺, такие как зависимость от потенциала и время инактивации. Поскольку в этой работе очень высокие концентрации Ca²⁺ (>8 мМ), напротив, подавляли активацию K⁺-каналов, было сделано предположение, что избыток фреквенина способствует повышению внутриклеточного Ca²⁺ до уровня, при котором катион начинает действовать как супрессор проводимости K⁺-каналов. Однако нельзя исключить, что фреквенин вовлечен в специфическую Ca²⁺-зависимую регуляцию K⁺-каналов, например, за счет их фосфорилирования/дефосфорилирования при участии протеинкиназы C [140]. Более того, впоследствии было показано, что на фоне избыточной экспрессии фреквенина у дрозофилы значительно (на 30%) снижается экспрессия белков группы Shaker, включая некоторые субъединицы потенциалзависимых K⁺-каналов [95]. Уменьшение числа K⁺-каналов и утрата ими

чувствительности к Ca²⁺ в присутствии избытка фреквенина может препятствовать реполяризации клеточной мембраны и восстановлению гомеостаза катионов за счет оттока ионов К⁺ после стимуляции, что в итоге и приводит к двигательным нарушениям, характерным для фенотипа дрозофилы V7.

В мозге позвоночных NCS-1 колокализуется с К⁺-каналами А-типа, которыми богаты тела и дендриты нейронов гиппокампа и гранулярных клеток мозжечка [141]. В присутствии Ca²⁺ NCS-1 способствует активации К⁺-каналов, содержащих субъединицы Kv4.2 и Kv4.3: усиливает ток ионов и замедляет инактивацию каналов [142]. В клеточной модели NCS-1 активирует К⁺-каналы несколько менее эффективно, чем их доказанный регулятор KChIP2 – белок из подсемейства HKC, взаимодействующих с К⁺-каналами (K⁺-channel interacting proteins, KChIPs) [51]. Предполагается, что NCS-1 регулирует внутриклеточный транспорт K⁺-каналов из приядерной области на плазматическую мембрану нейронов. В нейронах симпатической нервной системы NCS-1 снижает брадикинин-зависимое закрытие K⁺-каналов M-типа [143, 144]. Вероятно, это происходит за счет активации синтеза PI(4,5)P₂, который необходим для поддержания этих каналов в открытой конформации.

NCS-1 также является потенциальным регулятором К⁺-каналов в сердечной мышце. В эмбриональных кардиомиоцитах наблюдается колокализация NCS-1 с Kv4.2, в то время как экспрессия белков KChIP достигает максимума только после рождения [52]. NCS-1 также коиммунопреципитирует с Kv4.3 из лизата миокарда мыши [51]. Хотя в кардиомиоцитах Kv4.3 регулируется KChIP2, последний практически отсутствует в волокнах Пуркинье, которые образуют в сердце специализированную проводящую систему и значительно отличаются по субъединичному составу K⁺-каналов и механизмам регуляции K⁺-тока от других клеток сердечной мышцы. При этом экспрессия NCS-1 в волокнах Пуркинье значительно превышает экспрессию KChIP2 [145]. В условиях *in vitro* NCS-1 и белок волокон Пуркинье DPP6 демонстрируют синергический эффект в отношении Kv4.3 и активируют его не менее эффективно, чем KChIP2. Таким образом, NCS-1 и белки KChIP обладают общими мишенями в сердце, но регулируют их в разных типах клеток, либо на разных этапах развития сердечной мышцы.

1.4.6.2. Потенциалзависимые Ca²⁺-каналы

Было обнаружено, что замена E120Q, которая препятствует связыванию Ca²⁺ ^[146]и активации NCS-1, способствует значительному усилению тока Ca²⁺ в хромаффинных клетках, экспрессирующих мутантный белок [146]. Это усиление происходит за счет активации Ca²⁺ каналов N- и P/Q-типов, чья функция в норме подавляется эндогенным АТФ и опиоидами. В присутствии мутантного NCS-1 каналы могут становиться конститутивно активными, что

отражается на токе Ca²⁺. Таким образом, NCS-1 вовлечен в регуляцию потенциалзависимых Ca²⁺каналов под действием АТФ/опиоидов в нейроэндокринных клетках. Этот процесс управляется тирозинкиназами из семейства Src, которые фосфорилируют одну из субъединиц Ca²⁺-канала P/Q-типа [147]. В другой клеточной модели рекомбинантный NCS-1 подавляет ток Ca²⁺ через потенциалзависимые каналы L-, P/Q- и N-типа: Ca²⁺-связанный NCS-1 одновременно снижает чувствительность Ca²⁺-каналов к деполяризации мембраны и способствует их более эффективной инактивации после прохождения сигнала [148]. Выяснилось, что восприимчивость каналов типа P/Q к действию NCS-1 определяется изоформой регуляторной β-субъединицы, входящей в их состав: каналы, содержащие изоформу β_2 , в наибольшей степени подвержены NCS-1-зависимой регуляции. Предполагается, что белок может связывать β -субъединицу и мешать ее включению в состав канала, таким образом препятствуя активации последнего [148].

Примечательно, что в нейронах NCS-1, как правило, выступает в роли не ингибитора, а активатора Ca²⁺-каналов. Это может быть связано с тем, что в нервных клетках, в отличие от нейроэндокринных клеток, преобладают Ca²⁺-каналы, содержащие субъединицу β_3 , устойчивую к ингибиторному воздействию NCS-1 [150]. Так, в чашечках Хельда NCS-1 стимулирует ток Ca²⁺ через каналы P/Q-типа, а моторных нейронах NCS-1 активирует Ca²⁺-каналы N-типа совместно с фактором роста GDNF [75, 76]. В нейронах верхнего шейного ганглия NCS-1 связывает С-концевой домен α -субъединицы каналов P/Q-типа и замедляет Ca²⁺-зависимую инактивацию этих каналов, опосредуя развитие кратковременной потенциации [151, 152]. В нервных окончаниях дрозофилы регуляция тока Ca²⁺ обеспечивается взаимодействием фреквенина с α_1 -субъединицей потенциалзависимого Ca²⁺-канала [29]. Таким образом, регуляторная активность NCS-1 в отношении потенциалзависимых Ca²⁺-каналов определяется их субъединичным составом, который, в свою очередь, может отличаться в зависимости от типа клетки или даже внутриклеточной локализации каналов (Таблица 1).

1.4.6.3. Другие Са²⁺-каналы

Помимо потенциалзависимых Ca^{2+} -каналов, NCS-1 взаимодействует и с другими типами каналов для этого катиона. В клетках дрожжей *S. pombe* фреквенин взаимодействует с регуляторной субъединицей Ca^{2+} -канала Yam8p [66]. В синаптических окончаниях NCS-1 образует прочный комплекс с Ca^{2+}/Na^+ -каналами TRPC5, которые участвуют в регуляции роста нейритов, и Ca^{2+} -зависимым образом стимулирует активность этих каналов [98]. NCS-1 также коиммунопреципитирует с рецептором IP₃ (InsP₃R1), который функционирует как Ca^{2+} -канал на поверхности ЭПР, и активирует этот рецептор, тем самым запуская всплеск внутриклеточного Ca^{2+} [153]. Показано, что уровень InsP₃R1 в цитоплазме нейроэндокринных клеток повышается в присутствии избытка NCS-1, и что InsP₃R1 обеспечивает локализацию NCS-1 в конусах роста
нейронов [110, 154]. NCS-1 также регулирует активность другого IP₃-рецептора (InsP₃R2) в эмбриональном сердце [71].

Тип канала	Эффект	Функция	Тип клеток	Источник
P/Q	↓GPCR- зависимый ток	Автокринная/паракринная обратная связь при участии АТФ/опиоидов	Хромаффинные клетки быка	[146]
Ν	↑GDNF- зависимый ток	Стимуляция спонтанной и индуцированной секреции	Нейромышечный синапс лягушки	[76]
P/Q	↑	Быстрая Ca ²⁺ -зависимая потенциация	Чашечка Хельда	[75]
Депо- управляемый вход Ca ²⁺	↑	Различные эффекты на секрецию: 1)↓ за счет деполяризации; 2)↑ по PIP ₂ - зависимому пути	Хромаффинные клетки/РС12	[116]
L, N, P/Q	Ļ	Ингибирование Ca ²⁺ -каналов в зависимости от β-субъединицы в их составе	Ооциты лягушки	[148]
N	↓РІР ₂ /ІР ₃ - зависимый ток	Снижение брадикинин- зависимого ингибирования Ca ²⁺ -тока	Нейроны верхнего шейного ганглия крысы	[143]
TRPC5	↑	Регуляция длины нейрональных отростков	PC12	[98]
Ν	↓при участии IL1RAPL1	Стимуляция секреции при NGF-зависимом снижении длины нейрональных отростков	PC12	[149]
N	↓в конусах роста, но не в теле клетки	Стимуляция Ca ²⁺ -тока через N- каналы и подавление ветвления нейрональных отростков	Нейроны улитки	[96]
Потенциал- зависимый Ca ²⁺ -канал α ₁	↓в мутантах, делеционных по фреквенину	Ингибирование секреции и стимуляция роста нервных окончаний	Нейроны дрозофилы (делеция cacophony)	[29]

Таблица 1. Участие NCS-1 в регуляции Са²⁺-каналов*.

* по данным из обзора Weiss L. et al. Cellular and Molecular Neurobiology 2010

1.4.7. NCS-1 как аналог кальмодулина

Было обнаружено, что у некоторых одноклеточных организмов NCS-1 может частично заменять собой универсальный Ca^{2+} -сенсор кальмодулин [38]. Действительно, как оказалось, NCS-1 и кальмодулин обладают рядом общих мишеней. В частности, NCS-1 способствует активации нейрональной кальмодулинзависимой фосфодиэстеразы (EC₅₀=210 нM) и кальциневрина, кальмодулинзависимой фосфатазы (EC₅₀=350 нM) [117]. Впоследствии были обнаружены и другие общие мишени NCS-1 и кальмодулина: D2R и Ca²⁺-канал TRPC5 [155, 156]. Однако следует учитывать, что концентрация кальмодулина в нейронах значительно выше, чем

концентрация NCS-1, поэтому взаимодействия, наблюдаемые *in vitro*, совершенно не обязательно являются физиологически значимыми [38]. Действительно, не удалось выявить никакого эффекта NCS-1 и других белков HKC на функциональную активность кальциневрина в клетках [157]. Таким образом, многие общие мишени NCS-1 и кальмодулина в реальных условиях, скорее всего, будут взаимодействовать именно с последним. Однако не исключено, что кальмодулин и NCS-1 могут связывать различные участки в молекуле белка-мишени и, таким образом, осуществлять его совместную регуляцию. Например, NCS-1 стимулирует активацию кальмодулином нейрональной NO-синтазы (NOS) (EC₅₀=600 нM), что указывает на синергический эффект этих двух белков в отношении фермента [38]. Также разная Ca²⁺ чувствительность этих белков (NCS-1 связывает Ca²⁺ на 1-2 порядка более эффективно, чем кальмодулин) может способствовать «переключению» мишени между регуляторами в зависимости от внутриклеточных условий. Это подтверждается экспериментальными данными: так, показано, что NCS-1 и кальмодулин конкурируют за связывание α -субъединицы Ca²⁺-канала Cav2.1 и связывают его в разных диапазонах концентрации Ca²⁺ [152].

1.4.8. Выживание в условиях стресса

1.4.8.1. Нейропротекция

NCS-1 не только вовлечен в процессы роста и созревания нейронов, но и принимает участие в механизмах, обеспечивающих их выживание и восстановление после повреждений. Так, экспрессия NCS-1 в спинальных мотонейронах значительно возрастает после механических или химических повреждений [158]. NCS-1 демонстрирует нейропротекторную функцию в модели ишемии мозга, уменьшая область повреждения [27]. Нейропротекторные свойства NCS-1 объясняются его участием в PI3K/Akt сигнальном пути: в частности, показано, что NCS-1 способствует увеличению содержания фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфата (PI(3,4,5)P₃) в плазматической мембране. С этим фосфоинозитидом связывается протеинкиназа Akt, что увеличивает ее локальную концентрацию на мембране, и тем самым стимулирует ее фосфорилирование и активацию. Активированная Akt перемещается в ядро, где фосфорилирует ряд факторов транскрипции, обеспечивающих выживание нейронов [159]. Экспрессия рекомбинантного NCS-1 в нейронах способствует повышению уровня фосфо-Akt, ускоренному аксональному росту и восстановлению двигательной функции после травмы пирамидного тракта у экспериментальных животных [160].

1.4.8.2. Антиоксидантная защита

NCS-1/фреквенин вовлечен в механизмы внутриклеточной антиоксидантной защиты. Действуя совместно с фактором роста GDNF, NCS-1 защищает клетки PC12 от апоптоза при

воздействии высоких (до 300 мкМ) концентраций H₂O₂ [158]. В кардиомиоцитах в отсутствие NCS-1 развивается уязвимость к окислительному стрессу на фоне добавления 100 мкМ H₂O₂: повышается доля гибнущих клеток, падает выработка ATΦ, снижается уровень митохондриального дыхания и концентрация компонентов дыхательной цепи, происходит деполяризация митохондриальной мембраны (Puc. 7) [161]. В модели ишемии-реперфузии у животных, лишенных NCS-1, значительно возрастает площадь поражения сердечной мышцы. Эти изменения опосредованы снижением уровня фосфо-Akt и экспрессии фактора транскрипции PGC-1α и подавлением ассоциированных с ними сигнальных путей [162, 163].



Рис. 7. Вклад NCS-1 в механизмы защиты клеток от окислительного стресса. Подавление экспрессии NCS-1 у экспериментальных животных (мышей) способствует (А) большей уязвимости кардиомиоцитов к окислительному стрессу и (Б) развитию более обширных повреждений сердечной мышцы в модели ишемии-реперфузии (Nakamura T. et al. Journal of Molecular and Cellular Cardiology 2016).

1.4.8.3. Митохондриальная функция

Избыточная экспрессия NCS-1 способствует восстановлению нормальной митохондриальной функции и гомеостаза Ca²⁺ в клетках, делеционных по WFS1, трансмембранному белку, который играет важную роль в транспорте ионов кальция между ЭПР и митохондриями [164]. WFS1 связывает NCS-1 и в комплексе с ним принимает участие в регуляции IP₃-рецепторов на поверхности ЭПР [165]. Таким образом, NCS-1 является перспективной мишенью для терапии синдрома Вольфрама, нейродегенеративного заболевания, связанного с мутациями в гене WFS1.

1.4.8.4. Предотвращение цитотоксичности, вызванной ионами кальция

NCS-1 защищает клетки от токсических эффектов Ca^{2+} . В клетках *N. crassa* экспрессия фреквенина при повышении уровня Ca^{2+} в среде до 400 мМ возрастает более чем в 10 раз [22]. В дрожжевых клетках активация кальмодулина в ответ на повышение уровня Ca^{2+} вызывает

опосредованную кальциневрином активацию экспрессии фреквенина и запуск механизмов толерантности к Ca^{2+} [66]. Экспрессия фреквенина в стрессовых условиях регулируется кальциневринзависимым фактором транскрипции CRZ-1: при высокой концентрации Ca^{2+} , кальциневрин дефосфорилирует CRZ-1, что приводит к его транслокации в ядро и связыванию с промотором гена фреквенина. Вероятными мишенями фреквенина при защите от токсичности ионов кальция являются Ca^{2+} -каналы: Yam8p в клетках дрожжей и MID-1 в *N. crassa* [22, 66].

В клетках слуховых ядер ствола мозга в ответ на стресс (абляцию афферентных слуховых нейронов) не только значительно повышается экспрессия NCS-1, но и происходит перераспределение этого белка между синаптическими окончаниями и телом клетки [166]. Поскольку слуховые нейроны отличаются очень высокой активностью (частота возбуждения может достигать 100 Гц), эти клетки нуждаются в эффективной регуляции своей Ca²⁺-буферной системы [167]. Исходя из этого, было высказано предположение, что NCS-1 может быстро детектировать локальные повышения концентрации Ca²⁺ и защищать эти нейроны от гибели, связанной с избытком катиона, подобно тому, как это происходит у одноклеточных организмов.

1.4.8.5. Старение

Благодаря своей нейропротекторной функции, NCS-1 может участвовать в механизмах, предотвращающих преждевременное старение. Эффект мутаций в гене фосфатидилинозитол-3киназы AGE-1, которые ассоциированы с повышением продолжительностью жизни *C.elegans*, полностью нивелируется в отсутствие фреквенина [168, 169]. В свою очередь, добавление в пищу антиоксиданта α-токоферола практически полностью компенсирует дефекты памяти, вызванные недостатком фреквенина [170]. Таким образом, фреквенин/NCS-1 и AGE-1 могут быть взаимосвязаны в рамках т.н. системы инсулин/IGF-1, играющей важную роль в защите клеток от окислительного стресса и преждевременного старения [171].

1.4.9. Функция в сердечной мышце

1.4.9.1. Развитие сердечной мышцы

Сердце зародыша у млекопитающих значительно отличается от зрелого сердца по своей субклеточной структуре и Ca²⁺-сигнализации [172]. NCS-1 является одним из множества Ca²⁺- связывающих белков, экспрессия которого в эмбриональных кардиомиоцитах выше, чем в зрелых [52]. У мышей с инактивированным геном NCS-1 значительно повышается смертность вскоре после рождения, что, предположительно, связано с частичной утратой сократительной функции желудочков. Группой S. Wakabayashi были охарактеризованы отклонения в Ca²⁺- сигнализации в кардиомиоцитах, вызванные отсутствием NCS-1 [71]. В фазе сокращения, в таких клетках значительно снижены уровень внутриклеточного Ca²⁺ и амплитуда Ca²⁺-сигналов.

Падение тока Ca²⁺ вызвано низким уровнем фосфорилирования белка-регулятора Ca²⁺-насосов фосфоламбана, который, в свою очередь связан с низкой активностью кальмодулинзависимой протеинкиназы CaMKII- δ . Также было показано, что в отсутствие NCS-1 нарушена функция рецептора InsP₃R2, отвечающего за высвобождение Ca²⁺ из ЭПР. Стимуляция кардиомиоцитов фактором роста IGF-1 повышает эффективность связывания NCS-1 с IP₃-рецепторами и способствует росту уровня Ca²⁺ в цитоплазме и ядре [64].

1.4.9.2. Гипертрофия сердечной мышцы

Было отмечено, что взрослые животные без NCS-1 не подвержены гормональноиндуцированной гипертрофии сердца [71]. В связи с этим, NCS-1 рассматривается как потенциальный участник процессов, вызывающих эту патологию. Действительно, экспрессия NCS-1 повышается в ответ на обработку кардиомиоцитов гормонами фенилэфрином и эндотелином-1, воздействие которых ассоциировано с гипертрофией и фиброзом сердца [173]. Выяснилось, что сам по себе избыток NCS-1 способен вызывать гипертрофические изменения в кардиомиоцитах, причем его воздействие полностью блокируется ингибиторами CaMKII-6, кальциневрина и InsP₃R2. Было показано, что воздействие фенилэфрина способствует повышению уровня фосфорилирования СаМКІІ-б, и это повышение предотвращается в результате подавления экспрессии NCS-1 и/или блокировки IP₃-рецепторов. Таким образом, NCS-1 является незаменимым участником Ca²⁺-зависимой регуляции в развивающемся сердце, и его функция опосредована активностью InsP₃R2 и CaMKII-δ. Хотя NCS-1 не взаимодействует с СаМКІІ-б напрямую, его активность в отношении InsP₃R2 может способствовать локальному повышению уровня внутриклеточного Ca²⁺ и активации сигнальных путей в кардиомиоцитах, в норме приводящих к их сокращению, а при гормональных нарушениях – к гипертрофии сердечной мышцы.

1.4.10. Функция в сетчатке

На сетчатку глаза приходится до 10% экспрессии NCS-1 [37]. Однако функция белка в этой ткани остается практически не изученной. Животные с фенотипом NCS-1^{-/-} не демонстрируют явных нарушений зрительной функции, и нет данных о том, как отсутствие NCS-1 влияет на электрофизиологическую активность сетчатки. Большинство исследований потенциальных мишеней NCS-1 в сетчатке ограничиваются экспериментами с препаратами белков, очищенных из экстракта сетчатки или наружных сегментов фоторецепторов. Эти препараты содержат значительные примеси других белков сетчатки, в том числе активных ферментов, что затрудняет определение эффекта NCS-1 в отношении конкретной мишени. В настоящем разделе приведены

имеющиеся предположения о функции NCS-1 в сетчатке, сделанные на основании анализа свойств этого белка в других отделах нервной системы.



Рис. 8. Строение сетчатки млекопитающих. Схематичное изображение слоев и основных клеток сетчатки (Willermain F. et al. Frontiers in Physiology 2014).

1.4.10.1. Локализация NCS-1 в сетчатке

Сетчатка – многослойная ткань со сложной архитектурой, состоящая из трех слоев нейронов: самого внешнего – фоторецепторного, промежуточного слоя биполярных клеток и внутреннего ганглиозного слоя (Рис. 8). Аксоны ганглиозных клеток формируют зрительный нерв, который соединяет сетчатку с мозгом. Области синаптических контактов между нейронами выделены в отдельные слои сетчатки: синапсы фоторецепторов и биполярных клеток образуют наружный плексиформный слой, а синапсы биполярных и ганглиозных нейронов – внутренний плексиформный слой. Также в состав сетчатки входят вспомогательные нейроны – амакриновые и горизонтальные клетки – и Мюллеровские клетки глии. мРНК NCS-1 обнаружена во всех нейрональных слоях сетчатки [11]. Иммуногистохимическое окрашивание криосрезов сетчатки быка, крысы и курицы демонстрирует высокое содержание NCS-1 в фоторецепторах, в наружном и во внутреннем плексиформных слоях, и его полное отсутствие в ядрах нейронов [174]. По

данным, полученным в другой работе, в сетчатке крысы NCS-1 сосредоточен в ганглиозных клетках и внутреннем плексиформном слое, а также в телах некоторых амакриновых клеток, но полностью отсутствует в фоторецепторах [93]. Противоречивость этих данных требует более подробной характеристики локализации NCS-1 в сетчатке, включая внутриклеточную локализацию в фоторецепторных клетках.

1.4.10.2. Участие NCS-1 в развитии синаптических окончаний в сетчатке

В сетчатке присутствуют два типа синапсов: обычные (выбрасывающие нейромедиатор в ответ на потенциал действия) и ленточные (секретирующие нейромедиатор постоянно с переменной скоростью в зависимости от величины мембранного потенциала) [175]. Ленточные синапсы характерны для фоторецепторов и локализуются в наружном плексиформном слое, в то время как внутренний плексиформный слой составляют преимущественно обычные синапсы. У крысы в процессе эмбрионального развития сетчатки NCS-1 появляется на этапе формирования обычных синапсов одновременно с синаптофизином [93]. Предполагается, что NCS-1 может участвовать в развитии обычных синапсов во внутреннем плексиформном слое. В наружном плексиформном слое NCS-1 ненадолго появляется в постсинаптической области на 6-8 день после рождения, а у взрослых животных исчезает полностью. У курицы экспрессия NCS-1 также коррелирует с формированием синаптических слоев в развивающейся эмбриональной сетчатке. У взрослых особей NCS-1 сохраняется преимущественно в синапсах, причем, в отличие от млекопитающих, у птиц NCS-1 содержится в ленточных синапсах зрелых фоторецепторов [79]. Отличия в паттернах экспрессии NCS-1 в сетчатке у разных видов уже отмечались, хотя данных недостаточно, чтобы заключить, что локализация NCS-1 в синапсах фоторецепторов характерна для птиц и отсутствует у млекопитающих [174].

1.4.10.3. Структура и функция фоторецепторной клетки

Фоторецепторные клетки сетчатки – палочки и колбочки – представляют собой высокоспециализированные нейроны, состоящие из нескольких компартментов (Рис. 9) [176]. Принято подразделять фоторецепторы на синаптическую часть, тело клетки, где располагается ее ядро, а также внутренний и наружный сегменты. Внутренний сегмент представляет собой фабрику по производству АТФ и белков, необходимых для приема и передачи светового сигнала: в нем содержится подавляющее большинство клеточных митохондрий и рибосом. В свою очередь, в наружных сегментах присутствует стопка плотно упакованных постоянно обновляющихся мембранных дисков, содержащих GPCR родопсин и другие белки-участники зрительного каскада. Поглощение кванта света вызывает изомеризацию ретиналя – хромофорной группы в составе молекулы родопсина – и переход рецептора в фотовозбужденное состояние [177]. За счет активации G-белка трансдуцина фотовозбужденный родопсин запускает

сигнальный каскад, включающий гидролиз вторичного мессенджера цГМФ фосфодиэстеразой PDE6 и блокировку активности цГМФ-зависимых Na⁺/Ca²⁺-каналов. Снижение концентрации Na⁺ в результате этих процессов вызывает гиперполяризацию мембраны фоторецепторов, что приводит к закрытию потенциалзависимых Ca²⁺-каналов в их синаптических окончаниях и замедлению выброса нейромедиатора глутамата.



Рис. 9. Строение фоторецепторной клетки. Схематичное изображение основных компартментов и органелл фоторецепторной клетки-палочки.

1.4.10.4. Потенциальная функция NCS-1 в синапсах фоторецепторов

Одной из потенциальных мишеней NCS-1 в ленточных синапсах могут быть Ca²⁺-каналы L-типа – единственные потенциалзависимые Ca²⁺-каналы в фоторецепторах [178]. Эти каналы активируются в темноте и инактивируются на свету, тем самым регулируя выброс нейромедиатора глутамата из ленточных синапсов. Блокировка Ca²⁺-каналов L-типа подавляет рост и ветвление нейритов в фоторецепторных синапсах [179]. Такой же эффект в других нейронах оказывает активация NCS-1 (см. раздел 1.4.2). Таким образом, функция NCS-1 в фоторецепторах может быть связана с регуляцией роста и пластичности синапсов за счет воздействия на Ca²⁺-каналы. Действительно, фоторецепторные Ca²⁺-каналы L-типа содержат β_2 -субъединицу, которая является регуляторной мишенью NCS-1 [148].

Еще одной мишенью NCS-1 в синапсах фоторецепторов могут быть аденозиновые рецепторы A_{2A}R, с которыми он связывается в других типах клеток [112]. Известно, что

активация A_{2A}R способствует закрытию фоторецепторных Ca²⁺-каналов [180]. В темноте, когда содержание Ca²⁺ в фоторецепторах максимально (порядка 300-500 нМ), Ca²⁺-связанный NCS-1 может ингибировать A_{2A}R и предотвращать инактивацию Ca²⁺-каналов, способствуя поддержанию высокого содержания Ca²⁺ в синаптических окончаниях [176].

1.4.10.5. Потенциальная функция NCS-1 во внутренних сегментах фоторецепторов

По аналогии с другими типами клеток можно предположить, что в фоторецепторах сетчатки NCS-1 локализуется во внутреннем сегменте, т.е. там, где располагаются ЭПР и аппарат Гольджи. Это в некоторой степени подтверждается данными иммуногистохимии [174]. Однако функция NCS-1 во внутренних сегментах палочек и колбочек остается неясной. Так, в фоторецепторах не обнаружены потенциалзависимые Ca²⁺-каналы N- и P/Q-типов, которые являются мишенями NCS-1, а каналы L-типа присутствуют только в синаптических окончаниях и телах этих клеток [181]. NCS-1 не взаимодействует с фосфатидилинозитол-4-киназой РІ4Ка и дофаминовым рецептором D4, которые преимущественно содержатся в фоторецепторах вместо его доказанных мишеней – PI4K^β и D2R [182-184]. Тем не менее, некоторые сигнальные партнеры NCS-1 – InsP₃R1 и GRK2 – все же присутствуют во внутренних сегментах фоторецепторов [185, 186]. Са²⁺-зависимая регуляция IP₃-рецепторов поверхности ЭПР (к ним относится InsP₃R1), в которой NCS-1 задействован в других типах клеток, обеспечивает выживание фоторецепторов в условиях стресса [187]. Функция GRK2 в фоторецепторах точно не известна, поскольку в них отсутствуют ее основные субстраты. Тем не менее, недавние исследования показывают, что GRK2 может обладать широким интерактомом, который не ограничивается GPCR [105].

1.4.10.6. Потенциальная функция NCS-1 в наружных сегментах фоторецепторов

Особый интерес представляет возможная функция NCS-1 в наружном сегменте фоторецепторной клетки и в рамках механизмов Ca^{2+} -зависимой регуляции зрительного каскада. Снижение концентрации кальция в этом компартменте после прохождения светового сигнала запускает фосфорилирование (десенситизацию) фотовозбужденного родопсина родопсинкиназой (GRK1), контролируемое при участии HKC рековерина, и активацию фоторецепторных гуанилатциклаз под действием белков GCAP (guanylate cyclase activating protein), также относящихся к семейству HKC. Все эти события способствуют восстановлению уровня цГМФ и Ca^{2+} и возвращению фоторецепторов к темновому состоянию. Было показано, что в низком кальции (<150 нМ) фреквенин дрозофилы также может стимулировать гуанилатциклазную активность в препаратах наружных сегментов палочек (НСП) быка [3]. В другом эксперименте NCS-1 связывает и активирует фоторецепторную гуанилатциклазу ONE-

GC, но уже в высоком Ca²⁺ [35]. В целом, активность NCS-1 в отношении гуанилатциклаз требует дальнейших исследований.

Отметим, что из всех тканей организма сетчатка наиболее уязвима для окислительного стресса. Так, фоторецепторы обладают высокой метаболической активностью, характеризуются высоким уровнем потребления кислорода и уровнем внутриклеточного Ca^{2+} , а также постоянно подвергаются световому облучению и содержат значительное количество молекулфотосенситайзеров, которые генерируют активные формы кислорода в ответ на облучение светом. Кроме того, фоторецепторные мембраны обогащены полиненасыщенными жирными кислотами, которые особенно уязвимы к окислительным повреждениям [188]. В свою очередь, NCS-1 присутствует во множестве сенсорных систем у разных организмов, и может защищать высокоактивные нейроны (к которым относятся палочки и колбочки) от окислительного стресса и Ca^{2+} -токсичности [42, 43, 166, 168, 189, 190]. Как уже говорилось, NCS-1 задействован в PI3K/Akt-зависимом сигнальном пути, который запускает механизмы выживания и роста клеток в стрессовых условиях [112, 160, 161]. Активация этого пути необходима для сохранения фоторецепторов при светоиндуцированных повреждениях сетчатки и при таких заболеваниях, как пигментный ретинит [191, 192]. Таким образом, функция NCS-1 в сетчатке может быть связана с нейропротекторными свойствами этого белка.

В заключение необходимо добавить, что, несмотря на многообразие и важность функций NCS-1/фреквенина, для большинства организмов он не является незаменимым белком. Это может объясняться тем, что его утрата может быть частично компенсирована другими кальциевыми сенсорами: например, кальмодулином или другими белками семейства HKC. Действительно, NCS-1 обладает рядом доказанных общих мишеней с кальмодулином, кальневроном-1, белками KChIP и некоторыми другими Са²⁺-сенсорами (для обзора см. [193]). При этом уникальность функции NCS-1 может обеспечиваться, во-первых, диапазоном его чувствительности к ионам Ca²⁺, во-вторых, его клеточной и субклеточной локализацией и, втретьих, паттерном его экспрессии в тканях в процессе развития организма. Таким образом, NCS-1/фреквенин может взаимодействовать со своими сигнальными партнерами в тех условиях, когда другие механизмы их регуляции недоступны – в том числе, при патологиях нервной системы.

1.5. ФУНКЦИЯ NCS-1 ПРИ ПАТОЛОГИЯХ

Нарушения экспрессии и функции белков НКС связаны с целым рядом заболеваний (Рис. 10) [194]. Из-за повсеместности присутствия в клетках ЦНС и разнообразия своих функций NCS-1 вовлечен в патогенез, возможно, наиболее широкого спектра болезней среди всех белков семейства. В основном это психические расстройства (шизофрения и биполярное расстройство), нарушения развития нервной системы (аутизм) и нейродегенеративные заболевания (болезнь Паркинсона), однако в последние годы появляется все больше данных о роли NCS-1 в канцерогенезе [195, 196]. Развитие патологий может быть связано как с повышением, так и с понижением экспрессии NCS-1, а также вызвано мутациями в его гене. Соответственно NCS-1 рассматривается как потенциальная мишень для антипсихотической, противоопухолевой и регенеративной терапии: ряд препаратов, нацеленных на модификацию комплексов NCS-1 с его сигнальными партнерами, уже показали свою эффективность в клеточных и животных моделях некоторых заболеваний.



Рис. 10. Участие NCS-1 в механизмах различных заболеваний нервной системы. (A) У пациентов с болезнью Паркинсона происходит компенсаторное повышение экспрессии NCS-1 в пейсмекерных нейронах черной субстанции среднего мозга. Считается, что регуляция Ca^{2+} -каналов Cav1.3 и дофаминовых ауторецепторов D2A под действием NCS-1 может приводить к адаптации нейронов к патологическим сигналам дофамина и формированию более жизнеспособного фенотипа. (Б) При шизофрении и (В) биполярном расстройстве содержание NCS-1 в коре мозга также повышается. Избыток NCS-1 может препятствовать нормальной интернализации дофаминового рецептора D2 и приводить к накоплению рецептора на мембране, что повлечет за собой повышение чувствительности нейронов к дофамину. В свою очередь, связываясь с рецептором инозитолтрифосфата InsP₃R, избыточный NCS-1 будет способствовать массовому высвобождению Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума и нарушению Ca^{2+} гомеостаза. Примечательно, что комплекс NCS-1 с InsP₃R разрушается в присутствии ионов лития, которые широко применяются

1.5.1. Психические расстройства

Участие NCS-1 в регуляции дофаминергической сигнализации привлекло внимание к этому белку в контексте изучения когнитивных расстройств. У пациентов с шизофренией и

биполярным расстройством примерно вдвое повышена экспрессия NCS-1 в префронтальной коре головного мозга (Рис. 10А) [197]. Повышение уровня NCS-1 также коррелирует с возрастной деменцией [198]. В клеточной модели NCS-1 подавляет синтез и PKA-зависимое фосфорилирование белка DARPP-32, низкий уровень которого в префронтальной коре ассоциирован с шизофренией [199, 200]. Результатом избыточной активности NCS-1 может быть нарушение регуляции «тормозящих» рецепторов D2 и, как результат, снижение уровня вторичного мессенджера цАМФ в клетке, либо снижение возбудимости нейронов за счет увеличения К⁺-тока [103]. Перечисленные факторы могут способствовать снижению активности префронтальной коры, которая наблюдается при этом заболевании. На фоне повышения концентрации NCS-1 в мозге у пациентов с шизофренией, его уровень экспрессии в различных группах иммунных клеток, наоборот, снижается [201]. Таким образом, NCS-1 может рассматриваться как маркер шизофрении и других психоневрологических заболеваний. для лечения биполярного расстройства (Bandura J., Feng Z. Molecular Neurobiology 2019).

Для биполярного расстройства характерны нарушения цикла сна и бодрствования, связанные с дисфункцией пейсмекерных нейронов в среднем мозге, вклад которых в общую электрическую активность мозга проявляется в виде гамма-волновых колебаний [202]. Было показано, что NCS-1 регулирует Ca²⁺-токи, лежащие в основе гамма-волн в нейронах педункулопонтийного ядра. NCS-1 оказывает двухфазный эффект на активность гамма-волн: при концентрации 1 мкМ белок значительно усиливает колебания, а большой избыток NCS-1 (>10 мкМ), напротив, провоцирует их полное затухание [203]. Предполагается, что активность NCS-1 опосредована дисрегуляцией двух альтернативных сигнальных путей, в которых задействованы потенциалзависимые Ca²⁺-каналы P/Q-типа, запускающие пробуждение, либо каналы N-типа, поддерживающие фазу быстрого сна [204]. Связываясь с IP₃-рецепторами в ЭПР, NCS-1 может индуцировать повышение внутриклеточного Ca²⁺ и активацию CAMKII-киназ, осуществляющих непосредственную регуляцию активности Ca²⁺-каналов (Рис. 10Б) [205]. Ионы лития, которые используются для лечения биполярного расстройства, препятствуют активации рецептора InsP₃R1 под действием NCS-1, а также нивелируют аномальную активность Ca²⁺-каналов в педункулопонтийных нейронах [153, 206, 207].

Лечение антипсихотическими препаратами не оказывает воздействия на уровень NCS-1 [198, 208-210]. В то же время, нейролептик хлорпромазин, который применяется для лечения шизофрении, связывается с белком в присутствии Ca²⁺ [211]. В свою очередь, противоэпилептическое средство вальпроат, применяемое для лечения биполярного расстройства, стимулирует экспрессию NCS-1 в передней доле мозга экспериментальных животных [24]. Поскольку взаимодействие между D2R и NCS-1 рассматривается как мишень для антипсихотической терапии, был выполнен скрининг потенциальных ингибиторов этого

связывания и выявлен ряд соединений, подавляющих взаимодействие NCS-1 с пептидом D2R, к которым относятся, в частности, алкалоиды метерголин, тетрандрин и резерпин [212].

1.5.2. Наркотическая зависимость

Существует ряд примеров возможного участия NCS-1 в механизмах, обуславливающих наркотическую зависимость, развитие которой связано с нарушениями дофаминергической сигнализации и проницаемости K^+ -каналов в некоторых отделах мозга [213-215]. Так, повышенная экспрессия NCS-1 в префронтальной коре у лабораторных животных ассоциирована с большей склонностью к героиновой зависимости [216]. В модели зависимости от морфина, экспрессия NCS-1 в миндалевидном теле мозга крысы значительно повышается при абстиненции [217]. Полиморфизм rs1054879 в некодирующей 3'-области гена NCS-1 значительно улучшает прогноз лечения от никотиновой зависимости у пациентов с определенным аллелем рецептора D2R [218]. Полиморфизмы rs1342043 и rs7849345 в первом интроне гена NCS-1 ассоциированы с кокаиновой зависимостью [219]. Поскольку вышеперечисленные мутации не соответствуют аминокислотным заменам в гене NCS-1 и не затрагивают известные сайты связывания транскрипционных факторов или регуляторных микро-PHK, механизм их действия пока не ясен.

1.5.3. Умственная отсталость, связанная с Х-хромосомой

NCS-1 связывается с внутриклеточным доменом белка IL1RAPL1, мутации в котором ассоциированы с наследственной формой умственной отсталости [220]. IL1RAPL1 представляет собой трансмембранный нейрональный белок, гомологичный рецептору интерлейкина-1 и Tollподобным рецепторам. IL1RAPL1 локализуется в синаптических окончаниях нейронов, где он связывается с гуанилаткиназой PSD-95 и принимает участие в регуляции механизмов синаптогенеза и синаптической пластичности [221]. Мутация в гене IL1RAPL1 ассоциирована с серьезными когнитивными нарушениями при отсутствии видимых дефектов развития мозга [222]. Было показано, что IL1RAPL1 совместно с NCS-1 участвует в регуляции потенциалзависимых Ca²⁺-каналов N-типа [149]. Примечательно, что мыши с отсутствием экспрессии IL1RAPL1 полностью жизнеспособны, однако отличаются аномалиями межнейрональных связей в мозжечке в процессе его развития [223]. Увеличение возбудимости определенных групп нейронов, смещение баланса между возбуждающими и тормозящими сигналами, а также избыточное разрастание нейритов, наблюдаемые при дисфункции IL1RAPL1, сложнейшей могут приводить к нарушениям клеточной архитектуры мозжечка, ассоциированным с расстройствами аутистического спектра И рядом других психоневрологических заболеваний [224].

1.5.4. Расстройства аутистического спектра

Расстройства аутистического спектра (РАС) – группа заболеваний, связанных с нарушениями развития нервной системы, которые выражаются в повторяющемся поведении и сниженной способности к коммуникации. Экспериментальные животные с фенотипом NCS-1^{-/-} проявляют нарушения социального поведения и когнитивной функции, сходные с теми, которые наблюдаются у пациентов с РАС [225]. NCS-1 также входит в число белков, мутации в генах которых ассоциированы с аутизмом [226]. Так, у одного из подобных пациентов была найдена замена R102Q в составе входящей α -спирали EF3 [227]. Эта мутация приводит к общей дестабилизации NCS-1 и значительным структурным перестройкам в его C-концевой области, а также к изменению динамики связывания белка с клеточными мембранами. Указанные факторы могут приводить к нарушению функции NCS-1 в клетке и лежать в основе дефектов Ca²⁺-сигнализации, связанных с PAC [228].

Еще одно заболевание в этой группе – синдром ломкой X-хромосомы (fragile X-chromosome syndrome, FXS) – связано с утратой РНК-связывающего белка FMRP, являющегося потенциальным регулятором целого ряда внутриклеточных сигнальных путей [229]. Показано, что у дрозофилы на фоне инактивации FMRP снижается экспрессия обоих генов фреквенина [230]. Поскольку одним из признаков FXS является нарушение структуры синаптических окончаний, комплекс между фреквенином-2 и Ric8a – двумя белками, задействованными в формировании синапсов у дрозофилы – был выбран в качестве терапевтической мишени для предотвращения аномального роста синапсов при этом заболевании [32, 231, 232]. Было отобрано несколько низкомолекулярных соединений, которые препятствуют взаимодействию фреквенина-2 с Ric8a: в частности, хлорпромазин и ряд его аналогов [233]. Одно из испытанных соединений успешно снижает число аномальных синаптических окончаний и восстанавливает когнитивную функцию у дрозофил в модели FXS [231]. Были также обнаружены соединения, стабилизирующие комплекс фреквенина с Ric8a: в частности, ацилгидразон [234]. Такие вещества, напротив, стимулируют рост синапсов в животных моделях нейродегенеративных заболеваний и могут рассматриваться как возможный подход к лечению расстройств, при которых функция NCS-1 подавлена (например, при болезни Альцгеймера).

1.5.5. Болезнь Паркинсона

Уровень экспрессии NCS-1 снижен у пациентов с болезнью Паркинсона – нейродегенеративным заболеванием, связанным с нарушением функции дофаминовых рецепторов и утратой синаптической пластичности в черной субстанции, а также гибелью пейсмекерных нейронов в этом отделе головного мозга [189]. Дофаминергические нейроны

черной субстанции характеризуются интенсивным метаболизмом и высоким содержанием Ca^{2+} , что делает их особенно уязвимыми к окислительному стрессу и токсичности, вызванной избытком Ca^{2+} [235]. Показано, что в пресинаптических окончаниях нейронов черной субстанции NCS-1 Ca^{2+} -зависимым образом регулирует D2A-ауторецепторы дофамина, активность которых нарушена при болезни Паркинсона [236]. Эта регуляция контролируется током Ca^{2+} через потенциалзависимые каналы L-типа Cav1.3, которые рассматриваются в качестве мишеней для лечения болезни Паркинсона [189, 237]. NCS-1 также связывается с митохондриальным белком Pink1, мутации в гене которого ассоциированы с наследственными формами болезни Паркинсона, однако физиологическая роль этого взаимодействия остается невыясненной [134].

Поскольку в выживших нейронах черной субстанции наблюдается, напротив, компенсаторное повышение экспрессии NCS-1, предполагается, что он может способствовать адаптации к избыточным уровням дофамина и/или ионов Ca^{2+} и способствовать их выживанию при этом заболевании, т.е. выполнять нейропротекторную функцию (Рис. 10В) [238]. Действительно, в модели болезни Паркинсона подавление экспрессии NCS-1 значительно снижает выживаемость клеток [189]. Фенотип NCS-1^{-/-} также характеризуется снижением экспрессии целого ряда белков: компонента комплекса I дыхательной цепи митохондрий ND1, митохондриальных белков-разобщителей UCP4 и UCP5, гликолитической енолазы ENO2, редокс-чувствительного шаперона и фактора транскрипции DJ-1 и Ca²⁺-каналов Cav2.3 [239]. Эти изменения могут быть частью механизма адаптации, направленного на снижение внутриклеточной концентрации Ca²⁺ и митохондриальной функции и защиту нейронов от источников стресса.

1.5.6. Воспалительные заболевания

Развитие воспалительного ответа ассоциировано со снижением экспрессии NCS-1 клетками. Так, в модели колита крысы резко, но обратимо снижается доля аксонов, содержащих NCS-1 [47]. Примечательно, что этот эффект не связан с гибелью NCS-1-положительных нейронов, а обусловлен именно низкой экспрессией белка. Впоследствии в выживших нервных клетках экспрессия NCS-1, напротив, повышается, чтобы компенсировать функцию утраченных нейронов. Экспрессия NCS-1, наряду с экспрессией потенциалзависимых K⁺-каналов и KChIP2, резко снижается на фоне воспаления в модели острого миокардита крысы [240]. Уровень NCS-1 в коре головного мозга снижается в моделях сепсиса и ишемии мозга [241, 242]. Снижение экспрессии NCS-1 в мозге развивается на фоне падения уровня нейронального фактора роста BDNF и повышения нейропротекторного фактора NGF, а также роста уровня воспалительных цитокинов и факторов апоптоза [241, 242]. При этом сам NCS-1 находится в числе белков, повышенная экспрессия которых в нервных окончаниях кожи ассоциирована с противовоспалительной активностью и предотвращением рубцевания [243].

1.5.7. Онкологические заболевания

Недавние исследования показали, что уровень NCS-1 значительно повышен в клетках опухоли по сравнению со здоровой тканью при раке молочной железы, карциноме печени и плоскоклеточной карциноме легких, что позволяет рассматривать этот белок в качестве маркера онкологических заболеваний [26, 244, 245]. Стимуляция экспрессии NCS-1 в раковых клетках повышает их подвижность и снижает адгезию – факторы, ассоциированные с метастазированием [26, 245, 246]. Как следствие, высокий уровень NCS-1 в опухоли ассоциирован с меньшей ожидаемой продолжительностью жизни у пациентов [247]. Экспрессия NCS-1 в клетках опухоли повышается в ответ на стресс, например, при воздействии провоспалительного фактора TNF α и ряда других NFкB-индуцирующих агентов [25]. NCS-1 также делает клетки более устойчивыми к действию противоракового препарата доксорубицина, вызывающего свободнорадикальное повреждение ДНК, но менее устойчивыми к лечению паклитакселом, который снижает подвижность раковых клеток за счет стабилизации их микротрубочек [245, 247]. Таким образом, можно говорить о вкладе NCS-1 в антиоксидантную и противовоспалительную защиту опухолевых клеток.

Непосредственные сигнальные партнеры, опосредующие метастатическую активность и другие свойства NCS-1 в злокачественных опухолях, остаются неизвестными. Функция NCS-1 в раковых клетках может быть связана с белком-регулятором полимеризации актина LIMK1, экспрессия которого в опухоли обычно повышена [244]. NCS-1 и LIMK1 колокализуются в клеточных отростках, где они могут принимать участие в цитоскелетных перестройках, обеспечивающих клеточную подвижность [246]. Еще одной мишенью NCS-1 в раковых клетках может являться Ca²⁺-канал ORAI1, ассоциированный с клеточной миграцией [248].

В отсутствие NCS-1 резко снижается жизнеспособность клеток рака молочной железы. Хотя исходно предполагалось, что NCS-1 защищает клетки опухоли за счет активации IP₃рецепторов, подавление экспрессии NCS-1 с помощью РНК-интерференции не влияет на высвобождение Ca²⁺ из ЭПР [247]. Однако в другой модели инактивация гена NCS-1 методом CRISPR/Cas9 ингибирует IP₃-зависимое высвобождение Ca²⁺ и снижает уровень фосфо-Akt [25]. Делеция NCS-1 также вызывает повышение базового уровня Ca²⁺ в клетках опухоли, что может служить причиной гибели клеток в результате Ca²⁺-индуцированной токсичности.

1.5.8. Побочные эффекты противораковой терапии

Как уже говорилось выше, летки опухолей с высоким содержанием NCS-1 обладают большей чувствительностью к терапии паклитакселом, т.е. повышение экспрессии этого белка может улучшать прогноз лечения [249]. В то же время, паклитаксел токсичен для периферической нервной системы, что серьезно ограничивает применяемость этого препарата [250]. Предполагается, что некоторые побочные эффекты паклитаксела в нейронах опосредованы именно его взаимодействием с NCS-1. Так, было обнаружено, что паклитаксел высокоаффинно связывается с NCS-1 (K_D=58 нМ), стабилизируя его комплекс с рецепторами IP₃ на поверхности ЭПР и вызывая спонтанные колебания внутриклеточного Ca²⁺ в нейронах, которые могут приводить к их чрезмерной возбудимости [251, 252]. Паклитаксел также индуцирует повышение экспрессии NCS-1 в зрелых кардиомиоцитах и стимулирует связывание белка с InsP₃R1, тем самым вызывая колебания Ca²⁺-токов в сердечной мышце, чем может провоцировать аритмию. Хотя in vitro паклитаксел скорее выступает в роли активатора NCS-1, при продолжительном воздействии этого препарата в ходе многочасовых сеансов химиотерапии вступают в силу его отложенные эффекты. Так, в клетках нейробластомы после 6-ти часов инкубации с паклитакселом наблюдается обратимое, но значительно снижение уровня NCS-1, вызванное кальпаинзависимой деградацией Ca²⁺-связанной формы белка [253]. Также паклитаксел способствует протеолизу в области первого (нефункционального) EF-hand мотива NCS-1, который приводит к удалению первых 36 а.о. белка вместе с N-концевой миристоильной группой. Это способствует общей дестабилизации белковой глобулы и драматическому (на ~2 порядка) снижению сродства NCS-1 к ионам Ca²⁺ [254]. Инактивация, а затем и деградация NCS-1, вызванная связыванием паклитаксела, может вызывать нарушения гомеостаза Ca²⁺ в раковых клетках, делая их более уязвимыми к воздействию препарата. Однако в нервной ткани эффект паклитаксела на функцию NCS-1 может провоцировать нарушения роста и жизнедеятельности нейронов, которые наблюдаются при невропатиях, вызванных побочным действием этого противоракового препарата [255].

Таким образом, предполагается, что токсичность паклитаксела для нейронов можно уменьшить, если защитить NCS-1 от протеолиза. Действительно, применение селективных ингибиторов кальпаина уже доказало свою эффективность для смягчения побочных эффектов противораковой терапии [255, 256]. В качестве альтернативного подхода может рассматриваться подавление нежелательной активации IP₃-рецепторов под действием NCS-1, которая, вероятно, и приводит к росту внутриклеточного Ca²⁺ и активации кальпаина. Действительно, премедикация ионами лития (присутствие Li⁺ снижает эффективность образования комплекса NCS-1 с InsP₃R1) предотвращает кальпаинзависимую деградацию NCS-1 и вызванные ей нарушения Ca²⁺-

сигнализации, не препятствуя при этом основной противоопухолевой активности паклитаксела, что значительно повышает выживаемость лабораторных животных в результате подобной терапии [153, 251, 257].

1.5.9. Другие заболевания

1.5.9.1. Болезнь Альцгеймера

Экспрессия NCS-1 в мозге значительно повышается при болезни Альцгеймера – нейродегенеративном заболевании со сложной этиологией, связанной, в том числе, с утратой связей между нейронами в результате формирования в нервной ткани бляшек из неправильно свернутого β-амилоидного белка [258]. На модели дрозофилы показано, что стабилизация комплекса фреквенина с белком Ric8a способствует частичному восстановлению моторной функции и числа синаптических окончаний, которые были утрачены в ходе патологических процессов, вызванных токсичным амилоидным пептидом Аβ42 [234]. Поскольку NCS-1 обладает доказанной нейропротекторной активностью, повышение его экспрессии при этом заболевании может быть важным компенсаторным изменением.

1.5.9.2. Диабет

Избыток NCS-1 компенсирует патологические изменения в клеточной модели синдрома Вольфрама. Это заболевание, связанное с врожденной утратой функции трансмембранного белка WFS1, характеризуется развитием диабета, глухоты и атрофии зрительного нерва [259]. Клетки поджелудочной железы с выключенной экспрессией WFS1 демонстрируют нарушения гомеостаза Ca²⁺, подавление функции митохондрий и гипергликемию [165]. При этом NCS-1 может обеспечивать выживание этих клеток за счет восстановления нормальной концентрации внутриклеточного Ca²⁺ и активации Akt-зависимого сигнального пути. Напротив, подавление экспрессии NCS-1 способствует развитию признаков диабета II типа у мышей: повышению массы тела, гипергликемии, гиперинсулинемии, снижению уровня гормона резистина в сыворотке крови и экспрессии инсулиновых рецепторов в мембранах адипоцитов [70].

1.5.9.3. Хроническая болезнь почек

В модели хронической болезни почек, подавление экспрессии одной из мишеней NCS-1, аполипопротеина APOL3, приводит к ослаблению связывания NCS-1 с PI4Kβ, снижению синтеза PI4P, реорганизации цитоскелета и деградации комплекса Гольджи в эпителиальных клетках почечных клубочков [132]. Полученный фенотип имитирует эффект природных мутаций в гене белка APOL1, ассоциированных с рядом почечных заболеваний.. Показано, что эти мутации

придают APOL1 способность конкурировать с NCS-1 за связывание с APOL3 и таким образом нарушают регуляторную функцию NCS-1 в этой ткани.

1.6. МОЛЕКУЛЯРНАЯ СТРУКТУРА И СВОЙСТВА NCS-1

Многообразие функций NCS-1 делает его уникальным среди белков НКС. Большинство представителей семейства регулируют строго определенную мишень или несколько близких по структуре мишеней (K⁺-каналов, гуанилатциклаз и т.д.) в своем узком диапазоне концентрации Ca²⁺. Описанная функциональная специфичность НКС является достаточно неожиданной с учетом того, что эти белки характеризуются выраженным сходством всех уровней структуры (Puc. 11). Например, остатки, отвечающие за узнавание мишеней и связывание ионов кальция являются консервативными внутри семейства. Как же достигается специфичность регуляторной активности НКС, благодаря которой несколько белков семейства могут одновременно выполнять не пересекающиеся функции в одном и том же клеточном компартменте? Основные различия в аминокислотных последовательностях НКС сосредоточены в N-концевой и С-концевой областях этих белков, а также в петле, соединяющей их третий и четвертый EF-hand мотивы. Можно предположить, что именно эти участки структуры участвуют в образовании уникальной для каждого НКС сети внутримолекулярных и межмолекулярных взаимодействий, которые определяют сродство к катионам, положение миристоильной группы, а также чувствительность к фосфолипидному составу клеточных мембран и узнавание мишеней.



Рис. 11. Общая структура белков семейства нейрональных кальциевых сенсоров. Сравнение структур белков из пяти основных подсемейств НКС: функциональные и нефункциональные EF-hand-мотивы изображены в виде блоков, схематично представлена вторичная структура гипервариабельных областей на N- и C-концах белков.

1.6.1. Общие представления о структуре белков НКС

1.6.1.1. EF-hand мотивы

Нейрональные кальциевые сенсоры (НКС) – небольшие (около 20 кДа) α-спиральные белки, содержащие четыре Ca²⁺-связывающих мотива типа EF-hand (EF1 - EF4). EF1 и EF2 вместе составляют N-концевой, а EF3 и EF4 – С-концевой домены НКС. Указанные домены соединены остаток глицина, обуславливает линкером, содержащим консервативный что ИХ конформационное вращение друг относительно друга. Как и в других Ca^{2+} -связывающих белках, каждый EF-hand мотив НКС состоит из двух α-спиралей и расположенной между ними петли (Рис. 12А). Ион кальция координируется атомами кислорода основной и боковой цепи остатков аспартата и глутамата в 1(x), 3(y), 5(z), 7(-y) и 12(-z) положениях петли, а также кислородом молекулы воды, ассоциированной с остатком в 9(-х) положении петли за счет водородных связей (Рис. 12В) [260]. В центре петли находится короткий β-тяж из 3 а.о.; в белках НКС эти тяжи являются единственными элементами β-структуры. При связывании иона кальция происходит смещение α-спиралей EF-hand мотива вокруг остатка глицина в 6-м положении петли, что переводит его в открытую конформацию (Рис. 12Б). Во всех НКС ЕГ1 не способен связывать Ca²⁺ из-за присутствия остатков лизина, цистеина и пролина в 1, 3 и 4 положениях петли, соответственно [261]. В случае рековерина и VILIP-1 неактивным также является EF4, а в случае белков KChIP – EF2.



Рис. 12. Строение Са²⁺-связывающего центра типа EF-hand. Пространственная организация EF-hand-мотива в (А) апо-форме и (Б) Са²⁺-содержащей форме. (В) Схема Са²⁺-связывающей петли EF-hand с указанием позиций аминокислотных остатков, участвующих в координации иона кальция.

1.6.1.2. Миристоильная группа

НКС родственны кальмодулину, но отличаются от него более компактной структурой и наличием на N-конце миристоильной группы. Миристоильная группа не только отвечает за связывание белков с клеточными мембранами, но и обладает рядом важных структурных функций. В некоторых НКС в отсутствие ионов Ca²⁺ миристоильная группа погружена внутрь молекулы белка, образуя многочисленные контакты с гидрофобной сердцевиной белковой глобулы [262-264]. В общем случае миристоильная группа играет роль своего рода шаперона для белков НКС: набор взаимодействующих с ней остатков и результирующая структура апо-формы белка являются уникальными в случае каждого представителя семейства.

1.6.1.3. Са²⁺-миристоильный переключатель

Часть белков НКС демонстрирует механизм, называемый Ca²⁺-миристоильным переключателем: при связывании Ca²⁺ молекула НКС претерпевает конформационные перестройки, в результате которых происходит экспонирование в раствор как миристоильной группы, так и а.о., исходно формирующих для нее гидрофобный карман в структуре белка. Наиболее подробно этот механизм изучен на примере фоторецепторного НКС рековерина [264-266]. В отсутствие Ca²⁺ миристоильная группа рековерина погружена в гидрофобный карман в N-домене белка (Рис. 13А). В результате координации первого иона Ca²⁺ в высокоаффинный EF3 белка происходит поворот его N- и C-доменов относительно друг друга вокруг остатка G96 (Рис. 13Б). Хотя миристоильная группа при этом остается внутри N-домена белка, ее окружение меняется, за счет чего в молекуле возникает напряжение. Нестабильность полученной промежуточной конформации рековерина облегчает связывание второго иона Ca²⁺ в более низкоаффинный EF2 и еще один поворот остова белка – на этот раз вокруг G42 (Рис. 13В). Миристоильная группа на гибкой «ножке» экспонируется в раствор, чтобы впоследствии обеспечить связывание белка с мембранами, в то время как консервативные остатки гидрофобного кармана, относящиеся к N-концевому домену белка, становятся доступными для связывания мишени рековерина – родопсинкиназы. Таким образом, Ca²⁺-миристоильный переключатель обеспечивает колокализацию и связывание рековерина с мишенью только в темноте, когда концентрация Ca²⁺ в фоторецепторах максимальна. Сходным образом функционируют белки группы VILIP: VILIP-1, нейрокальцин δ и гиппокальцин. При этом белки GCAP не обладают Ca^{2+} -миристоильным переключателем в том виде, в котором он есть у рековерина, а у всех белков KChIP кроме KChIP1 миристоильная группа вообще отсутствует. NCS-1/фреквенин занимает интересное промежуточное положение среди НКС: он обладает Са²⁺-миристоильного компонентами, необходимыми функционирования всеми для переключателя, однако некоторые уникальные элементы его структуры обеспечивают необычный, Са²⁺-независимый характер взаимодействия с мембранами.



Рис. 13. Механизм Ca²⁺-миристоильного переключателя на примере рековерина. (A) В апоформе рековерина миристоильная группа погружена внутрь N-домена (голубой) белковой глобулы (PDB 1IKU). (Б) При связывании Ca²⁺ в домен EF3 происходит поворот C-концевого домена (зеленый) вокруг остатка глицина-96 (красный), вследствие чего миристоильная группа и остатки гидрофобного кармана частично экспонируются в раствор (PDB 1LA3). Это облегчает связывание Ca²⁺ в EF2. (B) В Ca²⁺-заполненном рековерине миристоильная группа и гидрофобный карман полностью экспонированы (PDB 1JSA).

1.6.1.4. С-концевой сегмент

Все больше данных указывает на то, что функциональная специфичность НКС обеспечивается, в том числе, структурным и конформационным разнообразием так называемых С-концевых сегментов этих белков – участков последовательности после четвертого EF-hand мотива. Так, С-концевой сегмент NCS-1 (P177-V190) взаимодействует с остатками гидрофобного кармана в отсутствие белка-мишени, поддерживая конформационную стабильность молекулы [34]. В присутствии мишени (например, D2R) С-концевой сегмент NCS-1 смещается, открывая доступ к сайту связывания мишени [267]. Как и у NCS-1, С-концевой сегмент KChIP1 изменяет конформацию в присутствии мишени, K⁺-канала Kv4.3, за счет чего формируется уникальный интерфейс взаимодействия этих белков [268]. У рековерина С-концевой сегмент обладает жесткой структурой и прижат к поверхности С-концевого домена, стабилизируя Ca²⁺-связанный конформер белка и регулируя его Ca²⁺-чувствительность [269]. За счет такого расположения С-концевой сегмент рековерина обеспечивает специфичность сенсора в отношении его мишени,

родопсинкиназы, стабилизируя комплекс за счет катион- π взаимодействия с ответным участком фермента [270]. У GCAP1 С-концевой сегмент вовлечен в процесс активации фоторецепторной гуанилатциклазы, принимая участие в конформационной перестройке белка в ответ на связывание Ca²⁺ [271-273]. В свою очередь, С-концевой сегмент GCAP2 подвергается Ca²⁺-зависимому сигнальному фосфорилированию, что отражается на эффективности связывании белка с фоторецепторными мембранами и специфичности в отношении мишени [274]. Таким образом, при общем сходстве первичной структуры и пространственной организации НКС, благодаря вариативности С-концевых сегментов функция каждого белка семейства уникальна.

1.6.2. Структурные особенности NCS-1

1.6.2.1. Ca²⁺-связанная форма

Первой разрешенной трехмерной структурой NCS-1/фреквенина стала структура белка из *S. cerevisiae* (PDB 1FPW), определенная методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) [275]. Интересно, что, в отличие от рековерина, ЯМР-спектры NCS-1 слабо отличаются для немиристоилированной и миристоилированной форм белка [275, 276]. Это может говорить о том, что миристоильная группа фреквенина всегда экспонирована в раствор и слабо взаимодействует с белковой глобулой. Это предположение подтверждается результатами ЯМРанализа с использованием радиоактивно-меченного миристата, согласно которым спектры миристоильной группы в бескальциевой и Ca²⁺-связанной формах NCS-1 идентичны спектру свободной миристиновой кислоты в органическом растворителе [275].

Для NCS-1 позвоночных животных были получены кристаллические структуры Ca²⁺связанных форм немиристоилированного белка человека и крысы (PDB 1G8I и 5AEQ) [20, 33]. Несмотря на значительное сходство со структурами рековерина и нейрокальцина, главным отличием NCS-1 является наличие протяженного гидрофобного кармана, сформированного остатками как из N-концевого, так и из C-концевого доменов белка. Доступность дополнительного участка кармана обеспечивается уникальной структурой C-концевой α -спирали NCS-1, которая повернута на 45° по сравнению с соответствующим участком рековерина (Рис. 14A). В рековерине 10-ая α -спираль белка образует контакты с остатками EF3 и EF4 и таким образом прикрывает собой C-домен, оставляя доступным для связывания мишени только Nконцевую часть кармана [269].

Трехмерная структура немиристоилированного Ca²⁺-заполненного человеческого NCS-1 была разрешена также методом ЯМР-спектроскопии (PDB 2LCP) (Рис. 14Б) [34]. Согласно этой структуре, белок содержит 9 α -спиралей, 4 коротких β -тяжей (в составе Ca²⁺-связывающих сайтов EF-hand) и три неструктурированные петли (между EF1 и EF2, между EF3 и EF4 и после EF4). Отличительной особенностью этой структуры является полностью разрешенный С-

концевой сегмент NCS-1. Положение этого участка отличается от такового в кристаллической структуре NCS-1. В кристалле он представляет собой последнюю (10-ую) α -спираль белка, которая прижата к краю гидрофобного кармана, оставляя его полностью открытым. Следует учесть, однако, что, в связи с высокой гидрофобностью Ca²⁺-связанного NCS-1, для его стабилизации при получении кристаллов используют детергент, который заполняет гидрофобный карман белка и таким образом имитирует белок-мишень, потенциально вытесняя С-концевой сегмент из гидрофобного кармана [20]. В свою очередь, в ЯМР-структуре С-концевой сегмент является неструктурированным и образует множественные контакты с поверхностью открытого гидрофобного кармана на всем его протяжении [34]. За счет этого взаимодействия, С-концевой сегмент значительно стабилизирует Ca²⁺-связанную форму NCS-1. При удалении С-концевого сегмента NCS-1 приобретает менее компактную и более динамичную структуру, а также склонность к образованию димеров (PDB 4YRU) [33, 277]. Согласно молекулярно-динамическим моделям, удаление С-концевого сегмента модифицирует структуру белка примерно так же, как повышение температуры на 6 °C [278].

Добавим, что методом рентгеноструктурного анализа была разрешена также структура Ca²⁺-связанной формы фреквенина-2 дрозофилы (PDB 4BY5) (Puc. 14B), из которой видно, что в кристалле белок образует димеры, причем C-концевой сегмент одной молекулы погружен в N-концевую область гидрофобного кармана парной молекулы [32]. Хотя, по некоторым данным, NCS-1 позвоночных также способен к нековалентной димеризации *in vitro*, реальная структура и физиологическое значение этих димеров остаются неизученными [279].

1.6.2.2. Динамика Ca²⁺-связанной формы

В последнее время приобрел популярность ЯМР-анализ белковых структур в присутствии небольших концентраций денатурирующих агентов [280]. Он позволяет идентифицировать целый спектр возможных конформаций белка, более приближенных к возможному разнообразию структур, которые белок способен приобретать в растворе, по сравнению с более жесткой кристаллической структурой. Так, ЯМР-анализ в присутствии возрастающих концентрация гуанидингидрохорида демонстрирует высокую подвижность некоторых участков структуры Ca^{2+} -связанного NCS-1, а именно: аминокислотных остатков по краям элементов вторичной структуры белка, Ca^{2+} -связывающих петель и петель между EF-hand мотивами, а также остатков, принимающих участие в так называемых катион- π взаимодействиях (между ароматическими и положительно заряженными боковыми и/или остовными группами аминокислот) [281]. Моделирование молекулярной динамики NCS-1 на основе ЯМР-анализа также указывает на относительную лабильность структуры Ca^{2+} -связанной формы белка [282]. Вероятно, именно это

свойство обеспечивает взаимодействие NCS-1 с таким широким спектром регуляторных мишеней.

1.6.2.3. Бескальциевая форма

Единственная структура миристоилированной апо-формы НКС из подсемейства фреквенинов, разрешенная на сегодняшний день, это структура фреквенина из *S. pombe* (Рис. 14Г) [14]. Этот белок, по-видимому, единственный из всех ортологов NCS-1 обладает полностью функциональным Ca^{2+} -миристоильным переключателем: как и у рековерина, в отсутствие ионов Ca^{2+} его миристоильная группа погружена в гидрофобный карман белка. Бескальциевая форма фреквенина из *S. pombe* является более компактной и менее гидрофобной, чем Ca^{2+} -связанная, что позволило получить ее ЯМР-структуру относительно высокого качества (PDB 2L2E) [283]. Видно, что в отсутствие Ca^{2+} миристоильная группа фреквенина зафиксирована в С-концевом домене между EF3 и EF4, что отличает апо-форму фреквенина от апо-форм рековерина (миристоильная группа расположена в N-домене) и GCAP1 (миристоильная группа расположена между N- и C-доменом). Стоит отметить, что различия между аминокислотными последовательностями фреквенина *S. pombe* и других белков подсемейства слишком велики, чтобы основании этой структуры делать какие-либо выводы о структуре и функции бескальциевых форм других ортологов NCS-1/фреквенина.

1.6.2.4. Молекулярный фолдинг NCS-1

В отсутствие ионов кальция домены NCS-1 сворачиваются некооперативно [284]. Для окончательного сворачивания белка в компактную структуру требуются ионы магния: в их отсутствие сворачивается только С-концевой домен, в то время как N-концевой домен остается неструктурированным. В свою очередь, в присутствии Ca^{2+} фолдинг NCS-1 является кооперативным процессом [285]. В первую очередь, при связывании Ca^{2+} в EF3, частично сворачивается С-концевой домен, затем происходит связывание Ca^{2+} в EF4, и только когда С-домен полностью свернут, вокруг иона Ca^{2+} в EF2 сворачивается N-домен. Этой кооперативностью NCS-1 отличается от кальмодулина, у которого N- и C-домены могут сворачиваться независимо [286]. Из-за этого мутант NCS-1 D109A/E120Q с дисфункциональным EF3 не способен свернуться в нативную структуру, вследствие чего он широко используется в клеточных исследованиях как инактивированная форма NCS-1: хотя показано, что мутант сохраняет частичное сродство к Ca^{2+} , его структура в значительной степени нарушена [146, 158, 287, 288]. Стоит добавить, что неправильно свернутые конформации NCS-1 присутствуют и в препаратах белка дикого типа, причем их доля значительно возрастает в присутствии больших избытков Ca^{2+} (10 мМ) [289].



Рис. 14. Трехмерная структура NCS-1. (А) Кристаллическая структура Ca²⁺-связанных форм NCS-1 (PDB 5AEQ) и рековерина (PDB 4YI8). (Б) ЯМР-структура Ca²⁺-связанного NCS-1 (PDB 1LCP). (В) Кристаллическая структура нековалентного димера фреквенина-2 *Drosophila melanogaster* (PDB 4BY5). (Г) ЯМР-структура бескальциевой формы миристоилированного фреквенина из дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* (PDB 2L2E). Цветом выделены нефункциональный (розовый) и функциональные (красный) ЕF-hand мотивы, С-концевой сегмент (голубой) и миристоильная группа (черный). Ионы кальция представлены желтыми сферами.

1.6.3. Миристоилирование

NCS-1 подвергается ко-трансляционному миристоилированию под действием Nмиристоилтрансферазы-1. В клетке фреквенин/NCS-1 присутствует исключительно в миристоилированной форме, на что указывают данные масс-спектрометрического анализа [290]. Наличие миристоильной группы в значительной степени определяет структуру Ca²⁺-связанной формы белка, как демонстрируют эксперименты по равновесному разворачиванию молекулы NCS-1 [287]. Миристоильная группа также необходима для правильной внутриклеточной локализации и функциональной активности NCS-1. В отсутствие миристата NCS-1 утрачивает способность активировать PI4Kβ и ингибировать потенциалзависимые Ca²⁺-каналы N-типа, однако сохраняет некоторые другие функции: например, способность индуцировать кратковременную потенциацию в нейронах гиппокампа и осуществлять регуляцию термотаксиса у *C.elegans* [57, 85, 99, 148].

1.6.4. Связывание ионов металлов

1.6.4.1. Нефункциональный EF-hand мотив

NCS-1 характеризуется относительно высоким сродством к ионам кальция [291]. Как уже говорилось, белок содержит четыре EF-hand мотива, из которых три (EF2, EF3 и EF4) способны связывать Ca²⁺ [211]. EF1, как и у остальных представителей семейства HKC, является нефункциональным, но его способность координировать Ca²⁺ можно восстановить путем замены остатков K36, C38 и G47 на D, N и E, соответственно [211]. Вопреки ожиданиям, при восстановлении функции EF1, общая чувствительность белка к ионам кальция драматически снижается. Также нарушается активность NCS-1 в отношении PI4K β , причем негативный эффект менее выражен для немиристоилированной формы белка [292]. По-видимому, наблюдаемые модификации EF1 играют структурную роль и являются эволюционным приспособлением, связанным с появлением у белка N-концевой миристоильной группы.

1.6.4.2. Связывание Ca²⁺

NCS-1 способен связать до трех ионов кальция [20, 293]. Миристоилирование NCS-1 увеличивает его Ca²⁺-чувствительность, а также делает связывание катиона кооперативным [117, 288, 293]. Методом изотермической калориметрии титрования (ИКТ) были определены константы, характеризующие связывание Ca²⁺ с разными EF-hand мотивами белка [288]. Так, миристоилированный NCS-1 последовательно связывает три иона Ca²⁺ с K_D, равными 60 мкМ, 53 нМ и 377 нМ, причем коэффициент Хилла для первых двух сайтов составляет 1,95, что говорит о высокой кооперативности связывания. Позже методом спектроскопии ЯМР был также установлен следующий порядок заполнения сайтов в миристоилированном NCS-1: EF2→EF3→EF4, причем EF2 обладает наименьшим, а EF3 – наибольшим сродством к Ca²⁺ [293]. Связывание Ca²⁺ в низкоаффинном сайте является эндотермическим, а в двух остальных – экзотермическим процессом.

Координация Ca²⁺ вызывает последовательные конформационные изменения в NCS-1, которые связаны с изменениями положения его остатков триптофана, поскольку сопровождаются изменениями триптофановой флуоресценции белка. Так, при титровании белка ионами кальция происходит повышение интенсивности флуоресценции с пиком при 300 нМ Ca²⁺, которая при более высоких концентрациях катиона возвращается к исходному уровню, или даже несколько снижается (>1 мкМ) [117, 288]. При связывании Ca²⁺ с NCS-1/фреквенином также наблюдается длинноволновый сдвиг максимума длины волны эмиссии собственной флуоресценции белка (λ_{max}) примерно на 4 нм [117, 275]. По данным спектроскопии кругового дихроизма, в присутствии Ca²⁺ в NCS-1 возрастает доля α-спиралей [288]. Наконец, связывание Ca²⁺ значительно повышает поверхностную гидрофобность NCS-1, что свидетельствует об

экспонировании остатков гидрофобного кармана белка, по всей видимости, участвующих в связывании его регуляторных мишеней [291, 294].

1.6.4.3. Связывание Mg^{2+}

NCS-1 обладает сравнительно высоким сродством к ионам Mg^{2+} : миристоилированный NCS-1 некооперативно связывает два иона Mg^{2+} со средней константой 17 мкМ [291]. В присутствии физиологических концентраций Mg^{2+} (порядка 0,9 мМ) сродство белка к Ca^{2+} несколько снижается: если для апо-формы белка K_d по Ca^{2+} может достигать 90 нМ (примерно соответствует уровню катиона в нейронах в состоянии покоя), то для Mg^{2+} -связанной формы K_d составляет 440 нМ [295]. По данным пламенной спектрометрии, в присутствии стократного избытка Mg^{2+} по отношению к Ca^{2+} молекула NCS-1 содержит только ионы Ca^{2+} , что указывает на конкуренцию между катионами за одни и те же сайты связывания. Группой Y. Sharma было установлено, что ионы Mg^{2+} связываются в EF2 и EF3, а EF4 является исключительно Ca^{2+} связывающим сайтом [291]. В то время как ионы Ca^{2+} значительно стабилизируют NCS-1, обеспечивают восстановление его структуры после воздействия денатурирующих агентов и защищают белок от трипсинового протеолиза, ионы Mg^{2+} лишь частично стабилизируют апоформу и снижают ее поверхностную гидрофобность [287, 291, 294].

Полученные константы связывания катионов согласуются с предполагаемой регуляторной функцией NCS-1 в синаптических окончаниях нейронов, для которых характерны изменения уровня внутриклеточного Ca²⁺ в субмикромолярном диапазоне. К_D порядка 300-400 нМ позволит NCS-1 быстро реагировать на небольшие локальные изменения концентрации этого катиона, в условиях, когда другие Ca²⁺-сенсоры (кальмодулин, рековерин, VILIP-1) неактивны.

1.6.4.4. Связывание ионов других металлов

NCS-1 связывает ионы лития (K_D =0,54 мМ), которые широко используются для лечения психоневрологических заболеваний. Это связывание с одной стороны, защищает NCS-1 от кальпаин-зависимого протеолиза, а с другой стороны, подавляет его способность активировать IP₃-рецепторы [153, 251]. Примечательно, что Li⁺ обычно конкурирует с Mg²⁺ за связывание в одни и те же сайты в белках, однако взаимодействие NCS-1 с InsP₃R1 характерно для его Ca²⁺связанной формы, и механизм, лежащий в основе выявленного эффекта Li⁺, остается неясным [296]. Возможно, ингибиторное действие Li⁺ связано с изменением сродства NCS-1 к Ca²⁺. Как и другие EF-hand белки, NCS-1 рассматривается как возможная мишень Pb²⁺-индуцированной нейротоксичности, поскольку известно, что одним из механизмов патологического действия Pb²⁺ является замещение им ионов кальция в Ca²⁺-связывающих центрах сигнальных белков [297]. Наконец, по аналогии с рековерином NCS-1 является потенциальным Zn²⁺-связывающим белком [298].

1.6.5. Взаимодействие с белками-мишенями

1.6.5.1. Фосфатидилинозитол-4-киназы

По данным ИКТ, дрожжевой фреквенин Ca²⁺-независимым образом связывает N-концевой участок Pik1 в соотношении 1:1 с К_D≈140 нМ [290]. По-видимому, непосредственный участок связывания фреквенина в структуре Pik1 расположен внутри последовательности 121-174 полипептидной цепи фермента. Образование комплекса является энтропийно-зависимым, что может говорить о гидрофобной природе взаимодействия. Связывание фермента значительно стабилизирует мономер фреквенина и уменьшает гетерогенность его структуры. Впоследствии была разрешена ЯМР-структура комплекса фреквенина с фрагментом 121-174 Pik1 (PDB 2JU0), что позволило получить первые представления о механизме связывания мишеней этим белком (Рис. 15А) [299]. Оказалось, что при взаимодействии с Pik1 С-концевой сегмент фреквенина смещается, высвобождая остатки гидрофобного кармана, которые, в свою очередь, образуют контакты с одной из α-спиралей фермента. Две гидрофобные α-спирали Pik1 (125-136 и 156-169), соединенные разупорядоченным U-подобным участком, связываются в антипараллельной ориентации: N-концевой участок фрагмента Pik1 связывается в C-концевом домене NCS-1, а Cконцевой участок – в N-концевом домене NCS-1. Такой характер связывания фермента может служить объяснением механизму его активации: при взаимодействии с фреквенином, полипептидная цепь Pik1 изгибается таким образом, что ее регуляторный домен LKU на N-конце молекулы сближается с киназным доменом на ее С-конце и, по-видимому, активирует последний. NCS-1 взаимодействует с Pik1 по тому же механизму, что и его дрожжевой ортолог, связывая фермент с К_D≈150 нМ [17].

1.6.5.2. Рецептор дофамина D2R

В присутствии Ca²⁺ NCS-1 связывает С-концевой участок рецептора D2 (430-444) в соотношении 1:2 с K_D, равной 14 мкМ (по другим данным 40 мкМ) [33, 267]. То, что NCS-1 взаимодействует с двумя одинаковыми пептидами D2R, подтверждается данными ЯМР и рентгеноструктурного анализа (PDB 5AER) (Puc. 15Б) [33, 267]. Одновременное связывание двух молекул D2R может иметь физиологический смысл, поскольку эти рецепторы, как правило, функционируют в виде димеров. Одна α -спираль связывается в N-концевом домене NCS-1, а вторая – в C-концевом домене, при этом пептиды D2R ориентированы своими C-концами навстречу друг другу. Наиболее выраженные перестройки при связывании D2R происходят в области петли между EF3 и EF4 NCS-1, которая, как и C-концевой сегмент, отличается вариабельностью среди белков семейства и, таким образом, может отвечать за формирование уникальных сайтов связывания белков-партнеров.



Рис. 15. Структуры комплексов NCS-1 с белками-мишенями. (А) Комплекс фреквенина-2 из Saccharomyces cerevisiae с фосфатидилинозитол-4-киназой Pik1 (PDB 2JU0). (Б) Комплекс NCS-1 с двумя фрагментами 430-444 рецептора дофамина D2R (PDB 5AER). (В) Комплексы NCS-1 (DPB 5AFP) и рековерина (PDB 2I94) с фрагментом 1-25 родопсинкиназы (GRK1). Цветом выделены остатки гидрофобного кармана, образующие интерфейс связывания мишени (зеленый), и С-концевой сегмент (синий). Подписаны остатки мишени и С-концевого сегмента NCS-1, участвующие в стабилизации комплексов. (Г) Выравнивание аминокислотных последовательностей NCS-1 и рековерина: цветом выделены остатки гидрофобного кармана (зеленый), и С-концевого сегмента (синий), формирующие сайт связывания мишени.

1.6.5.3. Родопсинкиназа

В настоящей работе нами было впервые показано, что NCS-1 взаимодействует с тем же участком родопсинкиназы, что и рековерин (см. далее, раздел 3.1.5.2;), который по данным ЯМРспектроскопии за счет гидрофобного сайта в N-концевом домене связывает амфипатическую αспираль 1-25 фермента (PDB 2I94) [300, 301]. В период выполнения настоящей работы, группой R. Burgoyne была разрешена кристаллическая структура комплекса NCS-1 с тем же фрагментом родопсинкиназы (PDB 5AFP) (Puc. 15B) [33]. Положение пептида родопсинкиназы в молекуле NCS-1 заметно отличается от его положения в молекуле рековерина и в большей степени напоминает положение Kv4.3 в молекуле KChIP1 (PDB 2I2R): пептид располагается в глубине гидрофобного кармана белка между его N- и C-концевыми доменами [302].

1.6.5.4. Ric8a

Белок Ric8a уникален среди мишеней NCS-1/фреквенина, поскольку связывается только с его бескальциевой формой [32]. Известно, что в связывании участвует остаток R94, который расположен в петле между N- и C-концевыми доменами белка и является общим для фреквенина-2 дрозофилы и NCS-1, но отсутствует у фреквенина-1. Поскольку трехмерная структура апоформы фреквенина/NCS-1 не разрешена, механизм связывания Ric8a остается невыясненным. Известно, что взаимодействие между указанными белками эффективно разрушается при добавлении антипсихотических препаратов фенотиазинов, которые образуют контакты одновременно с остатками гидрофобного кармана и C-концевого сегмента NCS-1, и таким образом, вероятно, заякоривают последний в гидрофобном кармане, препятствуя связыванию мишени (PDB 5AAN, 6EPA) [231, 233]. Косвенно полученные данные могут указывать на то, что связывание бескальциевого NCS-1 с Ric8a происходит в гидрофобном кармане, т.е. в том же самом гидрофобном сайте, отвечающем за узнавание мишеней Ca^{2+} -заполненной формой белка. С этим предположением согласуется тот факт, что низкомолекулярные соединения, которые вытесняют C-концевой сегмент из гидрофобного кармана, напротив, способствуют укреплению взаимодействия между NCS-1 и его мишенью (PDB 6QI4) [234].

1.6.5.5. InsP₃R1

NCS-1 Ca²⁺-зависимым образом связывает супрессорный домен рецептора InsP₃R1, включающий в себя остатки 1-225 [303]. Методом молекулярного докинга предсказано, что NCS-1 образует контакты с остатками фрагмента 66-110 этого домена InsP₃R1. Соответствующий пептид действительно конкурирует с полноразмерным рецептором за связывание с NCS-1 и за счет этого подавляет агонист-индуцированный подъем внутриклеточного Ca²⁺ в клеточной модели. Ключевую роль в образовании описанного комплекса играет остаток L89, входящий в состав гидрофобного кармана NCS-1 и принимающий участие в связывании других его мишеней, таких как D2R и родопсинкиназа [301]. Так, замена L89 NCS-1 на остаток лизина или аланина в клеточной модели приводит к подавлению IP₃-ависимой Ca²⁺-сигнализации в клетках и общему снижению их жизнеспособности [303].

1.6.5.6. IL1RAPL1

Уникальным для NCS-1 является механизм его Ca²⁺-независимого взаимодействия с IL1RAPL1, в котором не задействованы остатки гидрофобного кармана. Показано, что внутриклеточный домен IL1RAPL1 (549-644) связывается непосредственно с C-концевым сегментом NCS-1 [220].

1.6.5.7. Роль С-концевого сегмента NCS-1 в связывании с мишенями

На основании структурного анализа комплексов NCS-1 с большинством сигнальных партнеров можно заключить, что С-концевой сегмент белка регулирует доступность консервативных остатков гидрофобного кармана NCS-1 для связывания белка-мишени. Так, при взаимодействии с D2R C-концевой сегмент NCS-1 принимает вторичную структуру, состоящую из двух коротких α-спиралей (177-180 и 184-188), соединенных U-образной петлей. Именно эта структура образует контакты как с гидрофобным карманом NCS-1, так и с белком-мишенью, как бы зажимая последний в тисках между краем гидрофобного кармана и собой. В случае комплексов NCS-1 с родопсинкиназой или Pik1, C-концевой сегмент смещается, утрачивая значительную часть контактов с остальной молекулой (в комплексе с Pik1 он также утрачивает структуру и поэтому полностью не разрешен). Это позволяет, например, фрагменту D2R. Таким образом, гибкий и подвижный C-концевой сегмент NCS-1 формирует уникальный сайт связывания в молекуле белка для каждой из его мишеней.

С помощью молекулярного моделирования в структуре NCS-1 было выявлено наличие системы ионных взаимодействий между остатками С-концевого сегмента и остальным белком [304]. Мутация R102Q, ассоциированная с аутизмом, приводит к перестройке этой системы и утрате С-концевым сегментом белка его характерной гибкости [282]. Интересно, что замена не сказывается на взаимодействии NCS-1 с IL1RAPL1, который связывается непосредственно с С-концевым сегментом без участия остатков гидрофобного кармана [227]. Можно предположить, что мутация затрудняет погружение С-концевого сегмента в гидрофобный карман и стабилизирует последний в открытом положении, потенциально снижая специфичность регуляторной активности NCS-1. Действительно, эффективность связывания D2R на фоне замены R102Q увеличивается примерно в 2 раза [267]. Дисрегуляция D2R под действием NCS-1 может играть роль в патогенезе аутизма [305].

Роль С-концевого сегмента в качестве внутреннего ингибитора NCS-1 подтверждается рядом исследований: если добавить к белку пептид, имитирующий С-концевой сегмент, в достаточно высокой концентрации, он блокирует функциональную активность NCS-1, конкурируя за взаимодействие с его мишенями. Так, добавление избытка С-концевого пептида в

синапсы экспериментальных животных полностью нейтрализует способность NCS-1 активировать синаптическую передачу [75]. Кроме того, хотя у большинства фреквенинов С-концевой сегмент отличается по своей последовательности от С-концевого сегмента NCS-1, он обладает аналогичной функцией, поскольку С-концевой пептид фреквенина блокирует его активность, связанную с регуляцией Ca²⁺-каналов [28, 96, 97].

Как уже говорилось, в отличие от остатков гидрофобного кармана, С-концевой сегмент NCS-1 уникален среди белков НКС. Вследствие этого, он представляет собой перспективную мишень для разработки лекарственных препаратов, направленных на подавление избыточной функции NCS-1 и не затрагивающих при этом другие белки семейства. Подход к поиску низкомолекулярных соединений, регулирующих подвижность С-концевого сегмента фреквенина/NCS-1, уже доказал свою эффективность в моделях синдрома хрупкой Х-хромосомы и болезни Альцгеймера [231, 234].

1.6.6. Связывание с мембранами

1.6.6.1. Са²⁺-зависимость мембранной ассоциации

Практически во всех типах тканей, где был обнаружен NCS-1, он локализуется в примембранном слое [39, 53]. Связывание с клеточными мембранами играет важнейшую роль в функциональной активности белков НКС, поскольку позволяет им компартментализоваться с белками-мишенями. В отличие от рековерина и ряда других НКС, NCS-1 обладает высоким сродством к мембранам не только в присутствии, но и в отсутствие ионов Ca^{2+} . Так, при фракционировании мозгового вещества надпочечников в присутствии хелатора Ca^{2+} NCS-1 выявляется как в цитоплазматической, так и в микросомальной (в основном содержащей мембраны ЭПР) фракциях [54]. Тем не менее, мембранная локализация NCS-1/фреквенина в клетке обладает слабой, но достоверной чувствительностью к изменениям концентрации внутриклеточного Ca^{2+} . Так, в нейроэндокринных клетках открытие Ca^{2+} -каналов в ответ на стимуляцию пуринергических рецепторов способствует повышению доли мембранной формы NCS-1 с 75% до 90% [63].

Сведения о Ca^{2+} -чувствительности связывания NCS-1 с очищенными клеточными мембранами противоречивы: в одной работе NCS-1 не демонстрирует Ca^{2+} -зависимости при связывании с мембранами из мозга крысы, в другой – Ca^{2+} -зависимо связывается с гиппокампальными мембранами быка [35, 117]. Показано, что фреквенин *S. cerevisiae* преимущественно ассоциирован с мембранами, но при хелатировании Ca^{2+} часть белка переходит в растворимую фракцию [275]. Эта тенденция еще более выражена в отсутствие у белка миристоильной группы. Наконец, фреквенин из *S. pombe* демонстрирует полностью

обратимое Ca²⁺-зависимое связывание с мембранами по механизму Ca²⁺-миристоильного переключателя, аналогично рековерину [14].

1.6.6.2. Динамика связывания с мембранами

Реальная динамика связывания NCS-1 с мембранами была охарактеризована методом FRAP (fluorescence recovery after photobleaching, восстановление флуоресценции после выцветания), в рамках которого осуществляется мониторинг обмена молекул NCS-1, содержащих флуоресцентную метку, между клеточной мембраной и цитоплазмой [227]. Было показано, что в низком Ca^{2+} после обесцвечивания с помощью лазера небольшой популяции молекул NCS-1 на мембране, флуоресценция в этой области постепенно восстанавливается за счет диссоциации обесцвеченных молекул и их замены на новые молекулы NCS-1, содержащие активную метку. В то же время, при повышении уровня внутриклеточного Ca^{2+} этот обмен прекращается. Таким образом, был сделан вывод, что в отсутствие Ca^{2+} мембранная и растворимая формы NCS-1 находятся в динамическом равновесии, а в присутствии Ca^{2+} равновесие смещается Ca^{2+} -зависимость нарушается при внесении замены R102Q, ассоциированной с аутизмом: наличие мутации приводит к "замораживанию" бескальциевой формы белка на мембране.

1.6.6.3. Механизм связывания с мембранами

Отсутствие функционального Ca²⁺-миристоильного переключателя у NCS-1 и, как следствие, лишь частичная обратимость его взаимодействия с клеточными мембранами, по всей видимости, обеспечивается уникальными элементами его структуры, отсутствующими у других НКС. Например, такую роль может играть N-концевая α-спираль белка между сигналом миристоилирования и первым EF-hand мотивом (14EELTRK19). Так, если внести эту Са²⁺-миристоильным переключателем последовательность В НКС с классическим (гиппокальцин), он приобретает способность связываться с мембранами в отсутствие Ca²⁺, подобно NCS-1 [306]. В свою очередь, обратная замена препятствует экспонированию миристоильной группы вне зависимости от условий. R. Burgoyne и соавторами было высказано предположение, что жесткая структура этой α-спирали, стабилизированная водородными связями между боковыми группами остатков E14-R18 и E15-K19, фиксирует N-конец NCS-1 и его миристоильную группу в экспонированном положении. Однако этот участок не является консервативным среди фреквенинов, которые демонстрируют такой же механизм связывания с мембранами, как и NCS-1. Вероятно, в связывании NCS-1 с мембранами могут быть задействованы и другие элементы структуры белка.

1.6.6.4. Фосфолипидная специфичность

Белки НКС обладают предпочтительной локализацией на различных внутриклеточных мембранах. Например, NCS-1, гиппокальцин и нейрокальцин-б связываются с плазматической мембраной и мембранами транс-Гольджи, а KChIP1 точечно локализуется на поверхности транспортных пузырьков [307, 308]. Различия во внутриклеточной компартментализация белков НКС могут определяться их чувствительностью к липидному составу мембран, регулируемой с помощью специальных аминокислотных остатков, локализованных на N-конце этих белков вокруг миристоильной группы. Действительно, по данным спектроскопии ЯМР у рековерина положительно заряженные остатки вблизи сигнала миристоилирования образуют контакты с отрицательной заряженной поверхностью мембраны [309]. При замене в гиппокальцине осно́вных остатков в положениях 3, 7 и 9 (общих для гиппокальцина и NCS-1) на соответствующие остатки KChIP1, гиппокальцин приобретает точечную локализацию, характерную для KChIP1. Аналогичным образом, при замене соответствующих остатков KChIP1 на остатки гиппокальцина, KChIP1 приобретает способность связываться с транс-Гольджи, что изначально характерно для гиппокальцина. Именно распределение зарядов на N-конце, по всей видимости, придает белкам НКС сродство к определенным фосфолипидам. Так, миристоилированный N-концевой фрагмент гиппокальцина (2-14) эффективно связывается с иммобилизованным фосфатидилинозитолом и всеми фосфоинозитидами [310]. При этом наибольшее сродство среди последних гиппокальцин демонстрирует к PI(4,5)P₂, что подтверждают эксперименты с использованием селективных внутриклеточных биосенсоров. В случае NCS-1 N-концевой участок белка гомологичен таковому у гиппокальцина и оба НКС обладают схожей внутриклеточной локализацией. На основании этого предполагается, что PI(4,5)P2 может быть их общей мембранной мишенью. В то же время, по имеющимся данным, миристоилированный NCS-1 демонстрирует Ca²⁺-зависимое сродство к PI4P, а также фосфатидилсерину (PS) (K_D=12 мкМ), с которым гиппокальцин не взаимодействует [288, 311]. Последнее ставит под вопрос существующее мнение об общности механизмов мембранной локализации этих белков, которые, таким образом, требуют дальшейшего изучения.

1.6.6.5. Взаимодействие с мембранными рафт-структурами

Многие белки-участники синаптической передачи (в частности, белки комплекса SNARE и Ca²⁺-каналы Cav2.1) входят в состав устойчивых к действию детергентов мембранных микродоменов, обогащенных холестерином (так называемые, мембранные рафт-структуры) [312]. Подобная организация обеспечивает колокализацию регуляторных белков и их мишеней и быстрый ответ на локальные сигналы Ca²⁺. Было показано, что в при стимуляции брадикинином нейроэндокринных клеток NCS-1 в них переходит в мембранные микродомены, обогащенные

холестерином и PI(4,5)P₂ [313]. Примечательно, что NCS-1 и белки SNARE все жеприсутствуют в разных микродоменах. Это согласуется с тем, что NCS-1, судя по всему, не является прямым регулятором компонентов экзоцитоза, а управляет этим процессом опосредованно, за счет модуляции гомеостаза Ca^{2+} в синаптических окончаниях [117].

1.6.7. Редокс-чувствительность

Как уже говорилось, NCS-1, по-видимому, способен обеспечивать выживаемость клеток в условиях окислительного стресса. В связи с этим, особый интерес представляет изучение редоксчувствительности NCS-1, в частности, определение того, как может меняться его структура и функция в окисляющих условиях клеточной среды. Действительно, некоторые HKC, такие как VILIP-1 и рековерин, являются редокс-чувствительными белками, причем в случае рековерина это свойство обеспечивается за счет консервативного среди HKC остатка цистеина в составе первого, нефункционального EF-hand мотива белка [314-316]. Ранние работы, посвященные исследованию структурно-функциональных свойств рекомбинантного немиристоилированного NCS-1, показали, что сульфгидрильная группа указанного остатка способна изменять поверхностную доступность при связывании белком физиологических катионов (Mg^{2+} или Ca^{2+}), что может указывать на ее возможное участие в механизмах редокс-регуляции [294].
II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. МАТЕРИАЛЫ И РЕАКТИВЫ

В работе были использованы следующие реактивы и материалы. Реактивы для молекулярной биологии: набор для экстракции ДНК из агарозного геля QIAquick Gel Extraction, набор для выделения PHK RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия); набор для обратной транскрипции Mint RACE, набор Encyclo ПЦР, Тад-полимераза, набор дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, буферный раствор для ПЦР, рибонуклеаза А, набор для выделения плазмидной ДНК Plasmid MiniPrep (Евроген, Россия); ДНК-лигаза фага Т4, эндонуклеазы рестрикции HindIII, NdeI, NcoI, BamHI, Sall, соответствующие буферные растворы, набор ДНК-маркеров GeneRuler DNA Ladder 1 kb (Fermentas, США). Штаммы E.coli: XL1 blue, генотип recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZAM15 Tn10 (Tetr)], BL21 (DE3) CodonPlus-RP, генотип F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) argU proL (Stratagene, США). Реактивы для бактериальной экспрессии белков: дрожжевой экстракт (Amresco, США); агар (USB, США); триптон (Диа-Эм, Россия); миристиновая кислота (Sigma-Aldrich, США), изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (ИПТГ), лизоцим яичного белка (Хеликон, Россия). Антибиотики: ампициллин («Синтез», Россия); тетрациклин (AppliChem, Германия); пенициллин; стрептомицин (Thermo Fisher, США). Компоненты буферных растворов: трис(гидроксиметил)аминометан (Tris), 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота) (HEPES), фосфатно-солевой буфер (PBS), глицин, NaH₂PO₄, CH₃COONa (Amresco). Хелаторы: N,N,N',N'-этилендиаминтетрауксусной кислоты динатриевая соль (ЭДТА), этиленгликоль-бис(β-аминоэтиловый эфир)-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты тетранатриевая (ЭГТА). соль 1,2-бис(о-амино-5-бромфенокси)этан-N,N,N'N'-тетрауксусной кислоты Хроматографические носители: тетракалиевая соль (BAPTABr₂). глутатионсефароза, бутилсефароза, фенилсефароза, NiNTA-сефароза, DEAE-сефароза, гепаринсефароза, BrCNсефароза, готовые колонки: HiTrap Mono-Q FF 5 мл, GSTrap FF 5 ml, Sephadex G25, Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare, CША), C18 Symmetry размером 3.9 мм х 150 мм (Waters, CША). Расходные материалы для диализа и концентрирования белков: диализные мешки ServaPor VISKING с диаметром пор 12-14 кДа (Serva, Германия); устройства для ультрафильтрации Amnicon Ultra 3К на 0,5 мл; устройства для ультрафильтрации iCon, диализные кассеты Slide-A-Lyzer (Millipore, США). Реактивы и расходные материалы для электрофореза в полиакриламидном геле и иммуноблоттинга: N,N,N',N'-тетраметил-этилендиамин (ТЕМЕД), додецилсульфат натрия (ДСН), акриламид, N`,N`-метилен-бис-акриламид, бромфеноловый синий, Кумасси синий R250, β-меркаптоэтанол, диаминобензидин (Sigma-Aldrich), набор маркеров молекулярной массы белков PageRuler (10-170 кДа) (Pierce, США); нитроцеллюлозные мембраны Hybond-C Extra, реагент для блокировки неспецифических взаимодействий

(Amersham, Великобритания), антитела против константной части иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (Santa Cruz Biotechnology, США), флуоресцеином или Alexa Fluor 555; набор для дот-блоттинга с иммобилизованными фосфолипидами PIPStrip (Thermo Fisher); набор для хемилюминисцентной детекции ECL (Bio-Rad, CША). Ферменты: рекомбинантная очищенная родопсинкиназа (Thermo Fisher), глицеральдегид-3фосфатдегидрогеназа из мышц кролика (Sigma-Aldrich), (Promega, трипсин CIIIA). мозга (ФС), яичный Фосфолипиды: фосфатидилсерин ИЗ фосфатидилхолин (ФХ), димиристоилфосфатидилэтаноламин (ФЭ) и фосфатидилинозитол из мозга (ФИ) (Sigma-Aldrich). Реактивы и расходные материалы для клеточной работы: DMEM, эмбриональная телячья сыворотка, хлорохин, иономицин, ауранофин, MG132, NP-40 (Sigma-Aldrich), RPMI-1640 (Gibco, США), культуральный пластик (ПанЭко, Россия). Реактивы и расходные материалы для гистологических исследований: заливочная среда Mowiol (Calbiochem, CША), заливочные блоки, наборы для парафинизации, гематоксилин, эозин (Биовитрум, Россия), стекла Menzel-Glaser (Thermo Fisher). Другие реактивы: персульфат аммония, хлорид натрия, гидроксиды натрия и калия, ацетаты натрия и калия, гидрокарбонат аммония, хлорид магния гексагидрат, мочевина, полиоксиэтилен(20)сорбитанмонолаурат (Tween 20), Triton-X-100, D-глюкоза, сахароза, фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ), диметилсульфоксид (ДМСО), перекись водорода, минеральное масло, хлорид кальция дигидрат, бычий сывороточный альбумин (БСА), бромистый этидий, бензамидина гидрохлорид, аденозинтрифосфат $(AT\Phi)$ И гуаниозинтрифосфат (ГТФ), 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота) (ДТНБ), глутатион восстановленный (Диа-Эм, Россия); агароза легкоплавкая, глицерин (Panreac, США); трихлоруксусная кислота (ТХУ), кислота соляная, ксилол, изопропанол, этанол (Мосреактив, Россия). [у-³²P]АТФ и пептид D2R N430-R443 (получен методом твердотельного синтеза Fmoc/But) были предоставлены Институтом биоорганической химии РАН.

2.2. ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ

2.2.1. Получение генетических конструкций для экспрессии белков

2.2.1.1. Получение гена NCS-1

Замороженные образцы коры головного мозга и сетчатки быка (*B. taurus*) и кролика (*O. cuniculus*) измельчали путем растирания в жидком азоте. Из полученных препаратов с помощью набора RNeasy MiniKit (Qiagen) выделяли тотальную мРНК. Поскольку 5'-концевые последовательности генов NCS-1 обоих организмов на момент начала работы были неизвестны, а также для поиска потенциальных изоформ NCS-1, получение их полноразмерных кДНК проводили методом RACE (rapid amplification of cDNA ends, метод быстрой амплификации концевых фрагментов кДНК) с использованием набора Mint RACE (Евроген) [317]. Так, для

обратной транскрипции использовали ревертазу Mint, которая синтезирует на 5'-конце кДНК адаптерную последовательность. Затем для амплификации полученных кДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали набор праймеров, комплементарных этой адаптерной последовательности, а также специфичный обратный праймер на известную 3'-концевую последовательность гена NCS-1:

NCS-1(M): 5'-GGGAAGCTTATACCAGCCCGTCGTAGAGGG-3'

После электрофореза в агарозном геле полученные ПЦР-фрагменты длиной около 600 п.о. выделяли из геля с помощью набора Cleanup Standard (Евроген) и определяли их нуклеотидную последовательность путем автоматического секвенирования. В результате был выполнен дизайн прямого праймера на разрешенную таким образом 5'-концевую последовательность генов NCS-1, которая оказалась идентичной для всех полученных образцов:

NCS-1(P): 5'-GGGCATATGGGGGAAATCCAACAGCAAGTTG-3'

Оба праймера, содержащие сайты эндонуклеаз рестрикции Ndel и HindIII использовали для последующей ПЦР-амплификации кДНК. Полученный ПЦР-фрагмент клонировали в вектор pET-22b(+) для экспрессии в клетках *Escherichia coli*. Для этого плазмиду и ПЦР-фрагмент подвергали рестрикции ферментами Ndel и HindIII и встраивали кДНК NCS-1 в плазмиду путем лигирования ДНК-лигазой фага T4. Полученным вектором трансформировали компетентные клетки *E.coli* штамма XL1 blue и проводили отбор клонов, содержащих ген NCS-1, методом рестрикционного анализа.

2.2.1.2 Получение генетических конструкций для экспрессии мутантных форм NCS-1 и химерных белков

Генетическая конструкция, содержащая ген NCS-1, слитый в рамке считывания с геном глутатион-S-трансферазы (GST), была получена путем клонирования гена NCS-1, полученного в предыдущем разделе работы, в экспрессионный вектор pGEX-5X-1 по сайтам рестрикции BamHI и SalI. Генетические конструкции для экспрессии мутантов NCS-1 с заменами K→E в положениях 3, 7 и 9 были получены за счет ПЦР гена NCS-1 дикого типа с использованием специфичного обратного праймера NCS-1(M), а также прямых праймеров, содержащих точечные замены в кодонах лизинов:

NCS-1(3E): 5'-GGGCATATGGGGGGAATCCAACAGC-3'

NCS-1(7E): 5'-GGGCATATGGGGGAAATCCAACAGCGAGTTG-3'

NCS-1 (9E): 5'-GGGCATATGGGGGAAATCCAACAGCAAGTTGGAGCCTG-3'

Двойные и тройной мутанты были получены на основе одиночных мутантов с помощью нескольких последовательных ПЦР. Все полученные фрагменты ДНК были встроены в вектор pET-22b(+) по сайтам рестрикции NdeI и HindIII. Конструкция для экспрессии химерного белка

«NR», преставляющего собой NCS-1, у которого последние 14 а.о. (P177-V190) заменены на остатки L180-L202 рековерина, была получена за счет ПЦР с перекрытием на основе гена NCS-1 и полученной ранее плазмиды с геном рековерина [318, 319]. Для этого использовали прямой праймер, специфичный к гену NCS-1, обратный праймер, специфичный к гену рековерина, и перекрывающий прямой праймер:

NR(P): 5'-GGGCATATGGGGAAATCCAACAGCAAGTTG-3'

NR(M): 5'-GGGCCATGGTCAGAGTTTCTTTTCCTTCAG-3'

NR(overlap): 5'-GAAGGCTCCAAGGCTGACAAGGAAATTCTGCGACTGCG-3'

Полученный ПЦР-фрагмент был встроен в плазмиду pET-22b(+) по сайтам NcoI и HindIII.

2.2.1.3. Прочие генетические конструкции

Конструкции для экспрессии фрагментов родопсинкиназы, конъюгированных с GST, были получены в нашей лаборатории ранее [320]. Плазмида pET-28a, содержащая ген химерного белка GRK1^{1-191,512-557} (GRK1^{N-C}) была получена на основе полноразмерного гена родопсинкиназы, как описано в [321]. Плазмида pTrcHisB, содержащая полноразмерный ген зрительного аррестина, была предоставлена группой V. Gurevich из Sun Health Research Institute (Аризона, США) [322]. Вектор для трансфекции клеток млекопитающих pCI-neo, содержащий ген NCS-1, был сконструирован в Институте молекулярной медицины МГМУ им. И.М. Сеченова.

2.2.2. Получение миристоилированного NCS-1 дикого типа

2.2.2.1. Бактериальная экспрессия NCS-1

Новая получения рекомбинантного NCS-1 высокой методика с степенью миристоилирования была разработана в рамках настоящей работы [323]. Плазмидой pET-22b(+), содержащей ген NCS-1, трансформировали клетки E. coli штамма BL21(DE3)Codon+RP, которые были трансформированы плазмидой рВВ131, содержащей предварительно ген Nмиристоилтрансферазы 1 из S. cerevisae [324]. Полученными клонами заражали 50 мл культуральной среды LB (10 мг/л триптона, 10 мг/л NaCl, 5 мг/л дрожжевого экстракта, pH=8,0), содержащую 100 мкг/мл ампициллина и 25 мкг/мл канамицина, после чего клетки культивировали в термостатируемом шейкере-инкубаторе Excella E25 (New Brunswick Scientific, США) при +37°С и интенсивной аэрации (180 оборотов в минуту). По достижении оптической плотности A₆₀₀, равной 0,6 о.е., культуру переносили на +4°С. На следующий день эту культуру добавляли к препаративному объему среды LB (3 л) с ампициллином и канамицином из расчета 10 мл культуры на 1 л среды и инкубировали клетки в описанных выше условиях до А₆₀₀=1. После этого экспрессию NCS-1 индуцировали добавлением в культуральную среду ИПТГ до конечной концентрации 0,5 мМ. Для получения миристоилированной формы белка сразу после индукции

в среду добавляли миристиновую кислоту до конечной концентрации 200 мкг/мл, после чего инкубировали культуру еще 4 часа.

2.2.2.2. Экстракция NCS-1

Клетки собирали центрифугированием (6300 g, 15 мин) и ресуспендировали с помощью гомогенизатора Поттера в лизисном буфере (50 мМ Tris-HCl, 100 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ ЭДТА, 0,1 мМ ФМСФ, 1 мМ ДТТ, pH=8,0) из расчета 70 мл буфера на 1 л культуры. Лизис бактериальных клеток производили путем замораживания/оттаивания полученной суспензии и последующей инкубации в присутствии 50 мкг/мл лизоцима яичного белка (30 мин во льду). Клеточный дебрис отделяли от фракции растворимых белков центрифугированием (27000 g, 20 мин). Осадок снова ресуспендировали в лизисном буфере (5 мл на 1 л культуры) и по каплям добавляли в денатурирующий буфер (20 мМ Tris-HCl, 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭГТА, 2 мМ MgCl₂, 6 М мочевины, 1 мМ ДТТ, pH=8,0) из расчета 25 мл на 1 л культуры. Суспензию оставляли перемешиваться на ночь при $+4^{\circ}$ С, а на следующий день проводили ренатурацию белков путем диализа против того же буфера без мочевины (три смены буфера по 3 ч). Растворимую фракцию отделяли от осадка центрифугированием (27000 g, 20 мин) и смешивали с полученным ранее экстрактом.

2.2.2.3. Первичная хроматографическая очистка NCS-1

На первой стадии очистки проводили Ca²⁺-зависимую гидрофобную хроматографию NCS-1 на колонке с фенилсефарозой. К полученному клеточному экстракту, содержащему целевой белок, добавляли CaCl₂ до конечной концентрации 3 мМ и NaCl до концентрации 1 М. Лизат фильтровали и наносили на колонку, уравновешенную Ca²⁺-содержащим буфером с высокой ионной силой (20 мМ Tris-HCl, 1 M NaCl, 2 мМ MgCl₂, 2 мМ MgCl₂, 1 мМ ДТТ, pH=8,0,). Элюцию немиристоилированного NCS-1 проводили буфером с низкой ионной силой (200 мМ NaCl), содержащим вместо Ca²⁺ 2 мМ ЭГТА. После этого основную долю миристоилированного белка элюировали, дополнительно снизив ионную силу (0 мМ NaCl). Остатки миристоилированного белка элюировали деионизированной водой.

2.2.2.4. Вторичная хроматографическая очистка NCS-1

Очистку препарата NCS-1 от примеси немиристоилированного белка проводили методом гидрофобной хроматографии на бутилсефарозе. К фракциям, полученным на предыдущем этапе, добавляли NaCl до концентрации 1 М и наносили на колонку, уравновешенную бескальциевым буфером с высокой ионной силой (20 мМ Tris-HCl, 1 M NaCl, 1 мМ ЭГТА, 2 мМ MgCl₂, 1 мМ ДТТ, pH=8,0). Затем белок элюировали, снижая ионную силу буфера ступенчатым градиентом с

шагом 100 мМ NaCl. Наибольшая доля миристоилированного NCS-1 содержалась в фракциях с 200-0 мМ NaCl.

Дополнительная стадия очистки проводилась методом высокоэффективной анионообменной хроматографии NCS-1 на колонке HiTrap Mono-Q FF (GE Healthcare). Белок наносили на колонку, которая была предварительно уравновешена бессолевым буфером (20 мМ Tris-HCl, 1 мМ ДТТ, pH=8,0) и элюировали линейным градиентом концентрации NaCl (0-1 M) в том же буфере. Чистый целевой белок появлялся в элюате при концентрациях NaCl, равных 380-400 мМ. Белок подвергали масс-спектрометрическому анализу LC/ESI-MS для проверки соответствия его массы миристоилированному NCS-1. Концентрацию NCS-1 определяли спектрофотометрически, принимая коэффициент молярной экстинкции при 280 нм равным 21430 M⁻¹*см⁻¹ [325].

2.2.2.5. Определение доли миристоилированной формы в препаратах NCS-1

Для выявления примеси немиристоилированной формы в очищенных препаратах NCS-1 использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на приборе Waters Breeze (Waters, CША), оснащенном детектором Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector. 20 мкл пробы, содержащей 0,1-1 мг/мл NCS-1, смешивали с 50 мкл 100% ацетонитрила, перемешивали на шейкере в течение 30 мин и осаждали центрифугированием (8000 g). Затем супернатант наносили на колонку с обращённой фазой C18 Symmetry (Waters, CША) размером 3,9 мм х 150 мм с размером пор 300 Å, уравновешенную водным раствором 2% ацетонитрила и 0,1% ТХУ. Миристоилированную и немиристоилированную формы NCS-1 разделяли в градиенте 30-60% ацетонитрила, используя в качестве контроля препарат чистого немиристоилированного белка. Для детекции белка измеряли поглощение элюата при двух длинах волн, равных 215 и 280 нм. Степень миристоилирования вычисляли ИЗ соотношения плошалей пол пиками. соответствующими миристоилированной и немиристоилированной формам белков.

2.2.2.6. Декальцификация NCS-1

Для исследований Ca²⁺-зависимых свойств NCS-1 в настоящей работе было необходимо получить препарат, содержащий бескальциевую форму этого белка без примеси его Ca²⁺- связанной формы. Для этого проводилась специальная процедура декальцификации NCS-1, как описано в предыдущих работах [254]. Очищенный NCS-1 последовательно диализовали против 10 мМ ЭДТА (pH=5,0), деионизированной воды и, наконец, буфера (20 мМ Tris-HCl, pH=8,0). Полученный препарат апо-NCS-1 хранили в аликвотах при -70°С.

2.2.3. Получение других белков

2.2.3.1. Получение мутантных форм NCS-1

Немиристоилированные N-концевые мутанты NCS-1 экспрессировали в бактериальной культуре в отсутствие NMT1p и выделяли по методике, ранее разработанной для рековерина [270]. Так, первичную очистку белков проводили путем Ca^{2+} -зависимой гидрофобной хроматографии на фенилсефарозе: клеточный лизат наносили на колонку в бессолевом буфере с 2 мM CaCl₂ (pH=8,0) и элюировали NCS-1 тем же буфером, содержащим вместо Ca^{2+} 2 мМ ЭГТА. После этого дополнительную очистку белка выполняли методом анионообменной хроматографии, как описано в разделе 2.3.1.4. Химерный белок NR получали таким же образом, как и белок дикого типа (см. раздел 2.3.1), однако из-за высокой поверхностной гидрофобности апо-формы белка этап очистки на фенилсефарозе проводился со следующей модификацией: белок в составе бактериального лизата наносили на колонку в отсутствие ионов магния и кальция, а затем элюировали буфером с 2 мM MgCl₂.

2.2.3.2. Получение химерных белков, конъюгированных с GST

Клетки *E.coli* штамма BL21(DE3)Codon+RP трансформировали плазмидой pGEX-5х-1, содержащей ген NCS-1, либо гены фрагментов родопсинкиназы 1-25 и 1-183. Экспрессию рекомбинантных белков производили так, как описано в предыдущем разделе. Затем бактериальные клетки осаждали центрифугированием и ресуспендировали с помощью гомогенизатора Поттера в 70 мл (на каждый литр культуры) буфера для экстракции (20 мМ Tris-HCl, 0,1 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ, 1 мМ ФМСФ, pH=8,0). Лизис клеток осуществляли методом замораживания/оттаивания с добавлением 50 мкг/мл лизоцима и завершали с помощью ультразвукового дезинтегратора УЗДГ-2Т в следующем режиме: З пульса по 1 мин с рабочим временем 50%, мощность 200 Вт, амплитуда колебаний жала 60 мкм, с перерывом в 1 мин. Суспензию разрушенных клеток центрифугировали (27000 g, 30 мин), после чего супернатант фильтровали и наносили на колонку GSTrap FF (GE Healthcare, CША), предварительно уравновешенную лизисным буфером, при скорости потока 0,1 мл/мин. Рекомбинантные белки элюировали тем же буфером, содержащим 10 мМ восстановленного глутатиона. Глутатион удаляли путем диализа против 20 мМ Tris-HCl (pH=8,0). Полученные препараты хранили в аликвотах при -70°С.

2.2.3.3. Получение химерного белка GRK1^{N-C}- His6

Химерный белок, представляющий собой два домена родопсинкиназы (1-181 и 512-557), соединенных линкерной последовательностью GSGS, и модифицированный с С-конца 6-ю гистидинами, выделяли путем аффинной хроматографии на Ni-NTA сефарозе [321]. Клетки *E.coli* штамма BL21(DE3)Codon+RP трансформировали соответствующей генетической конструкцией

и культивировали в среде LB, содержащей 25 мкМ канамицина. Экспрессию белка проводили по стандартной методике, описанной в предыдущих разделах. Бактериальный осадок ресуспендировали в буфере для Ni-NTA хроматографии в нативных условиях (50 мМ Tris-HCl, 500 мМ NaCl, 10 мМ имидазола), после чего клетки разрушали с помощью ультразвуковой обработки в режиме: 5 пульсов по 1 мин с рабочим временем 50%, мощность 200 Вт, амплитуда колебаний жала 60 мкм, с перерывом в 1 мин. Полученный лизат центрифугировали (27000 g, 30 мин) и супернатант наносили на колонку, уравновешенную тем же буфером, в котором производилась экстракция. Элюцию белка проводили градиентом 10-500 мМ имидазола в том же буфере. Элюат диализовали против 10 мМ НЕРЕS-КОН (pH=7,5) и концентрацию родопсинкиназы определяли, исходя из коэффициента молекулярной экстинкции при A_{280} , равного 33640 М^{-1*}см⁻¹. Полученный химерный белок хранили в аликвотах при -20°С и использовали в течение двух недель после выделения.

2.2.3.4. Получение очищенных препаратов потенциальных мишеней NCS-1

Рекомбинантный миристоилированный рековерин получали, как описано в предыдущих работах [270]. Рекомбинантный зрительный аррестин экспрессировали в *E.coli* и выделяли из бактериальной культуры с помощью двух последовательных этапов хроматографии на гепарини Q-сефарозе, как описано в работе [322]. Тубулин выделяли из гомогената мозга быка по стандартной методике, подробно описанной в работе [326]. Коротко: фракцию экстракта мозга, содержащую тубулин, получали путем двух последовательных этапов высаливания сульфатом аммония (32% и 43%). Полученный в результате высаливания осадок растворяли в фосфатном буфере, содержащем 0,5 мМ MgCl₂ и 0,1 мМ ГТФ, и очищали методом анионообменной хроматографии на DEAE-сефарозе и гель-фильтрации на носителе Sephadex G25.

2.2.3.5. Получение антител против NCS-1

Поликлональные моноспецифические антитела против NCS-1 получали в соответствии со стандартной методикой [327]. Кролика иммунизировали 1:1 смесью 0,4 мг/мл NCS-1 и адъюванта Фрейнда в PBS. Через 4 недели проводили реиммунизацию раствором белка без добавления адъюванта. Из крови животных получали гипериммунную сыворотку и антитела против NCS-1 выделяли из нее на колонке с BrCN-активированной сефарозой, несущей иммобилизованный антиген. Чтобы избежать кросс-реактивности, антитела дополнительно очищали на колонке с иммобилизованным рековерином.

2.3. ХАРАКТЕРИСТИКА СТРУКТУРНЫХ И МЕТАЛЛСВЯЗЫВАЮЩИХ СВОЙСТВ NCS-1

2.3.1. Связывание NCS-1 с ионами кальция, магния и цинка

2.3.1.1. Равновесный диализ

Для исследования связывания Zn^{2+} и Ca^{2+} с NCS-1 методом равновесного диализа использовали 96-луночную микроравновесную диализную систему HTDialysis (США) [328]. Каждую лунку тефлонового планшета объемом 500 мкл разделяли диализной мембраной из регенерированной целлюлозы с отсечением 3,5 кДа. Половину каждой лунки заполняли 180 мкл раствора NCS-1 (4,4-6,2 мкМ) в 10 мМ HEPES-KOH (pH=7,6), а вторая половина содержала 180 мкл того же буфера с 2-150 мкМ Zn(NO₃)₂. Лунки плотно запечатывали и уравновешивали, непрерывно перемешивая на скорости 130 об./мин. при 25°C в течение 17-20 часов. Общую концентрацию Zn²⁺ в растворе после электротермической атомизации измеряли на атомно-адсорбционном спектрометре iCE 3000 (Thermo Scientific, CША) с аргоном в качестве инертного газа. Содержание Zn²⁺ в пробе определяли по полосе поглощения при 213,9 или 307,6 нм с дейтериевой коррекцией фона, используя для калибровки набор стандартных растворов (Sigma-Aldrich). Количество Zn²⁺, связавшегося с NCS-1, определяли как разницу между концентрациями катиона в двух половинах каждой лунки, с допущением, что концентрация свободного Zn²⁺ в них не отличается.

2.3.1.2. Изотермическая калориметрия титрования (ИКТ)

Связывание двухвалентных ионов (Zn^{2+} , Ca^{2+} и Mg^{2+}) с NCS-1 и рековерином исследовали на приборе MicroCal ITC200 (Malvern Pananalytical, Великобритания) в соответствии со стандартным протоколом [329, 330]. Эксперименты проводили при 25°С в буфере, содержащем 50 мМ Tris-HCl (pH=7,5) в присутствии 1 мМ восстановителя TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine, трис(2-карбоксиэтил)фосфин). В экспериментах с дисульфидным димером NCS-1 TCEP к пробе не добавлялся. Концентрация белка в калориметрической кювете была 25 мкМ, а концентрация ионов в шприце варьировала от 375 до 750 мкМ. В экспериментах, где исследовалась конкуренция между катионами, концентрация в кювете катиона, взятого в избытке, составляла 1 мМ для Ca²⁺, 250 мкМ для Zn²⁺ и 5 мМ для Mg²⁺. Белок титровали сериями инъекций катионов объемом 2 мкл. При необходимости, шприц заполняли заново тем же раствором, не меняя раствор в кювете, и продолжали титрование. Затем строили зависимость площади каждого пика титрования от соотношения ион/NCS-1. Для определения базовой линии буфер для разведения, не содержащий NCS-1, титровали инъекциями лиганда. Для анализа данных использовали программное обеспечение Origin. Данные аппроксимировали с помощью молелей «последовательного связывания», «один набор сайтов» и «два набора сайтов», используя

нелинейный метод наименьших квадратов. На основе этого были получены равновесные константы диссоциации/ассоциации (K_A/K_D), а также показатели изменения энтальпии (ΔH) и стехиометрия связывания. Термодинамические параметры связывания определяли как среднее трех независимых измерений.

2.3.2. Структурная характеристика металлсвязанных форм NCS-1

2.3.2.1. Флуориметрия

Спектры эмиссии флуоресценции NCS-1 измеряли ранее описанным способом на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian Inc., США), оснащенном температурным контроллером для регуляции температуры непосредственно в кювете (принцип работы контроллера основан на эффекте Пельтье) [314, 331]. Флуоресценцию остатков триптофана NCS-1 и рековерина (концентрация белка в пробе 14 мкМ) возбуждали при длине волны 280 нм и измеряли при 25°С в буфере, содержащем 10 мМ HEPES-КОН (pH=7,6) и 100 мМ КСІ в присутствии различных катионов металлов и их сочетаний (1 мМ MgCl₂; 100 мкМ CaCl₂; 100 мкМ ZnCl₂) или в их отсутствие (1 мМ ЭДТА). Поверхностную гидрофобность белков определяли в тех же условиях с добавлением флуоресцентного зонда 4,4'-дианилино-1,1'-бинафтил-5,5'-дисульфоновой кислоты (бис-АНС). Флуоресценцию комплекса бис-АНС с белками измеряли, используя длину волны возбуждения 385 нм с шириной щели 5 нм. Концентрацию бис-АНС в стоковом водном растворе определяли, используя коэффициент молярной экстинкции при 385 нм равный 16790 М⁻¹см⁻¹ [332]. Концентрация бис-АНС в пробе составляла 1 мкМ, концентрация белков составляла 5-6 мкМ. Все спектры корректировали на чувствительность прибора и аппроксимировали кривыми лог-нормального распределения, используя программное обеспечение LogNormal (разработано в ИБП РАН, Пущино, Россия) [333].

Спектрофлуориметрическое определение профилей термической денатурации проводили как описано в предыдущих работах [334]. Регистрацию осуществляли при длине волны возбуждения, равной 280 нм, с шагом 2 нм и усреднением 0,5 секунды, при температуре, изменяемой в диапазоне от 4 до 98°C с шагом в 2°C. Для адаптации к каждой температуре пробу инкубировали в течение 3-х минут. Средняя скорость сканирования составляла 0,4-0,5°C/мин. При температурах ниже комнатной камеру обрабатывали жидким азотом, чтобы избежать образование конденсата. Температуры полуперехода из нативного состояния белка в его денатурированную форму определяли, аппроксимируя зависимость длины волны максимума спектра собственной флуоресценции ($\lambda_{\text{макс}}$) от температуры функцией Больцмана, используя программное обеспечение OriginPro 9.0 (OriginLab Corporation, США) [335].

2.3.2.2. Дифференциальная сканирующая флуориметрия/турбидиметрия

В качестве альтернативного подхода для мониторинга собственной флуоресценции и термостабильности NCS-1 в присутствии различных концентраций двухвалентных катионов измеряли методом дифференциальной сканирующей флуориметрии (ДСФ) с использованием прибора Prometheus NT.Plex (Nanotemper Technologies, Германия), оборудованного турбидиметрическим модулем для измерения светорассеяния. Эксперименты проводились в буфере, содержащем 50 мМ Tris-HCl (pH=7,5) и 1 мМ TCEP (в экспериментах с дисульфидным димером NCS-1 TCEP к пробе не добавлялся). Образцы, содержащие 25 мкМ NCS-1 и 25-500 мкМ Ca²⁺, Mg²⁺ и/или Zn²⁺, загружали в капилляры, которые помещали в прибор и измеряли интенсивность эмиссии собственной флуоресценции NCS-1 при длинах волн 330 (I₃₃₀) и 350 нм (I₃₅₀) при температуре 25°С. При измерении использовались низкие настройки чувствительности прибора, и предел мощности возбуждающего излучения при 280 нм был установлен на 10%. Капилляры нагревали с 15°С до 95-110°С со скоростью 1 К/мин. Температуру разворачивания белковой глобулы (Т_{1/2}) определяли исходя из первой производной температурной зависимости соотношения I₃₅₀/I₃₃₀, используя встроенное программное обеспечение Prometheus NT.Plex. Температуры агрегации (T_{ar}) определяли аналогичным образом по температурной зависимости светорассеяния при 350 нм.

2.3.2.3. Спектроскопия кругового дихроизма

Измерения спектров кругового дихроизма (КД) NCS-1 осуществлялись с помощью спектрополариметра JASCO J-810 (JASCO Inc., Япония), оборудованного контроллером Пельтье, как описано ранее [334]. А именно, спектры КД NCS-1 (содержание белка в пробе 8 мкМ) регистрировались при 25°C в буфере, содержащем 10 мМ НЕРЕS-КОН (pH=7,6), 100 мМ KCl, а также либо 1 мМ ЭДТА (апо-форма), либо различные комбинации ионов магния (1 мМ MgCl₂), кальция (100 мкМ CaCl₂) и цинка (100 мкМ ZnCl₂). Вклад буфера вычитали из полученного экспериментального спектра. Доля элементов вторичной структуры белков затем рассчитывалась с использованием бесплатного пакета программ CDPro (разработан в Университете Колорадо, CША) [336].

2.3.2.4. Исследование Zn²⁺-зависимой преципитация NCS-1

К 25 мкМ NCS-1 в буфере, содержащем 20 мМ Tris-HCl (pH=8,0), 150 мМ NaCl и 1 мМ ДТТ, добавляли 0-500 мМ ZnCl₂. NCS-1 инкубировали в присутствии 1 мМ CaCl₂, либо 1 мМ MgCl₂ и 1 мМ ЭГТА, перемешивая на термостатическом шейкере (37°С, 30 мин). После этого преципитат белка собирали центрифугированием (24000 g, 15 мин), осадок растворяли в буфере для образцов образцов (125 мМ Tris-HCl, pH=6,8, 4% (м/о) ДСН, 20% (о/о) глицерин, 10% (о/о) β-меркаптоэтанол, 0,004% (м/о) бромфеноловый синий) и анализировали методом ДСН-

электрофореза. Долю NCS-1, подвергнувшегося Zn²⁺-зависимой преципитации, определяли методом денситометрического анализа с помощью бесплатного программного обеспечения GelAnalyzer (GelAnalyzer.com)

2.3.2.5. Просвечивающая электронная микроскопия Zn²⁺-связанных преципитатов NCS-1

4 мкл образца NCS-1 (10 мкМ) после инкубации в присутствии 1 мМ ZnCl₂ наносили на медную сетку с углеродным напылением (300 ячеек) и инкубировали в течение 1 мин. Сетку промывали дистиллированной водой и повторно производили нанесение образца. После этого в течение 30 с производили негативное окрашивание 2% раствором уранилацетата. Сетку высушивали и рассматривали образец на просвечивающем электронном микроскопе JEOL 2200FS (JEOL Ltd., Япония) при напряжении 200 кВт. Для получения изображений использовали 4k×4k ПЗС-камеру с медленным сканированием (Gatan Inc., США).

2.4. ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФОТОРЕЦЕПТОРНОГО NCS-1

2.4.1. Связывание NCS-1 с очищенными клеточными мембранами

2.4.1.1. Получение отмытых мочевиной мембран фоторецепторов и гиппокампа

Все процедуры по получению фоторецепторных мембран проводили при температуре +4°C при тусклом красном свете согласно методу, описанному в работе [337]. Замороженные на -70°С темноадаптированные сетчатки быка помещали в 45% раствор сахарозы в воде в соотношении 1 сетчатка на 1 мл раствора и инкубировали во льду в течение 2-3 часов, периодически интенсивно встряхивая. Полученную суспензию центрифугировали (3000 g, 20 мин, +4°C). Супернатант, содержащий наружные сегменты палочек (НСП), разводили в 2 раза буфером В (20 мМ Tris-HCl, рН 8.0, 5 мМ ЭДТА) и снова центрифугировали (8600g, 20 мин, +4°С). Полученный осадок ресуспендировали в 34% растворе сахарозы, суспензию наслаивали на ступенчатый градиент плотности сахарозы (34-36%) и центрифугировали в бакетном роторе (72000g, 2 часа, +4°C). НСП отбирали из получившейся компактной зоны, разводили в 2 раза 20 мМ Tris-HCl (pH=8,0) и центрифугировали (27000g, 20 мин, +4°C). Мембраны гиппокампа получали по ранее разработанной методике с небольшими модификациями [338]. Гиппкокамп быка измельчали на льду в гомогенизаторе Поттера в 30 объемах буфера, содержащего 50 мМ Трис-HCl (pH=8,0) с добавлением 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ФМСФ и 10% сахарозы. Суспензию центрифугировали при 1000 g в течение 10 мин, после чего осадок отбрасывали, а супернатант центрифугировали при 22000 g 30 мин. Далее процедуры для мембран гиппокампа и фоторецепторных мембран были одинаковыми. Осадки мембран гомогенизировали в 10-кратном объеме 5 М раствора мочевины в 20 мМ Tris-HCl (pH=8,0). Полученный гомогенат инкубировали во льду в течение 10 минут и центрифугировали (140000g, 30 мин). Далее осадок мембран гомогенизировали с помощью

гомогенизатора Поттера в 20-кратном объеме 20 мМ Tris-HCl (pH=8,0) и центрифугировали (140000g, 30 мин), таким образом отмывая от мочевины. Процедуру повторяли 3 раза. После этого осадок мембран ресуспендировали в 20 мМ Tris-HCl (pH=8,0) из расчета 1 мкл буфера на 1 мг осадка мембран, разделяли на аликвоты и хранили при -70°C.

2.4.1.2. Связывание NCS-1 с мембранами

Связывание NCS-1 с мембранами проводили методом равновесного центрифугирования, как описано в предыдущих работах [269, 339]. Пробу белка (40 мкМ) в объеме 45 мкл смешивали с 5 мкл суспензии отмытых мочевиной мембран фоторецепторов и гиппокампа в 20 мМ Tris-HClбуфере (pH=8,0), содержащем 150 мМ NaCl и 20 мМ MgCl₂ в присутствии 2 мМ свободного CaCl₂ или 2 мМ ЭГТА. Полученную смесь инкубировали в термостатируемом шейкере TS-100 (BioSan, Латвия) со скоростью перемешивания 1200 об./мин при +37°C в течение 20 минут. По завершении инкубации мембраны осаждали центрифугированием (14500g, 20 мин), супернатант отбрасывали, а осадок мембран ресуспендировали в 50 мкл буфера для и анализировали методами ДСН-электрофореза в полиакриламидном геле и иммуноблоттинга. Количество NCS-1, связавшегося с мембранами, определяли денситометрическим сканированием полос NCS-1 в геле.

2.4.2. Связывание NCS-1 с фосфолипидами

2.4.2.1. Получение липосом

Мультиламеллярные липосомы изготавливали методом выпаривания 2% растворов фосфолипидов в смеси 2:1 хлороформа/этанола, используя впрыск азота для регуляции вакуума. После этого липосомы регидратировали буфером, содержащим 10 мМ NaH₂PO₄ и 150 мМ NaCl (pH=7,0). Смесь перемешивали на вортексе и подвергали замораживанию/оттаиванию. Полученные частицы были видны в микроскоп, их размер в среднем составил 3-5 мкм.

2.4.2.2. Связывание NCS-1 с липосомами

Связывание NCS-1 с липосомами анализировали методом флуоресцентная корреляционной спектроскопии (ФКС). Миристоилированный и немиристоилированный NCS-1 ковалентно модифицировали флуоресцентной меткой сульфоцианин-3-малеимидом (Lumiprobe, Германия) в соответствии с инструкцией производителя. Конъюгат отделяли от несвязавшейся метки с помощью гель-фильтрации. Установка для ФКС была описана ранее [340]. Возбуждение и детекция флуоресценции проводились на инвертированном эпифлуоресцентном микроскопе Olympus IMT-2 с твердотельным лазером Nd:YAG (532 нм) и водно-иммерсионным объективом 40×NA1.2 (Carl Zeiss, Германия). После прохождения через дихроический расцепитель и длинноволновой пропускающий фильтр флуоресцентное излучение попадало на детектор с

лавинным светодиодом SPCM-AQR-13-FC (PerkinElmer Optoelectronics, США). Далее сигнал поступал на персональный компьютер после обработки платой с функцией коррелятора Flex02-01D/C (Correlator.com, США). Флуоресценция считывалась в конфокальном объеме, расположенном в 50 мкм от поверхности предметного стекла, на которое наносили 50 мкл раствора образца, содержащего 100 нМ NCS-1 в 20 мМ Трис-HCl (pH=8,0), 100 мМ NaCl и либо 1 мМ CaCl₂, либо 1 мМ ЭГТА. Время регистрации сигнала составляло 30 с, в течение которых образец интенсивно перемешивался пластиковой мешалкой (600 об./мин.). Установку калибровали, измеряя авторреляционную функцию флуоресцентный сигнал аппроксимировали трехмерной автокорреляционной функцией, как описано ранее [341]. Так, τ_D – это корреляционное время диффузии, т.е. промежуток времени, который молекула находится в наблюдаемом объеме с радиусом ω и длиной z_0 ($\tau_D=\omega^2/4D$, где D – коэффициент диффузии), а N – среднее число флуоресцентных частиц в конфокальном объеме. Для вычислений использовали программое обеспечение, прилагающееся к коррелятору, а также SigmaStat (Systat Software, CША). Корреляцонное время определяли по следующему уравнению:

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left(\frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_D}} \right) \left(\frac{1}{\sqrt{1 + \frac{\omega^2 \tau}{z_0^2 \tau_D}}} \right)$$

Так, коэффициент диффузии для родамина-6G принимали равным 4,26×10⁻⁶ см²/с [342]. Таким образом был рассчитан конфокальный объем радиусом 0,55 мкМ. NCS-1 с флуоресцентной меткой диффундировал медленнее, чем родамин-6G, в результате чего врумя диффузии составило около 100 мкМ, что соответствует коэффициенту диффузии 85 мкм²/с.

Связывание белка с липосомами оценивали по числу пиков флуоресценции свыше определенного порога [343]. Кривые флуоресценции с шагом 25 мкс анализировали с помощью программного обеспечения WinEDR Strathclyde Electrophysiology (разработано в Университете Страйтклайд, Великобритания) или аналогичного, разработанного в институте имени А.Н. Белозерского ΜΓУ [344]. Программа, изначально разработанная для анализа электрофизиологических данных, позволяет подсчитывать число пиков сигнала ФКС с амплитудой F, превышающей заданный порог F₀. В нашем случае использовался порог 0,4 МГц. Где это возможно, константы диссоциации NCS-1 с липосомами оценивались путем титрования комплексов немеченным белком.

2.4.2.3. Связывание с иммобилизованными фосфолипидами (дот-блоттинг)

Связывание NCS-1 с фосфолипидами, иммобилизованными на нитроцеллюлозной мембране, проводили с использованием набора PIPStrip (Thermo Fisher), в соответствии с инструкцией производителя и протоколом, описанным в работе [310]. Стрипы блокировали раствором 3% обезжиренного БСА в PBS с добавлением 0,1% Tween-20 и 1 мМ CaCl₂ и инкубировали с 0,5 мкг/мл NCS-1 в том же буфере в течение ночи при 4C. Мембраны три раза отмывали раствором для блокировки и детектировали связавшийся белок так же, как и в случае других иммуноблотов. Количество связывшегося белка оценивали, исходя из денситометрического анализа пятен с вычитанием контроля (бланк).

2.4.3. Поиск и идентификация мишеней NCS-1 среди белков экстракта сетчатки

2.4.3.1. Получение экстрактов сетчатки

Все процедуры проводились при тусклом красном свете. Замороженные на -70°С сетчатки быка 1-2 часа инкубировали во льду в буфере, содержащем 20 мМ Tris-HCl (pH=8,0), 2 мМ MgCl₂, 1 мМ ДТТ, 0,5 мМ ЭДТА, 1 мМ ФМСФ) в соотношении 1 мл буфера на 1 сетчатку. Полученную суспензию центрифугировали (27000g, 20 мин, $+4^{\circ}$ С). Осадок ресуспендировали с помощью гомогенизатора Поттера в том же буфере с добавлением 250 мМ NaCl, причем объем буфера был равен объему исходной суспензии. Сетчатки экстрагировали во льду в течение 1 часа, после чего дважды центрифугировали (27000g, 20 мин, $+4^{\circ}$ С). Оба супернатанта смешивали на свету, добавляли CaCl₂ до конечной концентрации 3 мМ и фильтровали с использованием вакуумного насоса через стекловолоконный фильтр Whatman (GE Healthcare).

2.4.3.2. Выделение белков сетчатки, способных связываться с NCS-1

 Ca^{2+} -зависимое соосаждение белков экстракта сетчатки с GST-NCS-1 проводили по оптимизированной методике, описанной ранее [136]. Для этого 1,3 мл 75% (о/о) суспензии глутатионсефарозы уравновешивали в буфером, содержащим 20 мМ Tris-HCl (pH=8,0), 125 мМ NaCl, 1мМ ДТТ, 0,5 мМ CaCl₂, осаждали центрифугированием (12100g), после чего осадок смешивали с 10 мг GST-NCS-1 или GST (контроль) и инкубировали в течение 2-х часов при +4°C и перемешивании. Суспензию осаждали центрифугированием (12100g) и 5 раз промывали 10 мл рабочего буфера для удаления несвязавшегося белка. Далее к суспензии добавляли 10 мл полученного ранее экстракта сетчатки и инкубировали 16 часов при +4°C и перемешивании. После этого носитель 5-кратно промывали и проводили элюцию связавшихся белков, последовательно инкубируя в течение часа при постоянном перемешивании в рабочем буфере, содержащем 5 мМ ЭГТА.

В качестве альтернативного подхода использовали иммуноаффинную очистку белков, связывающихся с NCS-1 Ca²⁺-независимым образом. Для этого антитела против NCS-1

иммобилизовали на BrCN-активированной сефарозе в растворе PBS (pH=8,2), 150 мМ NaCl при 4°C и аккуратном перемешивании. Экстракт наносили на полученную колонку и промывали ее от несвязавшегося белка PBS с 300 мМ NaCl. Связавшиеся белки элюировали глициновым буфером (0,2 М глицин, 150 мМ NaCl) с pH=2,5. Полученные таким образом фракции диализовали против 10 мМ Tris-HCl (pH=8,0), 1 мМ ДТТ в течение ночи и концентрировали на вакуумном концентраторе Concentrator 5301 (Eppendorf, CША). Белки разделяли с помощью ДСН-электрофореза и идентифицировали методами иммуноблоттинга или масс-спектрометрии.

2.4.4. Получение и характеристика комплексов NCS-1 с мишенями

2.4.4.1. Спектроскопия поверхностного плазмонного резонанса (ППР)

Измерения ППР проводились при 25°С в системе ProteOn XPR36 с использованием сенсорного чипа ProteOn GLH (Bio-Rad). Лиганд (NCS-1) разбавляли до концентрации 60 мкг/мл 10 мМ натрий-ацетатным буфером (pH=4,5) и иммобилизовали на активированной поверхности чипа в количестве 12000-14000 RU за аминогруппы в соответствии с инструкцией производителя. Неиспользованные аминогруппы блокировали раствором 1 М этаноламина. Аналит в количестве 0,5-8 мкМ диализовали против рабочего буфера, содержащего 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 0,05% Tween-20, 2 мМ ДТТ (pH=7,4) в присутствии либо 1 мМ CaCl₂, либо 1 мМ MgCl₂, либо 1 мМ ЭДТА. Для исследования взаимодействия NCS-1 с GRK1^{N-C} использовали альтернативную конфигурацию: химерный белок иммобилизовали на чипе GLH, а в качестве аналита использовали растворы мономера и димера NCS-1 в рабочем буфере при концентрации белка от 0,5 до 20 мкМ. Аналит пропускали в потоке над поверхностью чипа со скоростью 30 мкл/мин в течение 350 с. После этого чип промывали рабочим буфером в течение 2400 с. Из ППРсенсограмм вычитали оба контроля (аналит против пустой дорожки и буфер против лиганда) и аппрокисимировали в соответствии с моделью гетерогенного лиганда, которая допускает наличие смеси из двух конформаций лиганда, которые связывают аналит с разной эффективностью. В случае димера NCS-1 также использовали модель бивалентного аналита, предполагающую связывание молекулы аналита с двумя одинаковыми молекулами лиганда одновременно. Полученные в результате величины kon и koff представляют собой константу ассоциации и диссоциации, соответственно, а К_D является равновесной константой диссоциации (k_{on}/k_{off}). Для анализа данных использовали встроенное программное обеспечение ProteOn Manager. Регенерацию чипа после эксперимента проводили путем промывания рабочим буфером в течение 50 с.

2.4.4.2. Аффинное соосаждение (метод pull-down)

Мониторинг взаимодействия NCS-1 и рековерина с N-концевыми фрагментами родопсинкиназы (M1-S25 и M1-G183), конъюгированным с GST (GST-GRK1¹⁻²⁵ и GST-GRK1^N), осуществляли методом аналитической аффинной хроматографии pull-down [270].

К суспенизии глутатионсефарозы (100 мкл, 75%) добавляли 50 мкг химерного белка в рабочем буфере, содержащем 20 мМ Tris-HCl (pH=8,0), 150 мМ NaCl и 1 мМ ДТТ. Затем осадок три раза отмывали от несвязавшегося белка рабочим буфером с добавлением 0,05% Tween-20. К осадку добавляли 25 мкМ NCS-1 или рековерина. Суспензию интенсивно встряхивали на термостатическом шейкере (1000 об./мин.) в течение 1 часа при 4°C в присутствии 1 мМ CaCl₂ («+Ca²⁺»), либо 2 мМ ЭГТА и 2 мМ MgCl₂ («-Ca²⁺»). Избыток несвязавшегося белка смывали тем же буфером, в котором проходила инкубация. Связанный с фрагментом родопсинкиназы NCS-1/рековерин элюировали ДСH-содержащим буфером для образцов и анализировали методом иммуноблоттинга. Взаимодействие Zn²⁺-связанных форм NCS-1 с родопсинкиназой исследовали тем же методом с добавлением к буферу для инкубации 0-100 мкМ ZnCl₂.

2.4.4.3. Связывание NCS-1 с пептидом D2R методом ИКТ

Мониторинг связывания NCS-1 с пептидом D2R (N430-R443) производили в системе MicroCal VP-ITC, в соответствии с ранее опубликованной методикой [33]. Эксперименты проводились при 25°C в буфере, содержащем 20 мМ Tris-HCl (pH=8,0), 150 мМ NaCl, а также 5 мМ CaCl₂, либо одновременно 5 мМ CaCl₂ и 100 мкМ ZnCl₂. Рекомбинантный NCS-1 диализовали против того же буфера и доводили концентрацию белка в шприце до 1 мМ. В калориметрической ячейке содержалось 50 мм пептида, который титровали серией из 30 инъекций NCS-1 объемом 10 мкл. После каждой инъекции следовала фаза стабилизации продолжительностью 5 минут. Полученные пики титрования интегрировали и строили зависимость площади пика от соотношения пептид/NCS-1. Базовую линию определяли, титруя белком буфер для разведения пептида. Данные аппроксимировали по модели «один набор сайтов». Термодинамические параметры определяли как среднее трех независимых измерений.

2.4.5. Регуляция родопсинкиназы в реконструированной системе

Активность родопсинкиназы определяли по включению радиоактивного фосфата в родопсин из [γ -³²P]-АТР в реконструированной системе, содержащей отмытые мочевиной фоторецепторные мембраны (10 мкМ родопсина), рекомбинантную очищенную родопсинкиназу (0,3-0,5 ед.) и 5-60 мкМ NCS-1. Реакцию проводили в 20 мМ Tris-HCl буфере (pH=8,0), содержащем 150 мМ NaCl, 3 мМ MgCl₂, 1 мМ ДТТ, 1 мМ [γ -³²P]-АТР, в присутствии 250 мкМ CaCl₂ ("+Ca²⁺") или Ca²⁺-буфера (10 мМ ВАРТАВг₂, 0,2 мМ CaCl₂) поддерживающего концентрацию свободных ионов кальция в растворе равной 50 нМ ("-Ca²⁺"). Реакционную смесь

в объеме 20 мкл готовили в темноте, реакцию инициировали освещением лампой накаливания (150 Вт), после чего проводили инкубацию реакционной смеси на свету в течение 20 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 1 объема буфера для образцов, после чего белки разделяли методом ДСН-электрофореза в полиакриламидном геле, и детекцию включения радиоактивного фосфора в родопсин проводили методом радиоавтографии в системе PhosphorImager (Fujifilm, Япония).

2.5. ХАРАКТЕРИСТИКА РЕДОКС-СТАТУСА NCS-1 В МОДЕЛЯХ СВЕТОИНДУЦИРО-ВАННОГО ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА СЕТЧАТКИ

2.5.1. Создание модели светоиндуцированной ретинопатии

Облучение глаз кроликов видимым светом высокой интенсивности проводилось в соответствии с ранее опубликованным протоколом с некоторыми модификациями [314]. Тридцать здоровых пигментированных кроликов (возраст 6 месяцев, вес 2,3-3 кг) были приобретены на сертифицированной ферме (КролИнфо, Россия). Для акклиматизации животные содержались в течение 2-х недель при 12-часовом цикле свет/темнота, температуре 22-25°C и влажности 55-60% со свободным доступом к пище и воде.

Перед экспериментом всех животных адаптировали к темноте в течение 12 ч, а потом помещали в устройство для фиксации и подвергали общей анестезии путем внутримышечной инъекции 50 мг/мл тилетамина и 50 мг/мл золазепама (15 мг смеси на 1 кг веса животного). Кроликов разделили на 5 экспериментальных групп (1-5), в каждую из которых вошло 6 животных. Кроликов групп 2-5 подвергали облучению видимым светом в течение 20 мин (группа 2) или 3 ч (группы 3-5), используя оптоволоконный иллюминатор, обрудованный галогенной лампой мощностью 150 Вт (Euromex Microscopen, Нидерланды). Зрачки глаз облучаемых животных расширяли с помощью раствора 25 мг/мл фенилэфрингидрозлорида. Кроликов группы 1 (контрольная группа) не подвергали облучению и держали в темноте в течение хода эксперимента. Настройки иллюминатора обеспечивали уровень освещенности сетчатки 30000 люкс (0,15 Вт/см², 1620 Дж/см²). Животных подвергали эвтаназии избыточной дозой анестестика сразу после эксперимента (группы 1-3), либо спустя 3 (группа 4) и 7 (группа 5) дней содержания в нормальных условиях. Глаза животных энуклеировали *post mortem*. Один (случайно выбранный) глаз каждого животного использовали для гистологических исследований и TUNEL, а из второго выделяли сетчатку для биохимических измерений.

Эксперименты с животными проводили в соответствии с рекомендациями 8-го издания «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals», а также официальным руководством Ассоциации исследователей в области зрения и офтальмологии (Association for Research in Vision and Ophthalmology, ARVO) [345]. Протокол исследования был утвержден комитетом по биоэтике НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ.

2.5.2. Определение редокс-статуса NCS-1 в сетчатке при окислительном стрессе

2.5.2.1. Получение экстракта сетчатки экспериментальных животных

Сетчатку выделяли из энуклеированных глаз кроликов при тусклом красном свете при 4°С. Каждую сетчатку помещали в 300 мкл буфера, содержащего 50 мМ Трис-HCl, 100 мМ NaCl (pH=7,5), и гомогенизировали в течение 1 мин на льду, используя гомогенизатор HG15A (Witeg, Германия). Полученную суспензию осаждали при 24000 g (16000 об./мин.) в течение 20 мин при 4°С. Затем супернатант разделяли на аликвоты: часть замораживали на -70°С и использовали для биохимических исследований, а к остальным добавляли буфер для ДСН-электрофореза и проводили анализ содержания в них окисленных форм NCS-1 методом иммуноблоттинга.

2.5.2.2. Мониторинг развития окислительного стресса в сетчатке

Содержание маркеров окислительного стресса в сетчатке измеряли с помощью коммерческих наборов (Sigma-Aldrich) в соответствии с инструкцией производителя. Так, содержание перекиси водорода в экстракте сетчатки определяли методом, основанным на окислении двухвалентного железа в составе комплекса Fe^{2+}/o -дианизидина до Fe^{3+} , который образует окрашенный комплекс с ксиленолом оранжевым. Интенсивность реакции определяли спектрофотометрически при длине волны 560 нм. Осадки, содержащие мембраны сетчатки, анализировали на содержание малонового диальдегида (МДА): их растворяли в лизисном буфере и определяли уровень МДА по цветной реакции тиобарбитуровой кислоты, определяя эффективность окрашивания при длине волны 532 нм. Все данные нормировали на тотальное содержание белка в пробах, измеренное по цветной реакции бицинхониновой кислоты (Thermo Fisher).

2.5.2.3. Детекция окисленных форм NCS-1 в сетчатке

Детекцию окисленных форм NCS-1 в экстракте сетчатки проводили методом иммуноблоттинга. Пробы выравнивали по тотальной концентрации белка и наносили на полиакриламидный гель без добавления к пробе агентов, восстанавливающих серу. В качестве контроля использовали те же пробы, но с добавлением β-меркаптоэтанола, чтобы подтвердить, что обнаруженные окисленные формы имеют в своем составе дисульфидные связи.

2.5.3. Исследование дисульфидной димеризации NCS-1 in vitro

2.5.3.1. Окисление рекомбинантного NCS-1 перекисью водорода

Реакционные смеси объемом 20 мкл, содержащие по 20 мкМ NCS-1 в предварительно дегазированном буфере 20 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 150 мМ NaCl, а также 1) 1 мМ ЭДТА; 2) 1 мМ MgCl₂; 3) 1 мМ CaCl₂; 4) 100 мкМ ZnCl₂; 5) 100 мкМ ZnCl₂, 1 мМ CaCl₂, 6) 100 мкМ ZnCl₂, 1 мМ MgCl₂ 7) 1% ДСН инкубировали в присутствие различных концентраций H₂O₂ в диапазоне 0-1000 мкМ при 37°С и интенсивном перемешивании в термостатируемом шейкере Eppendorf Thermomixer (Eppendorf, Германия) в течение 1 ч. Реакцию останавливали добавлением в каждую пробу 4х-кратного буфера для ДСН-электрофореза. Мономерную и димерную формы NCS-1 разделяли определяли В полиакриламидном геле И ИХ соотношение методом денситометрического анализа.

2.5.3.2. Определение поверхностной доступности сульфгидрильной группы NCS-1 методом Эллмана.

К реакционным смесям, содержащим по 20 мкМ NCS-1 в буфере 20 мМ Tris-HCl (pH=8,0), 150 мМ NaCl, а также 1) 1 мМ ЭДТА; 2) 1 мМ MgCl₂; 3) 1 мМ CaCl₂; 4) 100 мкМ ZnCl₂; 5) 100 мкМ ZnCl₂, 1 мМ CaCl₂, 6) 100 мкМ ZnCl₂, 1 мМ MgCl₂ добавляли ДТНБ до концентрации 0,5 мМ (общий объем реакционной смеси составлял 500 мкл). За ходом реакции следили, измеряя поглощение смеси при длине волны 412 нм с помощью спектрофотометра Ultrospec 1000 (Pharmacia Biotech, CША) в полистирольной фотометрической кювете с длиной оптического пути 1 см. Реакцию проводили в течение 5 мин, снимая показания спектрофотометра с шагом 10 с.

2.5.3.5. Получение очищенного дисульфидного димера NCS-1

1–2 мг очищенного декальцифицированного NCS-1 диализовали при интенсивной аэрации против буфера, содержащего 20 мМ Tris-HCl (pH=8,0), 150 мМ NaCl и 100 мкМ H₂O₂ (3 ч), а затем отмывали от перекиси двумя сменами буфера по 2 ч. Полученная после диализа смесь содержала около 40% димерной формы NCS-1 по данным ДСН-электрофореза. Колонку для гельфильтрации Superdex 200 10/300 GL (объем набитого носителя – 24 мл) предварительно уравновешивали 2-мя объемами буфера, содержащего 50 мМ Tris-HCl (pH=8,0), 150 мМ NaCl, 0,5 мМ ЭГТА, после чего наносили 200 мкл препарата NCS-1 со скоростью 0,5 мл/мин. За ходом хроматографии следили по изменению оптической плотности элюата при длине волны 280 нм с использованием программного обеспечения ÄKTAprime™ Plus (GE Healthcare). Полученные фракции димера объединяли, концентрировали до 1 мг/мл и хранили при -80°С. Чистота препарата димера NCS-1, полученного таким образом, составляла более 90%.

2.5.4. Исследование редокс-чувствительности NCS-1 в клеточной модели

2.5.4.1. Получение культуры клеток НЕК293, транзиентно экспрессирующих NCS-1

Эмбриональные клетки почки человека 293 (НЕК293) культивировали при 37°С в увлажненной атмосфере, содержащей 5% СО₂. Клетки растили в стерильных пластиковых флаконах или шестилуночных планшетах, используя среду DMEM (Thermo Fisher) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (PAN Biotech, Германия), 4 мМ L-глутамина, 4,5 г/л D-глюкозы, пенициллина и стрептомицина. Подсчет количества клеток и анализ их жизнеспособности проводили с помощью автоматического счетчика клеток Countess II (Thermo Fisher). Клетки смешивали с 0,4% водным раствором трипанового синего (1:1, о/о) и добавляли 10 мкл образца на одноразовый слайд, после чего помещали в прибор, считывающий количество клеток в 1 мл среды и соотношение (в %) живых и мертвых клеток. Для транзиентной трансфекции клеток генетической конструкцией, содержащей ген NCS-1, использовли набор TurboFect (Thermo Fisher) в соответствии с инструкцией производителя. А именно, 4 мкг плазмиды и 3 мкл трансфекционного реагента добавляли в каждую лунку планшета. Спустя 3 ч инкубации проводили смену питательной среды в планшете, удаляя избыток плазмиды и реагента. Уровень экспрессии экзогенного NCS-1 оценивали с помощью иммуноблоттинга.

2.5.4.2. Дисульфидная димеризация NCS-1 в клеточной модели окислительного стресса

Все эксперименты in vitro проводились спустя 48 ч после трансфекции. Для кратковременной инкубации (от 30 до 90 мин) перекись водорода, ионы кальция и цинка, а также соответствующие ионофоры и хелаторы добавляли в среду непосредственно. Для более продолжительных экспериментов, где предполагалось наблюдение за восстановлением клеток после окислительного стресса, H₂O₂ добавляли к клеткам, преинкубированным с MG132 или aypaнoфином (Sigma-Aldrich), ждали 30 мин, а затем производили смену среды, чтобы избавиться от H₂O₂. Затем клетки инкубировали 30, 60, 120 или 300 мин в присутствии среды, содержащей ауранофин или MG132. После эксперимента клетки ресуспендировали в среде, аккуратно пипетируя, чтобы собрать клетки с разных участков флакона. Ресуспендированные клетки центрифугировали при комнатной температуре. К осадкам добавляли лизисный буфер (50 мМ Tris-HCl, 100 мМ NaCl, 0,5% NP-40, pH=8,0) с содержанием 10 мМ иодацетамида для защиты восстановленных сульфгидрильных групп и коктейль ингибирования протеиназ (Sigma-Aldrich). Суспензии подвергали 3 циклам замораживания/оттаивания при -80°С, чтобы обеспечить разрушение клеток. Общую концентрацию белка в образцах измеряли по реакции бицинхониновой кислоты. К пробам добавляли буфер для ДСН-электрофореза без содержания β-меркаптоэтанола. Для определения доли димера и других окисленных форм NCS-1 в образцах объем проб. наносимых на гель, нормировали на содержание глицеральдегид-3-

93

фосфатдегидрогеназы (ГАФД) (определяли методом иммуноблоттинга). Затем содержание димера в пробе определяли методом денситометрического анализа полос на блоте.

2.5.5. Определение внутриклеточной локализации NCS-1 при окислительном стрессе

Клетки НЕК293, транзиентно экспрессирующие NCS-1, выращивали на стеклянных предметных стеклах в шестилуночных планшетах. Для выявления эффекта окислительного стресса на локализацию NCS-1 клетки инкубировали с 10 мМ H₂O₂ в течение 30 мин. Затем клетки один раз промывали PBS и фиксировали в 4% растворе параформальдегида в PBS в течение 10 мин при комнатной температуре. После фиксации клетки три раза промывали ледяным PBS в течение 5 мин на планшетном шейкере. Клетки пермеабилизровали раствором PBS с 0,1% Triton X-100 (10 мин, комнатная температура), отмывали и блокировали раствором 2% БСА в PBST (PBS+0,1% Tween-20) в течение 30 мин на планшетном шейкере. Клетки 1 ч инкубировали с антителами против NCS-1 в PBST с 2% БСА (1:300). После отмывки от первичных антител, клетки окрашивали вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентным красителем Alexa Fluor 555 (Thermo Fisher), в соответствии с инструкцией производителя. Для окрашивания актина клетки дополнительно инкубировали с флуоресцеинмеченным фаллоидином (Invitrogen, CША), а ядра визуализировали окрашиванием DAPI (BD Biosciences, США). Препараты заливали смесью Mowiol, накрывали покровным стеклом и хранили при 4°С. Анализ препаратов проводили на микроскопе Axio Imager D2, оборудованном камерой AxioCam 506 с использованием программного обеспечения Zen 2.6 (Carl Zeiss).

2.5.6. NCS-1 в модели апоптоза клеток ретинобластомы Y79

2.10.3.1 Селективное подавление эндогенной экспрессии NCS-1 в клетках Y79

Клетки ретинобластомы Y79 выращивали в среде RPMI-1640 (Gibco) с добавлением 20% телячьей эмбриональной сыворотки при 37°С и 5% CO₂. Для селективного подавления экспрессии NCS-1 с помощью специфичной интерференции использовали набор для трансфекции siRNA (Santa Cruz Biotechnology) в соответствии с инструкцией производителя: 1 мкг siRNA (NCS-1 или неспецифической siRNA-A из набора) и 6 мкг реагента для трансфекции смешивали со средой RPMI-1640 без добавления сыворотки в 6 луночном плашнете (финальный объем в каждой лунке составил 1 мл). Спустя 5 ч от реагента и избытка siRNA избавлялись, производя смену среды на свежую с добавлением 20% сыворотки. После 24 ч культивирования эффект PHK-интерференции оценивали методом иммуноблоттинга клеточных лизатов.

2.10.3.2. Исследования апоптоза Ү79

Спустя 24 часа после трансфекции клеток Y79 siRNA против NCS-1 к культуре добавляли H₂O₂ до конечной концентрации 10 мМ. Клетки инкубировали в течени 6 ч при 37°C, чтобы

индуцировать окислительный стресс. После этого маркеры апоптоза в клетках детектировали с использованием набора для проточной цитофлуориметрии PE Annexin V Apotosis Detection Kit I (BD Pharmingen, CША) в соответствии с инструкциями производителя. Проточную цитофлуориметрию проводили на цитометре BD LSRFortessa (BD Pharmingen, США), используя для анализа и визуализации данных встроенное программное обеспечение BD FACSDiva и FlowJo.

2.6. ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.6.1. Гистологические и морфометрические исследования сетчатки

2.6.1.1. Получение срезов сетчатки для гистологических исследований

Энуклеированные глаза быка и кролика фиксировали в растворе Карнуа (60% этанола, 30% хлороформа, 10% уксусной кислоты) в течение 1-3 ч. После фиксации глаза разрезали вдоль вертикального диаметра, отделяя их задние сегменты, содержащие сетчатку, хороид и склеру. Препараты отмывали этанолом и подвергали автоматизированной проводке на гистопроцессоре по стандартной методике [314]. После дегидратации этанолом и отмывки ксилолом образцы помещали в смесь для парафинизации Гистомикс (Биовитрум) в правильной ориентации. Из каждого блока получали сагиттальные срезы толщиной 4-7 мкм, захватывающие центральную область сетчатки. Срезы наносили на предметные стекла Menzel-Glaser (Thermo Fisher).

Для получения криосрезов сетчатки мышей-альбиносов в условиях общей анестезии подвергали прижизненной интракардиальной перфузии 4% раствором формалина (pH=7,4) [345]. От энуклеированных *post mortem* глаз животных отделяли задний сектор и помещали в раствор сахарозы для криопротекции, постепенно повышая концентрацию сахарозы с 10 до 30%. Затем образцы переносили в среду для замораживания (Leica, Германия) и помещали в жидкий азоте. Из полученных таким образом блоков изготавливали сагиттальные криосрезы толщиной 6 мкм.

2.6.1.2. Гистологический и морфометрический анализ сетчатки

Парафинизированные срезы заднего сектора глаза кролика депарафинизировали, регидратировали и окрашивали смесью гематоксилина Карацци и 0,5% раствора эозина Ү. Анализ срезов с пероксидазным окрашиванием проводили с помощью микроскопов LEICA DM 4000В (Leica) и AxioScope A1 (Carl Zeiss). Микрофотографии получали, используя камеры высокого разрешения Leica DFC400 и AxioCamMRc5. Для анализа срезов с флуоресцеиновым окрашиванием использовали флуоресцентный микроскоп Axiovert 200M (Carl Zeiss), оснащенный иммерсионным объективом Neofluar 100x/1.3 и ПЗС-камерой ORCAII-ERG2 (Нататаtsu Photonics, Япония). Обработку изображений выполняли с помощью программного обеспечения AxioVision 8.0 (Carl Zeiss) и Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems, CША). Толщину наружного ядерного слоя определяли на микрофотографиях, используя программу AxioVision 8.0. Измерения делались в двух точках, равноудаленных (1000 мкм) от проекции диска зрительного нерва в верхней и нижней полусферах сетчатки. Среднее между этими двумя величинами считали показателем средней толщины наружного ядерного слоя.

2.6.2. Иммуногистохимическая детекция NCS-1 и рековерина в сетчатке

Иммуногистохимическое окрашивание срезов сетчатки антителами против NCS-1 и рековерина производилось в соответствии с ранее описанными методиками [174, 346]. Парафинизированные срезы заднего сектора глаза быка инкубировали при 45°C в течение 1 ч, а затем подвергали депарафинизации путем обработки ксилолом (2 смены по 3 минуты) и 96% этанолом (2 смены по 3 минуты). Срезы регидратировали в PBS и демаскировку антигена выполняли путем кипячения в слабощелочном растворе Tris-ЭДТА (pH=9,1) в течение 30 мин. Для подавления внутренней пероксидазной активности срезы обрабатывали 3% раствором H₂O₂. Криосрезам сетчатки позволяли оттаять при комнатной температуре, заранее отметив границы срезов водостойким маркером. Срезы регидратировали в PBS и инкубировали с 1 мг/мл тетрагидробората натрия в течение 4 минут, чтобы снизить уровень автофлуоресценции сетчатки.

После подготовки оба типа срезов блокировали раствором 2% бычьего сывороточного альбумина в PBS. После отмывки от альбумина (5 смен PBS с добавлением 0,05% Tween-20 по 2 мин), срезы окрашивали антителами против NCS-1 (разведение 1:300) или рековерина (1:500) в течение 1 ч. В качестве контроля использовались срезы, к которым первичные антитела не добавлялись. Срезы отмывали от избытка первичных антител и инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (1:10), либо с флуоресцеином (1:50) (во втором случае окрашивание проводили в темноте). Затем срезы тщательно отмывали от избытка вторичных антитель и проводили детекцию антигена. В случае колориметрической детекции срезы в течение 3 мин обрабатывали раствором 0,05% диаминобензидина и 0,015% H₂O₂ в PBS. После этого срезы на 3 мин помещали в раствор гематоксилина Карацци в воде и таким образом визуализировали ядра и структуру ткани. В случае флуоресцентной детекции ядра окрашивали 40 мкг/мл пропидий-йодида в течение 5 мин. Окрашенные срезы заливали средой для микроскопии Mowiol (Calbiochem, CША) и после ее застывания исследовали методами световой и флуоресцентной микроскопии.

2.6.3. Детекция олигонуклеосомной деградации ДНК in situ (TUNEL assay)

Нейроны сетчатки, вступившие в апоптоз, идентифицировали методом, основанным на модификации 3'-концов двуцепочечных разрывов ДНК флуоресцентной меткой при участии концевой дезоксинуклеотидилтрансферазы (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling, TUNEL). Парафинизированные срезы заднего сектора глаза кролика окрашивали с

помощью набора для TUNEL с флуоресцеиновой меткой (Millipore) в соответствии с инструкцией производителя. А именно, после депарафинизации и регидратации срезы в течение 30 мин предобрабатывали протеиназой К, а затем инкубировали 2 ч при 37°C с реакционной смесью, содержащей концевую дезоксинуклеотидилтрансферазу и дУТФ, конъюгированный с биотином. Для окрашивания срезов затем использовали авидин, модифицированный флуоресцеином. Ядра клеток дополнительно окрашивались 1 мкг/мл синего флуоресцентного красителя DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, 4',6-диамидино-2-фенилиндол). Готовые препараты заливали смесью Mowiol и анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа.

2.7. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕДУРЫ

2.7.1. Электрофорез и иммуноблоттинг

2.7.1.1. Электрофорез ДНК в агарозном геле

Агарозу (0,8 г) плавили в 80 мл 40 мМ Tris-ацетатного буфера (pH=8,0), содержащего 2 мМ ЭДТА и 1 мкг/мл бромистого этидия. Золь охлаждали до 50-60°С и заливали в прибор для горизонтального электрофореза SE-1 (Хеликон). Пробы, содержащие ДНК, смешивали с шестикратным буфером для нанесения образцов (30% глицерин, 0,25% бромфеноловый синий, 0,25% ксиленцианол). Электрофорез проводили при напряжении 10 В/см. По окончании электрофореза ДНК визуализировали в ультрафиолетовом свете (254 нм). В качестве стандартов использовали набор фрагментов ДНК GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas).

2.7.1.2. Электрофорез в ПААГ

Электрофорез белков в полиакриламидном геле в присутствии ДСН проводили по методу Лэммли при концентрациях разделяющего и концентрирующего гелей, равных 15 и 5%, соответственно. Электрофорез проводили с использованием прибора «Эльф-4» («ДНКтехнология», Россия) при силе тока 20 мА в течение 1,5 часов. В качестве стандартов молекулярной массы белков использовался набор белков с молекулярными массами от 10 до 170 кДа PageRuler (Thermo Scientific, США). Белки в электрофоретическом геле окрашивали 0,2%ным раствором Кумасси синего R250, содержащим 10% уксусную кислоту и 40% этанол (о/о); гель отмывали от избытка красителя 10% уксусной кислотой.

2.7.1.3. Иммуноблоттинг

Иммуноблоттинг проводили в соответствии со стандартной методикой с некоторыми модификациями. Пробы подвергали ДСН-электрофорезу по методу Лэммли при концентрациях разделяющего и концентрирующего гелей, равных соответственно 12 и 5%. По завершении электрофореза белки переносили на поливинилидендифторидную мембрану Hybond-C Extra (Amersham) в буфере для переноса (20 мМ Tris, 192 мМ глицин, 20% метанол) при 300 мА в

течение 45 мин. Альтернативно использовали автоматизированную блот-систему Trans Blot Turbo (Bio-Rad). После этого мембрану последовательно инкубировали в 1% растворе сухого обезжиренного молока (Amersham) в буфере TBST (20 мМ Tris-HCl, pH=7,5, 150 мМ NaCl, 0,05% Tween 20), в растворе поликлональных (моноспецифических) антител против NCS-1, разведенных в 50000 раз буфером TBST, и в растворе конъюгированных с пероксидазой хрена антител против константной части иммуноглобулинов кролика (Santa Cruz Biotechnology), разведенных в соотношении 1:1000 буфером TBST. В каждом случае инкубацию проводили в течение 1 часа при комнатной температуре и слабом перемешивании; между инкубациями мембрану 4 раза промывали 5-10 мл TBST. Визуализацию белка проводили в системе гельдокументации ChemiDoc MP, используя набор для хемилюминисцентной реакции Enhanced Chemiluminescence Kit (Bio-Rad).

2.7.2. Масс-спектрометрия

2.7.2.1. Масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ)

Фрагмент полиакриламидного геля размером 3-4 мм3, содержащий образец белка, дважды промывали 100 мкл 40%-ного раствора ацетонитрила в 0,1 М NH₄HCO₃ в течение 20 мин при 37°С для удаления красителя. Раствор отбирали и проводили дегидратацию геля в присутствии 100 мкл ацетонитрила. Удалив ацетонитрил, фрагмент геля высушивали и добавляли к нему 4 мкл раствора модифицированного трипсина (Promega, США) в 0,05 M NH₄HCO₃ с концентрацией 15 мкг/мл. Гидролиз проводили в течение 5 ч при 37°С, после чего к раствору добавляли 8 мкл 0,5% ТХУ в 10% растворе водного ацетонитрила и тщательно перемешивали. Затем на МАЛДИмишени смешивали по 2 мкл надгелевого раствора и 0,5 мкл раствора 2,5-дигидроксибензойной кислоты (20 мг/мл в 20% водном ацетонитриле, 0,5% ТФУ), полученную смесь высушивали на воздухе. Масс-спектры были получены на МАЛДИ-времяпролетно-времяпролетном массспектрометре UltrafleXtreme (BrukerDaltonics, Германия), оснащенном УФ лазером (Nd) в режиме положительных ионов с использованием отражателя. Измерение моноизотопных масс после докалибровки по пикам автолиза трипсина было проведено с точностью до 0,005% (50 ррм). Спектры получали в диапазоне 700-4500 m/z, выбирая мощность лазера оптимальную для достижения наилучшего разрешения. Для получения спектров фрагментации использовали тандемный режим прибора, точность измерения фрагментных ионов была не менее 1 Да.

Масс-спектры были обработаны с помощью программного пакета FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics, Германия), созданы пик-листы htm формата. Идентификацию белков осуществляли, используя программу Mascot (www.matrixscience.com), помощью которой был проведен поиск кандидатных белков в базе данных NCBI среди белков всех организмов с указанной выше

точностью, с учетом возможного окисления метионинов кислородом воздуха и возможной модификации цистеинов иодоацетамидом или акриламидом геля. Достоверно определенными считали те кандидатные белки, которые характеризовались параметром достоверности (score) более 87 (р < 0,05).

2.7.2.2. Жидкостная хроматография/масс-спектрометрия с ионизацией электроспреем (LC/ESI-MS)

Состав препарата рекомбинантного NCS-1 анализировали методом масс-спектрометрии с ионизацией электроспреем. Белок диализовали против деионизированной воды и добавляли к пробе ацетонитрил и муравьиную кислоту до конечной концентрации 50% и 5 мМ, соответственно. Полученные образцы объемом 100 мкл, содержащие 5 мкг/мл белка загружали путем прямой инъекции со скоростью 40 мкл/мин в квадрупольный масс-спектромер Shimadzu LCMS-2010EV (Shimadzu Co., Япония). Масс-спектр регистрировали в режиме положительных ионов в диапазоне от 600 до 1400 m/z (скорость сканирования была 125 ед. атомной массы/с, напряжение в детекторе 1,5 кВ) с постоянной подачей азота со скорость 1,5 л/мин. Калибровку прибора проводили, используя лошадиный сердечный миоглобин.

2.7.3. Статистическая обработка данных

Статистическую обработку и визуализацию данных проводили в программном обеспечении SigmaPlot 11.0 (Systat Software, США). Данные, полученные по результатам не менее чем 3-х независимых повторностей, представлены в виде средних значений с планками погрешностей, обозначающими стандартную ошибку. Для определения статистической значимости различий между значениями использовали U-критерий Манна-Уитни, статистически значимыми считали р < 0,05.

2.8. МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДОКИНГ И МОДЕЛИРОВАНИЕ

2.8.1. Молекулярный докинг

Для поиска потенциального сайта связывания фосфатидилинозитол-3-фосфата (PI3P) в структуре NCS-1 использовали слепой гибкий докинг. Структуры лигандов (PI3P, PI4P, PI5P) подготавливали, используя пакет программ для моделирования Avogadro [347]. Хвосты жирных кислот обрезали до этила. Ансамбль из 20 рецепторных структур загружали из PDB (2LCP). Лиганды и рецепторы подвергали предобработке с помощью инструментария AutoDock Tools [347]. Докинг осуществляли с помощью программы QuickVina W, оптимизированной для докинга в полноразмерный белок [347]. Величина ячейки докинга составила 50×50 Å. Для каждой из 20 ЯМР-структур в ансамбле было предсказано 20 положений лиганда (всего 400 возможных

комплексов). Расчеты центров масс и их визуализация проводились с помощью программного обеспечения ODDT и PyMol Molecular Graphics System (Schrödinger, США).

2.8.2. Моделирование и молекулярная динамика КМ/ММ

Для предсказания Zn^{2+} -связывающих сайтов в структуре NCS-1 основные параметры, необходимые для координации иона цинка (расстояние и углы между катионом, координатором и одним из перечисленных ниже атомов), были определены на основе анализа массива из 6327 структур, доступных в базе PDB. В перечень возможных координаторов были включены следующие типы атомов: SG, ND1, NE2, OD1, OD2, OE1, OE2, OG, OG1, OH и остовный атом кислорода (O). Расстояние от катиона до хелатора было ограничено величиной 3 Å [348]. На основе полученных данных был выполнен поиск возможных Zn^{2+} -связывающих сайтов в структуре NCS-1 (PDB 5AEQ) [33]. Вначале были идентифицированы плотные кластеры вероятных координаторов цинка (клики в составе ненаправленного графа): а именно, не менее 3-х атомов на расстоянии не более 6 Å друг от друга. Для каждого выявленного координатора были предсказаны все возможные позиции связанного с ним иона цинка. В результате была получена карта вероятностной плотности связывания Zn^{2+} , из которой были исключены позиции, которые попадают в Ван-дер-Ваальсов радиус соседних атомов. Визуализация вероятностной плотности связывания Zn^{2+} , была выполнена с помощью инструментария РуМоl (Schrödinger, Inc., США).

Координаты иона цинка в определенных нами участках Ca²⁺-заполненных EF-hand-мотивов NCS-1 были рассчитаны исходя из потенциальной эффективности связывания катиона, которую определяли методом гибридного молекулярного моделирования КМ/ММ. В каждой из Ca²⁺связывающих петель было отобрано по два сайта связывания иона металла с наилучшей энергией на расстоянии не менее 3 Å друг от друга. В лучший из двух сайтов был помещен ион кальция, а второй сайт был заполнен ионом цинка. Три полученных системы были заполнены молекулами воды (модель TIP3P) с 0,1 М NaCl. Общий заряд системы нейтрализовали добавлением дополнительных ионов. Растворенный белок, ионы кальция и цинка были позиционно закреплены в системе, после чего была выполнена молекулярно-динамическая симуляция молекул воды с ионами натрия и хлора продолжительностью 100 пкс. На следующем этапе каждая система была разделена на подсистемы с молекулярной (MM) и квантовой (KM) механикой. Подсистема ММ описывалась скорректированными параметрами силового поля parm99-sb-ildn [349]. Подсистема КМ описывалась с использованием подхода DFTB (функционал плотности в приближении сильной связи, англ. density functional tight binding) и включала в себя все атомы (в т.ч. атомы молекул воды), на расстоянии менее 5 Å от иона кальция или цинка [350, 351]. Гибридизация подсистем ММ и КМ осуществлялась с использованием подхода ONIOM [352]. Для сохранения ненасыщенных структур в КМ-подсистеме в одиночные

С-С связи были внедрены атомы-связки. Подготовленные таким образом системы были подвергнуты молекулярно-динамической симуляции в каноническом NVT-ансамбле с шагом 0,2 фс. Температурное сопряжение осуществлялось по схеме Velocity Rescale, позволяющей моделировать поведение систем при 300 К [353]. Общая продолжительность каждой симуляции составила 30 пкс. Все симуляции выполнялись с использованием находящегося в свободном доступе пакета программ GROMACS/DFTB [354, 355].

III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА NCS-1 ФОТОРЕЦЕПТОРНОЙ КЛЕТКИ

3.1.1. Характеристика изоформного состава NCS-1 в сетчатке и мозге млекопитающих

Для ряда организмов, включая человека, показано существование нескольких изоформ NCS-1 и его ортологов, фреквенинов (см. раздел 1.2). Однако изоформный состав белка в сетчатке позвоночных животных на момент начала работы оставался неизученным. Поскольку разные варианты NCS-1 могут отличаться своей тканевой локализацией, уровнем экспрессии в течение жизни организма и даже набором белков-мишеней, прежде всего мы определили изоформный состав NCS-1 в сетчатке, а также (в качестве контроля) в мозге млекопитающих на примере быка и кролика – двух основных видов животных, используемых нами в качестве объектов исследования в настоящей работе.

3.1.1.1. Определение последовательности мРНК NCS-1 из образцов мозга и сетчатки млекопитающих

На момент начала настоящей работы структура полноразмерных генов NCS-1 для многих видов млекопитающих была неизвестна. В частности, в геномных последовательностях быка, доступных в базах данных NCBI и Ensembl, не были разрешены первый и второй экзоны, соответствующие первым 30 аминокислотным остаткам NCS-1, а последовательность гена NCS-1 кролика полностью отсутствовала. В связи с этим, мы впервые определили полную последовательность мРНК NCS-1 обоих животных. Для решения этой задачи был применен метод RACE, основанный на получении кДНК NCS-1, модифицированной с 5'-конца специальной адаптерной последовательностью, и последующей амплификации этой кДНК в ходе ПЦР с использованием набора олигонуклеотидных праймеров, комплементарных этой адаптерной последовательности, а также специфического праймера к известной из генома 3'концевой нетранслируемой области мРНК [317]. На основе препаратов тотальной мРНК из образцов мозга и сетчатки быка нам удалось получить полноразмерную кДНК NCS-1, амплифицировать ее и определить ее последовательность. Таким же образом были проанализированы транскрипты NCS-1 из мозга и сетчатки кролика. Выяснилось, что, несмотря на различия в последовательностях мРНК, полученных от обоих животных (Рис. 16А), с учетом вырожденности генетического кода соответствующие продукты трансляции будут совпадать между собой и полностью соответствовать ортологу человека (Рис. 16Б). Добавим, что разницы в последовательности транскриптов NCS-1 из образцов мозга и сетчатки выявлено не было.

			* 20 * 40 * 60 * 80 * 10	0
	Human Cow(brain)	1	ATGGGGAAATCCAACAGCAAGTTGAAGCCCGAAGTTGTGGAGGAGGAGCTGACCAGGAAGACCTACTTTACCGAGAAGGAGGTCCAGCAGTGGTACAAAGGC	г
	Cow(retina)	÷		
	Rabbit(brain) Rabbit(retina)	:	T. A. T. G. G. G. T. A. T. G. G. G.	•
	Rabbie (recina)	•		•
			* 120 * 140 * 160 * 180 * 20	0
	Human	:	tcatcaaggactgccccagtggggcagctggatgcggcaggcttccagaagatctacaagcaattcttcccgttcggagaccccaaccaa	г
	Cow(brain)	:	A	•
	Rabbit (brain)	÷	с	:
	Rabbit(retina)	:	C	•
			* 220 * 240 * 260 * 280 * 30	0
	Human Cow(brain)	:	TGTTTTCAACGTCTTTGATGAAAACAAGGACGGCCGAATTGAGTTCTCCCGAGTTCATCCAGGCGCTGTCGGTGACCTCCACGGGGAACCCTGGATGAGAA	3
	Cow(retina)	÷		
	Rabbit (brain)	÷		•
	Rabbit (retina)	•		•
			+ 220 + 240 + 260 + 280 + 40	0
	Human	:		A
	Cow(brain)	:	G	•
	Cow(retina) Rabbit(brain)	:		•
	Rabbit(retina)	:	GT	
			* 420 * 440 * 460 * 480 * 50	0
	Human	:	ATACCGTGGAGCTCCCAGAGGAGAGAACACTCCTGAGAAGAGGGTGGACCGGATCTTTGCCATGATGGATAAGAATGCCGGGAAGCTGACCCTGC	A
	Cow(brain) Cow(retina)		$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$:
	Rabbit (brain)	:	.CACCC	•
	Rabbit(retina)	:	.c	•
	Human	:	* 520 * 540 * 560	
	Cow(brain)	:		
	Cow(retina) Rabbit(brain)	÷	AAA	
	Rabbit(retina)	:		
Б				
			* 20 * 40 * 60 * 80 * 10	0
	Cow(brain)	-	WGKSNSKLKEVVELIKKIIFIELEVOUWIGFILDCFSQLDAAGFQALIAGFFFEDFIKFALFVENVFDENKDGALEFSEFIQALSVISGILDE MGKSNSKLKEVVELIKKIIFIEKEVOUWIGFLDCFSQLDAAGFOKIYKOFFFFGDFIKFATFVFNVFDENKDGALEFSEFIQALSVISGGIDE	K
	Cow(retina)	:	MGKSNSKLKPEVFUFTFEKEVQQWYKGFIKDCFSGDPTKFATFVFNVFDENKDGRIEFSGIDZAGGVMGFGDPKGGGDPKFATFVFNVFDENKDGRIEFSGDGDPKGGGGGGGGGG	K
	Rabbit(brain) Rabbit(retina)	÷	MGKSNSKLKPEVVEELTRKTYFTEKEVQQWYKGFIKDCPSQLDAAGFQKIYKQFPFGDPTKFATFVFNVFDENKDGRIEFSEFIQALSVTSRGTLDE MGKSNSKLKPEVVEELTRKTYFTEKEVQWYKGFIKDCPSQLDAAGFQKIYKQFEPEGDPTKFATFVFNVFDENKDGRIEFSEFIQALSVTSRGTLDE	K
		·	TOTOTOTOTOTOTOTOTOTOTOTOTOTOTOTOTOTOTO	
			* 120 * 140 * 160 * 180 *	
	Human	:	LRWAFKLYDLDNDGYITRNEMLDIVDAIYQMVGNTVELPEEENTPEKRVDRIFAMMDKNADGKLTLQEFQEGSKADPSIVQALSLYDGLV*	
	Cow(brain)	:	LRWAFKLYDLDNDGYITRNEMLDIVDAIYQMVGNTVELPEEENTPEKRVDRIFAMMDKNADGKLTLQEFQEGSKADPSIVQALSLYDGLV*	
	Rabbit(brain)		lewarkuiddinii innemidi voaiiqwysi velpedeni pervuki pervuki andiologi (velpedeskapsi voalslydglu* Lewarkuiddinosi innemidi voai qwysi velpedeni pervuki pambukadokli qepoeskapsi voalslydglu*	
	Rabbit(retina)	:	$\label{eq:linear} LRWAFKLYDLDNDGYITRNEMLDIVDAIYQMVGNTVELPEEENTPEKRVDRIFAMMDKNADGKLTLQEFQEGSKADPSIVQALSLYDGLV*$	

Рис. 16. Поиск изоформ NCS-1 в мозге и сетчатке млекопитающих на транскриптомном уровне. (А) Выравнивание последовательностей кДНК, полученных на основе мРНК NCS-1 из образцов мозга и сетчатки быка (*Bos taurus*) и кролика (*Oryctolagus cuniculus*). Показаны только те позиции, в которых наблюдаются расхождения с геном NCS-1 человека. (Б) Выравнивание продуктов трансляции соответствующих мРНК.

3.1.1.2. Анализ первичной последовательности NCS-1 из мозга и сетчатки млекопитающих

с помощью масс-спектрометрии

А

Далее анализ изоформного состава NCS-1 был осуществлен на протеомном уровне. С этой целью тотальный NCS-1 был выделен из экстрактов сетчатки и коры головного мозга быка и кролика и подвергнут гидролизу трипсином. Набор полученных пептидов был проанализирован методом MALDI-TOF масс-спектрометрии, и выяснилось, что их последовательности полностью соответствуют канонической структуре NCS-1 (Рис. 17).

		*	2	0	*	40		*	60	*	80	*	100
Cow(brain)	:	MGKSNSKLKPE	/VEELTRK	TYFTEKEV	VQQWYKGF	IKDCPSGQ	LDAAGFQ	KIYKQF	FPFGDPTK	FATFVFNV	FDENKDGRIEF	SEFIQALSV'	TSR GTLDEK
Cow(retina)	:	MGKSNSKLKPEV	/VEELTRK	TYFTEKEV	VQQWYKGF:	IKDCPSG	LDAAGFQ	KIYKQF	FPFGDPTK	FATFVFNV	FDENKDGRIEF	SEFIQALSV	TSRGTLDEK
Rabbit(brain)	:	MGKSNSKLKPE	VEELTRK	TYFTEKEV	VQQWYKGF.	IKDCPSG	LDAAGFQ	KIYKQF	FPFGDPTK	FATFVFNV	FDENKDGRIEF	SEFIQALSV	TSRGTLDEK
Rabbit(retina)	:	MGKSNSKLKPE	/VEELTRK	TYFTEKEV	VQQWYKGF.	IKDCPSG	LDATGFQ	KIYKQF	FPFGDPTK	FATFVFNV	FDENKDGRIEF	SEFIQALSV	TSR GTLDEK
		*	12	0	*	140		*	160	*	180	*	
Cow(brain)	:	LRWAFKLYDLDN	NDGYITRN	EMLDIVD	AIYQMVGN	TVELPEEE	NTPEKRV	DRIFAM	MDKNADGK	LTLQEFQE	GSKADPSIVQA	LSLYDGLV*	
Cow(retina)	:	LRWAFKLYDLDN	NDGYITRN	EMLDIVD	AIYQMVGN	TVELPEEE	NTPEKRV	DRIFAM	MDKNADGK	LTLQEFQE	GSKADPSIVQA	LSLYDGLV*	
Rabbit(brain)	:	LRWAFKLYDLDN	NDGYITRN	EMLDIVDA	AIYQMVGN	TVELPEEE	NTPEKRV	DRIFAM	MDKNADGK	LTLQEFQE	GSKADPSIVQA	LSLYDGLV*	
Rabbit(retina)	:	LRWAFKLYDLDN	NDGYITRN	EMLDIVD	AIYQMVGN	TVELPEEE	NTPEKRV	DRIFAM	MDKNADGK	LTLQEFQE	GSKADPSIVQA	LSLYDGLV*	

Рис. 17. Поиск изоформ NCS-1 в мозге и сетчатке млекопитающих на протеомном уровне. (А) Выравнивание аминокислотных последовательностей NCS-1, полученного из мозга и сечатки (*Bos taurus*) и кролика (*Oryctolagus cuniculus*). Красным отмечены участки последовательности, подтвержденные с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF триптических пептидов белка.

Таким образом, нами впервые были полностью разрешены последовательности мРНК NCS-1 быка и кролика. Согласно полученным результатам, NCS-1 обоих животных по своей первичной структуре идентичен NCS-1 человека из базы данных Uniprot (P62166). Несмотря на наличие протеомных и геномных данных, косвенно указывающих на существование альтернативных изоформ NCS-1, подтвердить их существование в общем случае в рамках настоящей работы не удалось. Такая выраженная консервативность структуры NCS-1 согласуется с фундаментальной ролью этого белка в жизнедеятельности нейронов.

3.1.2. Получение миристоилированной формы рекомбинантного NCS-1 и поликлональных моноспецифических антител

Для проведения дальнейших структурно-функциональных исследований NCS-1 было необходимо разработать методику получения достаточных количеств рекомбинантного белка, полностью соответствующего природному аналогу. До начала настоящей работы наработка NCS-1 (и других НКС), как правило, осуществлялась путем коэкспрессии его гена в бактериях с геном дрожжевой N-миристоилтрансферазы (NMT1p). Подобный подход позволял получать белок, котрансляционно модифицированный миристоильной группой, необходимой для его нормального функционирования в клетке (см. раздел 1.6.3). Однако степень миристоилирования NCS-1, экспресиируемого в бактериях, составляла лишь 50-70%, а в некоторых случаях - не достигала и 20% [13, 117, 146, 356]. Эта проблема может быть связана с тем, что NCS-1 позвоночных животных содержит неоптимальный сайт узнавания NMT1p, поскольку содержит положительно заряженный остаток лизина в 3-м положении [357, 358]. Недавно был предложен альтернативный метод получения NCS-1, который предполагает его экспрессию с шестью остатками гистидина С-конце, что позволяет впоследствии разделить миристоилированную и немиристоилированную формы белка за счет их разного сродства к Ni-аффинной сефарозе [311]. Однако ряд исследований, выполненных в нашей и других лабораториях, показывает, что структура С-концевого сегмента белков НКС критична для их Ca²⁺-зависимой активности и

включение остатков гистидина в С-концевую область NCS-1 может повлиять на его функциональные свойства [33, 34, 227, 269, 270, 274, 300]. Поскольку в рамках настоящей работы было принципиально получить рекомбинантный NCS-1, полностью соответствующий природному белку, от нас требовалось не только создать соответствующую экспресиионную конструкцию, но и разработать подход к хроматографической очистки миристоилированного NCS-1 от немиристоилированной формы без внесения в структуру белка дополнительных модификаций.

3.1.2.1. Клонирование гена NCS-1 в экспрессионный вектор

Генетическая конструкция для экспрессии NCS-1 была создана с использованием его полноразмерной кДНК, полученной на основе мРНК на предыдущем этапе работы. Для этого была выполнена амплификация кДНК с использованием двух специфичных олигонуклеотидных праймеров, содержащих сайты эндонуклеаз рестрикции NdeI и HindIII. Далее полученный фрагмент ДНК был встроен в бактериальный экспрессионный вектор pET-22b(+) в соответствии со схемой, приведенной на рисунке 18.



Рис. 18. Клонирование гена NCS-1 в экспрессионный вектор. Схема получения гена NCS-1 на основе препарата тотальной мРНК из сетчатки быка и встраивания его в плазмиду pET-22b(+) для бактериальной экспрессии. ДНК-электрофорез: (М) маркер длин фрагментов ДНК; (1) продукт ПЦР-амплификации кДНК NCS-1 (586 п.о.); (2) готовая (со вставкой) плазмида после инкубации с NdeI и HindIII; (3) исходная (без вставки) плазмида pET22b(+) (5493 п.о.).

3.1.2.2. Оптимизация условий бактериальной экспрессии и экстракции NCS-1

Экспрессия NCS-1 производилась путем химической трансформаци полученным вектором клеток E.coli штамма BL21(DE3)codon+, содержащего плазмиду pBB131 с геном NMT1p. После экспрессии NCS-1, индуцированной в соответствии со стандартным протоколом, было определено соотношение миристоилированной и немиристолированной форм белка в растворимой и нерастворимой фракциях, полученных в результате лизиса бактериальных клеток. По результатам иммуноблоттинга с использованием коммерческого препарата антител против NCS-1, NCS-1 распределялся примерно поровну между осадком и супернатантом (Рис. 19А). По ВЭЖХ колонке с обращенной фазой данным аналитической на общий уровень миристоилирования NCS-1 составлял 40-50%, причем в осадке степень миристолилирования составляла 80%, а в растворимой фракции – только 20% от тотального белка (Рис. 19Б, Таблица 2). С учетом этих данных процедура экспрессии была модифицирована с целью повысить уровень миристоилирования белка в бактериях. Самый выраженный эффект был достигнут при защелачивании питательной среды до pH=8: общий уровень миристоилирования при этом повысился до 60-70%. Добавим, что, поскольку значительная доля миристоилированного NCS-1 оставалось в нерастворимой форме, в дальнейшем выделение NCS-1 производилось и из осадка, полученного при лизисе бактерий, путем его растворения с использованием хаотропного агента (мочевины) и последующей ренатурации белка.



Рис. 19. Бактериальная экспрессия NCS-1. (А) Иммуноблот осадка (О) и супернатанта (С) лизата бактериальных клеток, экспрессирующих рекомбинантный NCS-1. (Б) ВЭЖХ-хроматограмма осадка бактериального лизата, содержащего NCS-1, при разделении в градиенте 30-60% ацетонитрила (пунктирная линия): (1) немиристоилированный NCS-1, (2) миристоилированный NCS-1.

3.1.2.3. Оптимизация хроматографической очистки NCS-1

Общепринятым первым этапом хроматографической очистки белков НКС является Ca²⁺зависимая гидрофобная хроматография на фенилсефарозе, которая основана на их способности обратимо экспонировать гидрофобный карман (сайт узнавания белков-мишеней) в ответ на связывание Ca²⁺ [264, 308, 359, 360]. Однако этот тип хроматографии плохо подходит для очистки NCS-1, поскольку разница в гидрофобности Ca²⁺-связанной и бескальциевой форм миристоилированного NCS-1 недостаточно велика, чтобы добиться полной элюции последнего с фенилсефарозы при хелатировании Ca²⁺ [300, 361]. Действительно, проведенный нами анализ показал, что в этом случае элюируется белок, миристоилированный лишь на 5-25%, в то время как большая часть модифицированного NCS-1 остается на колонке. Эффективное решение этой проблемы было достигнуто путем нанесения белка на колонку в растворе с высокой ионной силы в присутствии хелатора Ca²⁺ (Puc. 20). С помощью такого подхода нам удалось повысить степень миристоилирования белка, элюируемого с фенилсефарозы, до 40-60% (Таблица 2).



Рис. 20. Первичная хроматографическая очистка NCS-1. (A) Хроматограмма Ca²⁺-зависимой очистки NCS-1 на фенил-сефарозе. Условия элюции: (1) 2 мМ CaCl₂, 2 мМ MgCl₂, 1 M NaCl; (2) 2 мМ ЭГТА, 2 мМ MgCl₂, 0,2 M NaCl; (3) 2 мМ ЭГТА, 2 мМ MgCl₂; (4) деионизированная вода. (Б) Электрофорез фракций 1-4 в полиакриламидном геле.

Таблица 2. Чистота и степень миристоилирования	NCS-	1 на	разных этапах	очистки
--	------	------	---------------	---------

	Экспрессия		Очи	тка		
	Раствор	Осадок	Фенил-сефароза	Бутил-сефароза		
Содержание NCS-1, мг/л культуры	80	60	42	15		
Чистота, %	70	50	80	97		
Уровень миристоилирования, %	20	80	40-60	98		

Однако для полного удаления примеси немиристоилированной формы из препарата NCS-1 было необходимо использовать дополнительную стадию очистки, которая была впервые осуществлена с применением гидрофобной хроматографии на бутилсефарозе. В частности, было показано, что миристоилированная и немиристоилированная формы белка могут быть эффективно разделены путем их последовательной элюции с бутилсефарозы в ступенчатом градиенте NaCl (условия хроматографии приведены в Таблице 3). Стоит отметить, что

добавление этапа хроматографии на бутилсефарозе не только позволило увеличить степень миристолилирования NCS-1 до >95%, но и способствовало его более эффективной очистке (Рис. 21). Например, удалось отделить NCS-1 от протеолизированного фрагмента массой 18 кДа, который ранее часто обнаруживался в препаратах белка [31].



Рис. 21. Очистка NCS-1 от примеси немиристоилированного белка. (А) Хроматограмма очистки NCS-1 на бутил-сефарозе с использованием ступенчатого градиента концентраций NaCl (пунктирная линия): (1) 800-600 мМ; (2) 600-300 мМ; (3) 300-100 мМ; 100-0 мМ. (Б) Электрофорез фракций 1-4 в полиакриламидном геле.

Таблица 3. Содержание миристоилированной формы NCS-1 в хроматографических фракциях после очистки на бутил-сефарозе.

Уровень миристоилирования, %								
Исходный препарат	800 мM NaCl	600 мM NaCl	300 мM NaCl	100 мM NaCl	0 мM NaCl			
50	10	30	70	85	98			

3.1.2.4. Характеристика очищенного препарата миристоилированного NCS-1

Чтобы подтвердить соответствие NCS-1, полученного с помощью описанного нового похода, природному аналогу, далее был выполнен ряд аналитических исследований. Во-первых, методом LC/ESI-MS была подтверждена молекулярная масса белка. В качестве контроля использовался препарат немиристоилированного NCS-1, очищенного в соответствии с ранее описанной стандартной методикой [362]. Учитывая, что миристоилирование происходит по остатку G2 белка после удаления N-концевого остатка метионина, расчетная масса миристоилированного NCS-1 должна составлять 21957,53 Да [363]. В наших препаратах средняя молекулярная масса белкового продукта составляла 21957 Да, т.е. полученный NCS-1 оказался полностью идентичным природному. Во-вторых, с помощью анализа спектральных свойств NCS-1 были подтверждены структурная целостность и Ca²⁺-чувствительность очищенного белка. Известно, что спектр собственной флуоресценции NCS-1 позволяет оценить мобильность и
полярность локального окружения остатков W30 и W103, расположенных в его N- и C-концевом доменах. В частности, положение максимума спектра демонстрирует выраженный красный сдвиг при повышении температуры, что отражает термическую денатурацию белка. При этом Ca^{2+} связывание сопровождается одновременно коротковолновым сдвигом спектра (соответствует погружению излучающих остатков триптофана внутрь белковой глобулы) и значительным повышением температуры денатурации белка (Т_{1/2}), что отражает стабилизацию его третичной структуры. Как видно из Рис. 22, препараты белка, выделенные новым методом из растворимой и нерастворимой (путем рефолдинга) фракций бактериального лизата, по своим спектральным характеристикам не отличаются друг от друга, а также обладают третичной структурой и Ca²⁺-связывающими свойствами, соответствующими природному аналогу.



Рис. 22. Характеристика полученного рекомбинантного NCS-1. (А) ВЭЖХ-хроматограмма очищенного NCS-1 при разделении в градиенте 30-60% ацетонитрила (пунктирная линия). (Б) Профили термической денатурации миристоилированного NCS-1, выделенного из супернатанта (С) и осадка (О) бактериального лизата в зависимости от присутствия ионов кальция.

3.1.2.5. Получение антител против NCS-1

Помимо препаратов очищенного белка для проведения дальнейших исследований сетчаточного NCS-1 в физиологических условиях, в том числе, определения его локализации, было необходимо получить поликлональные моноспецифические антитела против этого белка. Одним из важнейших требований к антителам было отсутствие кросс-реактивности в отношении других НКС, которые также присутствуют в сетчатке. Для решения этой задачи нами была проведена иммунизация кроликов очищенным препаратом миристоилированного NCS-1, полученным на предыдущем этапе работы. Выделение целевых антител из гипериммунной сыворотки производили с использованием аффинной хроматографии на носителе с иммобилизованным антигеном – рекомбинантным NCS-1. Важно отметить, что полученную фракцию иммуноглобулинов дополнительно очищали на колонке с иммобилизованным NCS-1. В результате произведенных процедур нам удалось получить антителам, которые эффективно окрашивают NCS-1 как методом иммуноблоттинга (в денатурированном состоянии),

так и методом иммуноферментного анализа (данные не показаны). При этом показано отсутствие реакции с другими фоторецепторными НКС – рековерином, GCAP1 и GCAP2, что говорит о высокой специфичности целевой иммунодетекции.

3.1.3. Определение локализации NCS-1 в сетчатке млекопитающих

Как уже говорилось ранее, за пределами центральной нервной системы наибольшее содержание NCS-1 было выявлено в сетчатке глаза, что подразумевает наличие у этого белка функции в зрительной системе. В то же время, до начала настоящей работы данные о распределении NCS-1 в нейронах этой ткани оставались противоречивыми [174]. Для решения этой проблемы с использованием иммуногистохимического анализа нами была подробно охарактеризована локализация NCS-1 в сетчатке двух видов млекопитающих: быка (основной объект исследования настоящей работы) и мыши – одного из важнейших видов лабораторных животных.

3.1.3.1. Иммуногистохимическая детекция NCS-1 в сетчатке млекопитающих

Локализация NCS-1 в сетчатке быка исследовалась с использованием сагиттальных парафинизированных срезов заднего сектора глаза, которые были получены в соответствии с методикой, разработанной нами ранее для гистологических исследований [314]. Окрашивание срезов производилось с помощью поликлональных моноспецифических антител против NCS-1, полученных на предыдущем этапе работы. В качестве контроля срезы окрашивались поликлональных моноспецифических антител против NCS-1, полученных на предыдущем этапе работы. В качестве контроля срезы окрашивались поликлональными моноспецифическими антителами против рековерина, обладающего характерной локализацией в фоторецепторах сетчатки (наружные и внутренние сегменты, тела клеток и синаптические окончания). Специфическая детекция обоих белков в с помощью вторичных антител, коньюгированных с флуоресцеином, оказалась невозможной из-за выраженной автофлуоресценции хромофоров, присутствующих в клетках этой ткани. В связи с этим, был применен альтернативный подход – иммунодетекция вторичными антителами, коньюгированными с пероксидазой хрена (Рис. 23А). С Было обнаружено, что NCS-1 локализуется в слое ганглиозных клеток, наружном и внутреннем плексиформных слоях, а также в слое фоторецепторов, причем впервые было продемонстрировано присутствие NCS-1 в наружных сегментах фоторецепторных клеток.





Для определения локализации NCS-1 в сетчатке мыши был применен альтернативный метод фиксации – прижизненная транскардиальная перфузия животного раствором формалина. Чтобы увеличить доступность антигена, вместо парафинизированных срезов в использовались криосрезы заднего сектора глаза. В этом случае специфический сигнал NCS-1 удалось детектировать не только с помощью вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, но и с применением флуоресцеиновых конъюгатов за счет подавления автофлуоресценции сетчатки тетрагидроборатом натрия. Продемонстрировано, что NCS-1 присутствует в биполярных и ганглиозных клетках, а также в фоторецепторах (Рис. 23Б). При этом наиболее выраженное окрашивание наблюдалось в плексиформных слоях (синапсах), а также во внутренних сегментах фоторецепторов, что полностью согласуется с результатами, полученными для образцов сетчатки быка. Необходимо отметить, что как у быка, так и у мыши, NCS-1 полностью отсутствует в ядрах нейронов, что косвенно указывает на достоверность проведенных исследований. При этом в обоих случаях впервые зафиксировано умеренное, но специфическое окрашивание NCS-1 в наружных сегментах фоторецепторных клеток. В подтверждение полученных иммуногистохимических данных методом иммуноблоттинга NCS-1 обнаружен в изолированных наружных сегментах палочек, выделенных из сетчатки быка методом фракционирования в градиенте сахарозы (Рис. 23В).

В совокупности полученные данные впервые указывают на то, что фоторецепторные клетки сетчатки млекопитающих экспрессируют единственную изоформу NCS-1, которая имеет каноническую структуру и локализуется в синапсах и телах этих нейронов, а также в их наружных сегментах, где возможна компартментализация белка с компонентами зрительного каскада.

3.1.4. Характеристика связывания NCS-1 с фоторецепторными мембранами и их компонентами

Одним из ключевых свойств NCS-1 является способность компартментализоваться с мишенями в клетке за счет связывания с мембранами различных органелл (см. раздел 1.6.6). Предполагается, что специфичность этого связывания обеспечивается его чувствительностью к фосфолипидному составу мембран [309, 310]. Фоторецепторные нейроны представляют собой высокодифференцированную сенсорную систему, построенную вокруг зрительного рецептора родопсина, присутствующего в составе стопки мембранных дисков (фоторецепторных мембран), которые отличаются уникальным липидным и белковым составом [364]. С учетом того, что NCS-1 обнаружен нами в наружных сегментах фоторецепторов впервые, а среди его мишеней обычно преобладают мембранные белки, далее нами была изучена способность этого белка взаимодействовать с фоторецепторными мембранами.

112

3.1.4.1. Характеристика связывания NCS-1 с нативными фоторецепторными мембранами

Исследование мембранной ассоциации NCS-1 производилось методом равновесного центрифунгирования с использованием фоторецепторных мембран, отмытых мочевиной, а также, в качестве контроля, мембран гиппокампа – отдела мозга, особенно богатого этим белком [40, 78, 365]. Оба вида мембран содержат фосфатидилхолин (ФХ) и фосфатидилэтаноламин (ФЭ) в равных пропорциях (около 40% от общего содержания фосфолипидов), но заметно отличаются по содержанию отрицательно заряженных фосфолипидов. Так, фосфатидилсерин (ФС) и фосфатидилинозитол (ФИ), а также производные последнего – фосфоинозитиды – составляют 16-25% от общего фосфолипидного состава в фоторецепторных мембранах и лишь 5-10% в мембранах гиппокампа [366, 367]. Установлено, что миристоилированный NCS-1 связывается с фоторецепторными и гиппокампальными мембранами с примерно одинаковой эффективностью (Рис. 24А), причем в обоих случаях Ca²⁺-зависимость взаимодействия выражена слабо: Ca²⁺-связанная форма связывается лишь на 20% эффективнее бескальциевой.



Рис. 24. Связывание NCS-1 с очищенными мембранами. (А) Миристоилированный и немиристоилированный NCS-1 после соосаждения с отмытыми мочевиной фоторецепторными (ФМ) и гиппокампальными (ГМ) мембранами на фоне присутствия/отсутствия Ca²⁺: (1) электрофореграмма; (2) иммуноблот. (Б) Эффективность связывания NCS-1 с мембранами в % от добавленного белка, рассчитанная по результатам денситометрического анализа блотов. *p < 0,05 относительно связывания в присутствии Ca²⁺, # – в отсутствие Ca²⁺.

Интересно, что, хотя наличие миристоильной критично для мембранной ассоциации NCS-1 в клеточных моделях [368], в наших экспериментах немиристоилированный белок соосаждается с мембранами обоих типов, хотя эффективность этого взаимодействия в 2-4 раза ниже, чем у его миристоилированной формы (Рис. 24Б). Интересно, что в случае мембран гиппокампа эффективность связывания зависит от наличия миристоильной группы сильнее, чем в случае фоторецепторных мембран. Поскольку фоторецепторные мембраны содержат намного больше отрицательно заряженных фосфолипидов, мы предположили, что в отсутствие миристоильной группы NCS-1 может связывается с отрицательно заряженной поверхностью этих мембран за счет специфических участков в молекуле белка. Очевидно, что это связывание буде менее выражено в случае мембран гиппокампа.

3.1.4.2. Характеристика связывания NCS-1 с липосомами

Чтобы оценить вклад основных фосфолипидов в связывание NCS-1 с мембранами, далее было определено сродство белка к ФС, ФХ, ФЭ и ФИ. Для этого был произведен мониторинг взаимодействия флуоресцентно-меченого NCS-1 с мультиламеллярными липосомами, приготовленными на основе каждого из указанных фосфолипидов. Установлено, что сродство миристоилированного белка к фосфолипидам снижается в ряду $\Phi C > \Phi U > \Phi X > \Phi A$, при этом ФС связывается в 5 раз более эффективно, чем ФЭ. Как и в случае с очищенными клеточными мембранами, Ca²⁺-зависимость связывания NCS-1 с липосомами выражена слабо (Рис. 25А). В отсутствие миристоильной группы взимодействие с мембранами ослабляется примерно в 10 раз, однако выраженное предпочтение к ФС сохраняется (Рис. 25Б). Необходимо отметить, что связывание NCS-1 с ФИ сильнее зависит от наличия миристоильной группы, чем связывание с ФС, что может говорить о разных механизмах взаимодействия NCS-1 с этими фосфолипидами. Титрование комплекса Ca²⁺-связанного миристоилированного NCS-1 с липосомами из ФИ возрастающими концентрациями немеченного белка позволило определить его K_D как 3 мкМ (Рис. 25В), что согласуется с оценками тотальной концентрации NCS-1 в мозге и сетчатке [38].



Рис. 25. Связывание NCS-1 с липосомами по данным флуоресцентной корреляционной спектроскопии (ФКС). Связывание сульфоцианин-меченного миристоилированного (А) и немиристоилированного (Б) NCS-1 с липосомами из фосфатидилсерина (ФС), фосфатидилхолина (ФХ), фосфатидилэтаноламина (ФЭ) и фосфатидилинозитола (ФИ). Эффективность связывания представлена как число регистрируемых пиков ФКС свыше 0,4 МГц. *p < 0,05 относительно связывания в присутствии Ca²⁺. (В) Титрование сульфоцианин-меченного NCS-1, связанного с липосомами из ФИ, препаратом NCS-1, не содержащего флуоресцентной метки.

3.1.4.3. Характеристика связывания NCS-1 с отдельными фосфолипидами

Как известно, ФС может выступать в роли привлекающего фактора для сигнальных белков, обеспечивая их колокализацию с фосфоинозитидами – компонентами различных сигнальных путей [369, 370]. Для того чтобы более детально охарактеризовать взаимодействие NCS-1 с подобными компонентами мембраны, мы использовали метод дот-блоттинга, позволяющий

исследовать связывание белка как с основными, так и с минорными фосфолипидами, иммобилизованными на специальной подложке (Рис. 26А). Как видно, миристоилированный NCS-1 демонстрирует слабое сродство к ФЭ и ФХ, но связывается с отрицательно заряженными ФС и фосфатидной кислотой, что согласуется с данными, полученными методом флуоресцентной корреляционной спектроскопии. Однако наиболее выраженное сродство NCS-1 демонстрирует к монофосфатным производным ФИ – PI3P и PI5P. Эти молекулы относятся к т.н. «редким» или «сигнальным» фосфоинозитидам: они могут высокоспецифично распознаваться белками и способствовать их организации в сигнальные домены на поверхности мембран [371]. По нашим данным, сродство NCS-1 к PI3P примерно в 6 раз выше, чем к PI(4,5)P₂, который составляет около половины от всех фосфоинозитидов в клетке [372]. В целом, эффективность связывания NCS-1 с фосфоинозитидами снижается в ряду PI3P > PI5P > PI(3,5)P₂ \approx PI(4,5)P₂ \approx PI(3,4,5)P₃ \approx PI(3,4)P₂ > PI4P, причем это свойство белка не зависит от присутствия миристоильной группы (Рис. 26Б).



Рис. 26. Связывание NCS-1 с фосфоинозитидами. (А) Репрезентативные дот-блоты миристоилированного и немиристоилированного NCS-1, связанного с фосфолипидами, иммобилизованными на нитроцеллюлозной мембране. 1 – лизофосфатидилхолин, 2 – фосфатидилинозитол, 3 – PI3P, 4 – PI4P, 5 – PI5P, 6 – фосфатидилэтаноламин, 7 – фосфатидилхолин, 8 – PI(3,4)P₂, 9 – PI(3,5)P₂, 10 – PI(4,5)P₂, 11 – PI(3,4,5)P₃, 12 – фосфатидная кислота, 13 – фосфатидилсерин, 14 – контроль (пустой дот). (Б) Относительная эффективность связывания миристоилированного и немиристоилированного NCS-1 с фосфоинозитидами в % от контроля (PI3P), рассчитанная по результатам денситометрического анализа дот-блотов.

Интересно, что в клетках нервной системы NCS-1 и PI3P в значительной степени перекрываются по своей локализации и функции. Так, NCS-1 является модулятором синтеза фосфоинозитидов (см. раздел 1.4.5). Обе молекулы локализуются в транс-Гольджи и синапсах, где участвует в регуляции транспорта и секреции [104, 128, 373, 374]. Более того, и PI3P, и NCS-1, играют ключевую роль в механизмах выживания нейронов [375]. Соответственно, недавно было обнаружено, что недостаток PI3P как и нарушения экспрессии NCS-1 ассоциированы с дегенерацией нейронов при болезни Альцгеймера [258, 376]. Важно, PI3P широко представлен и

в фоторецепторной мембране, где он вовлечен в светозависимую регуляцию транспорта зрительного рецептора родопсина и ряд других процессов [377-379]. Таким образом, комплекс NCS-1 с PI3P может быть важным для функционирования фоторецепторной системы.

В целом, можно заключить, что NCS-1 способен эффективно связываться с фоторецепторными мембранами вне зависимости от присутствия Ca²⁺, отдавая предпочтение отрицательно заряженным и сигнальным фосфолипидам, что предполагает его участие в фосфоинозитид-зависимой сигнализации.

3.1.5. Поиск потенциальных регуляторных мишеней NCS-1 в фоторецепторной клетке

Как известно, NCS-1 принимает участие в регуляции широкого спектра Ca²⁺-зависимых сигнальных процессов в нейронах, связывая свыше 20-ти различных белков. Чтобы определить функцию NCS-1 в фоторецепторах, прежде всего, необходимо было выявить его потенциальных сигнальных партнеров среди фоторецепторных белков. Поиск осуществляли методом прямого и непрямого молекулярного фишинга среди всех растворимых белков экстракта сетчатки, после чего проводили отбор белков, способных колокализоваться с NCS-1 в фоторецепторах.

3.1.5.1. Поиск потенциальных мишеней NCS-1 в сетчатке

На первом этапе был идентифицирован набор белков сетчатки, способных связываться с NCS-1 Ca²⁺-зависимым образом. Для этого была создана химерная конструкция, в которой ген NCS-1 слит в единой рамке считывания с глутатион-S-трасферазой (GST-NCS-1). Выделенный белковый продукт иммобилизовали на глутатионсефарозе и на полученном таким образом носителе проводили Ca²⁺-зависимую хроматографию экстракта сетчатки быка, включающую посадку беков в присутствии Ca²⁺ и их элюцию буферным раствором, содержащим ЭГТА. Очищенные в процессе хроматографии белки разделяли методом одномерного электрофореза (Рис. 27А) и идентифицировали с помощью МАЛДИ масс-спектромерии соответствующих триптических гидролизатов. В результате удалось идентифицировать четыре белка – родопсинкиназу (G-protein coupled receptor kinase-1, GRK1), зрительный аррестин, межфоторецепторный ретиноидсвязывающий белок (IRBP, interphotoreceptor retinoid-binding protein) и тубулин-β2А (Таблица 4). Кроме того, методом иммуноблоттинга среди полученных белков был идентифицирован рековерин.

В качестве альтернативного подхода для поиска мишеней NCS-1 использовали метод иммуноаффинной хроматографии (непрямой фишинг). В частности, производилась очистка комплексов NCS-1 с мишенями из экстракте сетчатки быка с использованием носителя, содержащего антитела против NCS-1, иммобилизованные на BrCN-активированной сефарозе (Рис. 27Б). С использованием этого подхода было выявлено девять белков, взаимодействующих с NCS-1 Ca²⁺-независимым образом (Таблица 4). Среди них регуляторы транскрипции (два белка

116

из комплекса SWI/SNF и гомолог белка CLE7), цитоскелеторный белок виментин, глутаминсинтетаза, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД), субъединица D вакуолярной H⁺-АТФазы, рековерин и белок S13 40S рибосомы.

Образец	№	Белки, соосаждающиеся с NCS-1	Масса, Да	Покрытие, %	Uniprot ID
Сетчатка быка					
Са ²⁺ -зависимые мишени	1	межфоторецепторный ретиноид-связывающий белок (IRBP)	139698	28	P12661
	2	родопсинкиназа†	62894	19	P28327
	3	тубулин-β2А†	49907	23	Q13885
	4	зрительный аррестин†	45275	55	P08168
	5	рековерин†	23319	идентифицир	ован методом
				иммуноб	лоттинга
Са ²⁺ -независимые мишени	6	субъединица SMARCC2 комплекса SWI/SNF	132797	16	Q8TAQ2
	7	виментин	53695	44	P48616
	8	ассоциированный с SWI/SNF матрикс-связанный актин- зависимый регулятор хроматина-1 из полсемейства Е	46621	26	Q969G3
	9	глутаминсинтаза	42004	22	P15103
	10	глицеральдегидфосфат дегидрогеназа†	35845	19	P10096
	11	субъединица D вакуолярной Н ⁺ -АТФазы	28245	31	P39942
	12	гомолог белка CLE7	28051	53	Q9Y224
	13	рековерин†	23319	30	P21457
	14	субъединица рибосомы S13	17212	30	Q56JX8
Сетчатка кролика Са ²⁺ -независимые мишени	10	глицеральдегидфосфат	25757	17	D46404
	-1-	дегидрогеназат	33/3/	1 /	P40400

Таблица 4. Потенциальные мишени фоторецепторного NCS-1, идентифицированные с помощью масс-спектрометрии.

† Белки, способные ко-локализоваться с NCS-1 в фоторецепторах.



Рис. 27. Поиск мишеней NCS-1 среди белков сетчатки. (А) Электрофореграмма белков из растворимой фракции экстракта сетчатки быка, Ca²⁺-зависимым образом соосаждающихся с иммобилизованным GST-NCS-1: 1 – IRBP, 2 – родопсинкиназа, 3 – тубулин-β2A, 4 – зрительный аррестин, 5 – рековерин. (Б) Электрофореграмма белков из экстракта сетчатки быка (B. taurus) и Ca²⁺-независимым cuniculus). соочищающихся образом кролика *(O.* с NCS-1 иммуноаффинном сорбенте: 6 – субъединица SMARCC2 комплекса SWI/SNF, 7 – виментин, 8 – ассоциированный с SWI/SNF матрикс-связанный актин-зависимый регулятор хроматина-1 из подсемейства Е, 9 – глутаминсинтаза, 10(*) – глицеральдегидфосфатдегидрогеназа, 11 – субъединица D вакуолярной H⁺-АТФазы, 12 – гомолог белка CLE7, 13 – рековерин, 14 – субъединица рибосомы S13. IgG – тяжелая цепь первичных антител против NCS-1.

3.1.5.2. Доказательство комплексов NCS-1 с выявленными потенциальные мишени

Для того чтобы подтвердить способность NCS-1 взаимодействовать с отобранными белками, а также охарактеризовать параметры соответствующих комплексов, мы использовали биосенсорный подход, основанный на явлении поверхностного плазмонного резонанса (т.н. спектроскопия поверхностного плазмонного резонанса или ППР-спектроскопия). Поскольку подлобные эксперименты предполагают применение гомогенных белков, с использованием ранее полученных генетических конструкций нами были наработаны в бактериях и очищены препараты рековерина, зрительного аррестина и тубулина-β2А (в случае ГАФД использовался коммерческий препарат белка). Поскольку полноразмерный препарат родоспинкиназы не мог быть получен таким образом из-за отсутствия правильного фолдинга и необходимых модификаций в бактериях, мы сконструировали и получили химерный белок, представляющий собой два регуляторных домена родопсинкиназы (N-концевой 1-181 и C-концевой 512-557), соединенных линкерной последовательностью GSGS ("GRK1^{N-C}").

Выяснилось, что рековерин, ГАФД и тубулин-β2А не демонстрируют специфичного взаимодействия с NCS-1, по-видимому, соосаждаясь с ним в экспериментах по прямому и непрямому фишингу по причине высокого содержания в сетчатке. В отличие от этого, родопсинкиназа и аррестин по данным ППР-спектроскопии действительно способны образовывать высокоафиинные комплексы с NCS-1 (Рис. 28А-Б). Так, при анализе данных с

использованием модели «гетерогенного лиганда» (учитывает дополнительное низкоаффинное связывание из-за неоптимальной иммобилизации белка на ППР-чипе), в случае аррестина константа диссоциации составила порядка 200 нМ, а в случае GRK1^{N-C} – 590 нМ (Таблица 5). Важно отметить, что если с родопсинкинзаой связывалась Ca²⁺-заполенная форма NCS-1, с аррестином взаимодействовала только апо-форма этого белка, которая отсутствует в клетке в связи с высоким сродством NCS-1 к ионам магния и кальция. С учетом этого, аррестин был исключен нами из дальнейшего рассмотрения.



Рис. 28. Связывание NCS-1 с выявленными фоторецепторными мишенями. ППРсенсограммы взаимодействия различных концентраций (A) Ca²⁺-связанного NCS-1 с иммобилизованным химерным белком GRK1^{N-C}; (Б) зрительного аррестина с иммобилизованным апо-NCS-1.

Таблица 5. Связывание NCS-1 с выявленными фоторецепторными мишенями по данным спектроскопии ППР.

Мишень	kon1, c ⁻¹ M ^{-1*}	koff1, c ⁻¹	Kd1, M	kon2, c ⁻¹ M ⁻¹	k_{off2}, c^{-1}	Kd2, M
GRK1 ^{N-C}	267±22	(1,58±0,63) ×10 ⁻⁴	(5,85±2,03) ×10 ⁻⁷	1910±650	(4,38±1,54) ×10 ⁻³	(2,65±1,78) ×10 ⁻⁶
Аррестин	935±209	(1,87±0,05) ×10 ⁻⁴	(2,00±0,50) ×10 ⁻⁷	742±47	(4,12±0,12) ×10 ⁻³	(5,55±0,51) ×10 ⁻⁶

*Кинетические (kon/koff) и равновесные (KD) параметры комплексов рассчитаны по модели гетерогенного лиганда.

3.1.5.3 Характеристика и механизм регуляторной активности NCS-1 в отношении родопсинкиназы

Для определения физиологического значения обнаруженного комплекса NCS-1 с родопсинкиназой мы проверили, насколько исследуемый кальциевый сенсор будет оказывать влияние на основную физиологическую активность этого фермента, которая заключается в светозависимом фосфорилированим зрительного рецептора родопсина [380]. Потенциальный регуляторный эффект NCS-1 был изучен с использованием реконструированной системы, включающей в себя темноадаптированные фоторецепторные мембраны, содержащие родопсин, и очищенную родопсинкиназу. Оказалось, что Ca^{2+} -NCS-1 ингибирует активность родопсинкиназы почти на 75%, причем этот эффект полностью исчезает при хелатировании Ca^{2+} (Рис. 29А).



Рис. 29. Регуляция активности родопсинкиназы под действием NCS-1. (A) Фосфорилирование родопсина в реконструированной системе, содержащей фоторецепторные мембраны, у-³²Р-АТФ, рекомбинантную родопсинкиназу, NCS-1/рековерин: эффективность фосфорилирования определена методом денситометрического ³²Pанализа радиоафтографических снимков. (Б) Ca²⁺-зависимое аффинное соосаждение NCS-1 и рековерина родопсинкиназы составе химерного белка GST-GRK1¹⁻²⁵, фрагментом 1-25 В с иммобилизованного на глутатионсефарозе.

Поскольку ингибирование родопсинкиназы под действием NCS-1 происходит практически так же эффективно, как и под действием доказанного регулятора фермента – рековерина – мы предположили, что механизм ингибирования в случае этих белков является сходным и происходит за счет связывания N-концевого участка 1-25 регуляторного домена фермента [301]. Для проверки этого предположения мы получили фрагмент родопсинкиназы 1-25 в виде химерного белка с GST ("GST-GRK1¹⁻²⁵"). По данным метода аффинного соосаждения, NCS-1 действительно способен связывать указанный фрагмент родопсинкиназы, причем связывание происходит только в присутствии Ca²⁺ (Рис. 29Б). Таким образом, мы впервые продемонстрировали, что Ca²⁺-зависимое ингибирование родопсинкинзы под действием NCS-1 происходит за счет образования высокоаффинного комплекса белка с N-концевым доменом фермента. Добавим, что в 2015 году одновременно с публикацией полученных нами результатов в литературе была впервые представлена трехмерная структура комплекса NCS-1 с соответствующим фрагментом родопсинкиназы, которая полностью подтвердила сделанный нами вывод [33].

По результатам проведенной работы можно заключить, что родопсинкиназа является наиболее вероятной Ca²⁺-зависимой сигнальной мишенью NCS-1 в фоторецепторной клетке, причем ее ингибирование происходит за счет связывания N-концевого участка 1-25 регуляторного домена фермента.

2.2. СПЕЦИФИЧНОСТЬ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ NCS-1 В ФОТОРЕЦЕПТОРНОЙ КЛЕТКЕ

До начала настоящей работы считалось общепризнанным, что Ca²⁺-зависимая регуляция родопсинкиназы происходит при участии рековерина – еще одного НКС, гомологичного NCS-1 (78% сходства, 43% идентичности). Поскольку по нашим данным NCS-1, также как и рековерин, ингибирует родопсинкиназу, связываясь с ее N-концевым участком, возникает вопрос, зачем в фоторецепторной клетке два регулятора фосфорилирования родопсина, причем работающих по одному и тому же механизму? Мы предположили, что эти белки могут функционировать в разных условиях, возникающих внутри клетки. Чувствительность к таким условиям может определяться, прежде всего, их разной аффинностью к сигнальным катионам. Действительно, по сравнению с рековерином NCS-1 обладает на два порядка большим сродством к Ca^{2+} и, следовательно, может реагировать даже на небольшие повышения его концентрации в фоторецепторной клетке [288]. Кроме того, подобные различия могут быть обусловлены механизмами мембранной ассоциации. Так, рековерин разными связывается с фоторецепторными мембранами обратимо за счет работающего Ca²⁺-миристоильного переключателя [266], а NCS-1 по всей видимости будет локализоваться на поверхности мембран

121

перманентно. Кроме того, рековерин демонстрирует повышенное сродство только к ФС [381], в то время как NCS-1 – к ФС и ФИ (см. раздел 3.1.4), а также высокоаффинно связывает сигнальные фосфоинозитиды. Все это в совокупности может обуславливать ассоциацию рековерина и NCS-1 с разными участками фоторецепторной мембраны и проявление их регуляторной активности в ответ на разные сигналы.



Рис. 30. Структурные сходства и отличия NCS-1 и рековерина. (А) Выравнивание аминокислотных последовательностей NCS-1 и рековерина быка с раскраской по гомологии. (Б) Блок-схема структуры NCS-1 и рековерина: гипервариабельные N- и С-концевая последовательности белков приведены в белых блоках.

Если указанные предположения верны, оба белка должны содержать уникальные элементы структуры, которые будут обуславливать их функциональные различия. Из выравнивания первичных структур рековерина и NCS-1 видно, что гетерогенные участки структуры сосредоточены в их N-концевой и C-концевой областях (Рис. 30А). Действительно, эти зоны являются вариабельными внутри семейства НКС, что указывает на их возможную роль в обеспечении функциональной диверсификации этих белков. Кроме того, различия между рековерином и NCS-1 наблюдаются в количестве функциональных Ca²⁺-связывающих мотивов (у NCS-1 их три, у рековерина – два), что может обеспечивать разную кальциевую чувствительность этих белков (Рис. 30Б). С учетом этих наблюдений, на следующем этапе работы мы проанализировали роль всех этих структурных элементов NCS-1 в обеспечении специфичности его функционирования в фоторецепторной клетке.

3.2.1. Исследование роли N-концевых структурных элементов NCS-1 в обеспечении специфичности функциональных свойств белка

Первым типом регуляторных элементов структуры NCS-1, отвечающих за селективность узнавания отрицательно заряженных фосфоолипидов, и как следствие, обеспечивающих специфичность мембранной локализации белка в фоторецепторной клетке, может быть кластер остатков лизина, обнаруженный нами на N-конце белка, т.е. вблизи миристоильной группы. На следующем этапе работы мы изучили роль остатков, входящих в состав этого кластера (K3, K7 и K9), в связывании белка с фоторецепторными мембранами и их компонентами. Для этого методом сайт-направленного мутагенеза были получены генетические конструкции, кодирующие мутанты NCS-1 с одиночными, двойными и тройными заменами указанных остатков на отрицательно заряженный остаток глутаминовой кислоты (мутации с обращением заряда). Для исключения вклада миристоильной группы в связывание во всех последующих экспериментах использовались только немиристоилированные формы полученных мутантов белка.

3.2.1.1. Первичная характеристика N-концевых мутантов NCS-1

Чтобы исключить возможные эффекты произведенных аминокислотных замен на целостность структуры NCS-1, прежде всего, было проведено сравнение термостабильности полученных мутантов. Мониторинг температурной зависимости положения максимума собственной флуоресценции полученных белков показал, что в присутствии Ca²⁺ температура тепловой денатурации всех мутантов превышает 80°С, что соответствует NCS-1 дикого типа (данные не показаны). При этом в отсутствие Ca²⁺ большинство мутантов демонстрируют сходные профили денатурации с температурой получперехода (T_{1/2}), лежащей в диапазоне 61-65°С (Рис. 31А-Б). Исключение составил лишь мутант K(3,7)E, в случае которого наблюдалось снижение T_{1/2} до 55°С. Тем не менее, значительная стабилизация этого мутанта в присутствии Ca²⁺ (данные не показаны) говорит о том, что он сохраняет способность связывать Ca²⁺, а его структурное ядро в целом остается интактным. Таким образом, был сделан вывод, что ни одна из произведенных замен не оказала существенного влияния на общую структуру NCS-1 и сконструированные мутанты могут быть использованы в дальнейших сравнительных исследованиях.



Рис. 31. Доказательство структурной целостности N-концевых мутантов NCS-1. (А) Профили термической денатурации бескальциевых (Mg²⁺-связанных) форм NCS-1 дикого типа и его мутантов с заменами остатков лизина в положениях 3, 7 и 9 на остатки глутаминовой кислоты. (Б) Температуры полуперехода.

3.2.1.2. Сравнение эффективности связывания NCS-1 и его N-концевых мутантов с клеточными мембранами

Полученные препараты мутантов NCS-1 далее использовались в экспериментах по связыванию с фоторецепторными и гиппокампальными мембранами. Как видно из Рис. 32А, присутствие точечных замен заряда в положениях 3, 7 и 9 полипептидной цепи NCS-1 не оказывает влияния на сродство белка к обоим типам мембран. В тоже время, в случае фоторецепторных мембран постепенное повышение числа этих замен и, как следствие, нарастание отрицательного заряда ослабляет мембранную ассоциацию NCS-1. Так, в присутствии Ca^{2+} сродство мутантов снижается в ряду WT > K(3,7)E > K(3,9)E > K(7,9)E > K(3,7,9)E, причем тройная замена K(3,7,9)E ингибирует связывание более чем в два раза. В свою очередь, мембраны гиппокампа изначально демонстрируют достаточно низкую эффективность связывания немиристоилированного NCS-1, на фоне которой эффект мутаций является практически неразличимым (Рис. 32Б). Таким образом, N-концевые остатки лизина NCS-1 действительно обеспечивают взаимодействие белка с мембранами, причем компоненты, обеспечивающие это связывание, преобладают в фоторецепторных мембранах по сравнению с мембранами гиппокампа.

3.2.1.3. Сравнение эффективности связывания NCS-1 и его N-концевых мутантов с иммобилизованными фосфолипидами

На основании результатов, полученных в предыдущем разделе, мы предположили, что разница в эффективности взаимодействия мутантов с исследуемыми мембранами обеспечивается за счет отрицательно заряженных фосфоолипидов, таких как ФС, содержание которого в фоторецепторных мембранах существенно выше [366, 367]. В подтверждение этого предположения, по данным дот-блоттинга замена N-концевых лизинов NCS-1 достоверно ослабляет его связывание с иммобилизованным ФС (Рис. 33А-Б). При этом, мутации оказывают

негативное влияние на селективность узнавания сигнальных фосфоинозитидов: разница в сродстве NCS-1 к PI3P и остальным липидам этой группы (PI4P, PI5P и PI(3,5)P₂) при наличии мутаций оказывается менее выраженной, по сравнению с белком дикого типа (рис 33B). Можно заключить, что остатки K3, K7 и K9, во-первых, участвуют во взаимодействии с ФС, и, во-вторых, обеспечивают селективность узнавания PI3P, который, по-видимому, связывается в специальный сайт, локализованный на N-конце белка.



Рис. 32. Вклад N-концевого сегмента NCS-1 в связывание белка с мембранами. Эффективность связывания NCS-1 и его N-концевых мутантов с (A) фоторецепторными (ФМ) мембранами и (Б) гиппокампальными (ГМ) мембранами, представленная в процентах от контроля (связывания NCS-1 дикого типа с ФМ в присутствии Ca²⁺). *p < 0,05 относительно связывания в присутствии Ca²⁺, # – в отсутствие Ca²⁺.

3.2.1.4. Предсказание сайта связывания PI3P в NCS-1

Ha следующем этапе МЫ попытались предсказать структуру И положение высокоспецифичного PI3P-связвающиего сайта в молекуле NCS-1. С этой целью был осуществлен глобальный слепой гибкий докинг фосфоинозитидов в ансамбль ЯМР-структур немиристоилированного NCS-1 (PDB 2LCP) (Рис. 34А). Принимая во внимание селективность NCS-1 к PI3P на фоне других фосфатидилинозитолмонофосфатов, выбор лигандов для докинга был ограничен PI3P, PI4P и PI5P. Поскольку специфическое распознавание фосфоинозитидов белком может включать только их заряженные группы [382], хвосты жирных кислот был обрезаны до этильных групп. По распределению центров масс анализируемых фосфоинозитидов нам удалось выявить единственный сайт, высокоспецифичный в отношении PI3P, но не PI4P и PI5P. Этот сайт расположен вблизи N-конца и состоит из остатков S4, K7, Q28, Q29 и K32, локализованных в петле перед первой α-спиралью белка, а также в его второй α-спирали (Рис. 34Б). К7 и К32 формируют положительно заряженный карман, в который помещается фосфатная группа, в то время как S4, Q28 и Q29 взаимодействуют одновременно с фосфатной и инозитольной группами PI3P посредством сети водородных связей. Участие К7 в формировании сайта может служить объяснением для наблюдаемых изменений фосфоинозитидсвязывающих свойств у мутантов NCS-1 с обращенным зарядом (см. предыдущий раздел).



Рис. 33. Вклад N-концевого сегмента NCS-1 в связывание белка с фосфолипидами. (А) Репрезентативные дот-блоты NCS-1 И его N-концевых мутантов. связанных с иммобилизованными фосфолипидами. 1 – лизофосфатидилхолин, 2 – фосфатидилинозитол, 3 – PI3P, 4 - PI4P, 5 - PI5P, 6 - φосφатидилэтаноламин (ΦЭ), 7 - φосφатидилхолин (ΦХ), $8 - PI(3,4)P_2$, 9 – PI(3,5)P₂, 10 – PI(4,5)P₂, 11 – PI(3,4,5)P₃, 12 – фосфатидная кислота (ФА), 13 – фосфатидилсерин (ФС), 14 – контроль (пустой дот). (Б) Сравнительная эффективность связывания NCS-1 и тройного мутанта К(3,7,9)Е с фосфолипидами по результатам денситометрического анализа дот-блотов (в % от связывания NCS-1 дикого типа с PI3P). *p < 0,05 относительно связывания с NCS-1 дикого типа. (В) Относительное сродство NCS-1 и его мутантов к фосфоинозитидам, представленное в % от связывания с PI3P (на врезке).

Отметим, что выявленная нами комбинация потенциальных PI3P-связывающих остатков является уникальной для NCS-1 позвоночных и его дрожжевых ортологов (Рис. 34B). Интересно, что по литературным данным все эти белки вовлечены в регуляцию метаболизма фосфоинозитидов за счет активации фосфатидилинозитол-4-киназы-1 [66, 290]. В свою очередь, обнаруженного нами сайта: другие НКС лишены y рековерина отсутствуют все S4. Наличие N-концевой области вышеперечисленные остатки, кроме В NCS-1 высокоспецифичного сайта связывания PI3P будет обеспечивать его сродство к определенным участкам мембраны и совместную локализацию с другими участниками фосфоинозитидзависимых сигнальных путей, тем самым обеспечивая функциональное отличие этого белка от рековерина в фоторецепторной клетке.



В

			10	20	30			
NCS-1	:	MGKSNS-KI	LKPEVVEE	LTRKTYFT	FEKEVQQWYKGFIKDC	P	:	39
Frequenin(S.pombe)	:	MGKSQS-KI	LSQDQLQD	LVRSTRFI	OKKELQQWYKGFFKDC	P	:	39
Frequenin(S.cerevisiae)	:	MGAKTS-KI	LSKDDLTC	LKQSTYFI	ORREIQQWHKGFLRDC	P	:	39
Hippocalcin	:	MGKQNS-KI	LRPEMLQD	LRENTEFS	SELELQEWYKGFLKDC	CP	:	39
Neurocalcin	:	MGKQNS-KI	LRPEVMQD	LLESTDFT	[EHEIQEWYKGFLRDC	CΡ	:	39
VILIP1	:	MGKQNS-KI	LAPEVMED	LVKSTEFN	NEHELKQWYKGFLKDC	CΡ	:	39
VILIP3	:	MGKQNS-KI	LRPEVLQD	LRENTEFT	rdhelqewykgflkdc	CΡ	:	39
Recoverin	:	MGNSKSGA	LSKEILEE	LQLNTKFS	SEEELCSWYQSFLKDC	P	:	40

Рис. 34. Потенциальный сайт связывания PI3P в структуре NCS-1. (А) Молекулярный докинг фосфоинозитидов в структуру Ca²⁺-связанного NCS-1 (PDB 2LCP, структура 10): сферами представлены рассчитанные центры масс PI3P (оранжевый), PI4P (зеленый) и PI5P (синий). (Б) Потенциальный сайт связывания PI3P в структуре NCS-1. (В) Выравнивание аминокислотных последовательностей NCS-1 и близкородственных ему НКС человека и дрожжей. Аминокислотные остатки, входящие в потенциальный сайт связывания PI3P в структуре NCS-1, отмечены черными треугольниками, а консервативные остатки в этих позициях выделены серым.

3.2.2. Исследование роли С-концевого сегмента NCS-1 в обеспечении специфичности функциональных свойств белка

Вторым типом регуляторных элементов структуры NCS-1, способных обеспечивать его уникальные функциональные свойства, может быть, так называемый С-концевой сегмент белка. Этот участок локализован после четвертого EF-hand-мотива NCS-1 (остатки 177-190) и среди НКС характеризуется вариабельностью всех уровней структуры (см. раздел 1.6.5.7). По нашим

предыдущим данным, в случае рековерина и других НКС С-концевой сегмент принимает участие как в узнавании мишеней, так и в механизме Ca²⁺-миристоильного переключателя, управляющего мембранной локализацией этих белков [270, 274]. Мы предположили, что наличие разных по структуре С-концевых сегментов может быть важнейшим фактором, обеспечивающим диверсификацию функциональных свойств рековерина и NCS-1. Чтобы подтвердить это предположение, был сконструирован и получен химерный белок, представляющий собой NCS-1 с С-концевым сегментом рековерина (химера NR, участок 177-190 NCS-1 заменен на K181-L202 рековерина; см. Рис. 30Б) и проведено сравнение его структурно-функциональных свойств с NCS-1 и рековерином дикого типа.

3.2.2.1. Первичная характеристика химерного белка NR

Прежде всего, мы изучили, насколько замена С-концевого сегмента повлияла на общую структуру NCS-1. Исследование температурных зависимостей положения максимума спектра собственной флуоресценции белка показало, что по термостабильности и способности связывать сигнальные катионы NR существенно не отличается от NCS-1 дикого типа. Для апо- и Mg^{2+} -связанных форм этих белков разница в $T_{1/2}$ не превышает 5°C, а их Ca²⁺-связанные формы имеют $T_{1/2}$ свыше 80°C (Рис. 35). Между тем, при низких температурах спектр флуоресценции NR демонстрирует синий сдвиг на 2-3 нм по сравнению со спектром собственной флуоресценции NCS-1. Таким образом, произведенная мутация не оказывает влияния на структурную целостность NCS-1, однако приводит к изменениям локального окружения его остатков триптофана, что, очевидно, связано с изменением структуры и положения C-концевого сегмента белка.



Рис. 35. Структурная целостность химерного белка NCS-1-рековерин (NR). Профили тепловой денатурации NCS-1 дикого типа и NR в (A) Mg²⁺- и (Б) Ca²⁺-связанной формах.

3.2.2.2. Исследование связывания химерного белка NR с фоторецепторными мембранами

Используя метод равновесного центрифугирования, мы обнаружили, что NR взаимодействует с отмытыми мочевиной фоторецепторными мембранами, как в присутствии, так

и в отсутствие Ca^{2+} , хотя его сродство к ним оказывается примерно в 1,5 раза ниже, чем у NCS-1 (Рис. 36А). Интересно, что в отличие от NCS-1, половина которого связывается с мембранами необратимо, практически весь NR (85%) при отмывании хелатором Ca^{2+} переходит в раствор (Рис. 36Б). Это свойство отличает химерный белок от NCS-1, но делает его схожим с рековерином, 83% которого переходит с мембраны в раствор в описанных условиях. Таким образом, замена С-концевого сегмента NCS-1 на соответствующий фрагмент рековерина приводит к обратимости связывания белка с мембранами, т е. NCS-1 приобретает функциональный Ca^{2+} -миристоильный переключатель рековерина.



Рис. 36. Вклад С-концевого сегмента NCS-1 в механизм необратимого связывания белка с фоторецепторными мембранами. (А) Соосаждение NCS-1, рековерина и химерного белка NR с фоторецепторными мембранами в зависимости от присутствия Ca²⁺. *p < 0,05 относительно связывания NCS-1 с мембранами в присутствии Ca²⁺, # – в отсутствие Ca²⁺. (Б) Доля белка, сохранившаяся в мембранной фракции («м») или перешедшая в супернатант («с»), после инкубации мембранного осадка с 2 мМ ЭГТА. Эффективность связывания с мембранами рассчитана путем денситометрического анализа соответствующих электрофореграмм.

3.2.2.3. Исследование регуляторной активности химерного белка NR в отношении родопсинкиназы

Помимо связывания с мембранами, механизм Ca²⁺-миристоильного переключателя рековерина включает экспонирование гидрофобных остатков белка, которые формируют специфический сайт связывания родопсинкиназы [301]. С учетом того, что С-концевой сегмент рековерина стабилизирует комплекс белка с родопсинкиназой [270], можно было ожидать, что его введение в структуру NCS-1 вызовет аналогичный эффект. Однако исследование регуляторной активности NR в реконструированной системе (см. раздел 3.1.5.3) показало, что химера ингибирует родопсинкиназу примерно в 2 раза хуже, чем NCS-1 и рековерин, причем наблюдается утрата Ca^{2+} -зависимости этого процесса (Рис. 37). Объяснить наблюдаемое противоречие можно предположив, что рековерин и NCS-1 связывают один и тот же участок родопсиннкиназы (см. раздел 3.1.5.2), но в разные сайты, в формировании которых принимают участие уникальные C-концевые сегменты этих белков. Это предположение подтверждает анализ структуры комплекса NCS-1 с родопсинкиназой, опубликованный одновременно с нашей работой в 2015 году [33]. Так, среди 27 консервативных остатков гидрофобного кармана рековерина и NCS-1 только 6 принимают участие во взаимодействии с родопсинкиназой в обоих белках (Рис. 15Г) [33, 301]. При этом уникальный C-концевой сегмент NCS-1 действительно непосредственно контактирует с ответным участком родопсинкиназы, формируя специфический сайт, положение N-конца фермента в котором отличается от такового в рековерине. Очевидно, что замена C-концевого сегмента NCS-1 при конструировании NR нарушает структуру этого сайта, что приводит к снижению регуляторной активности белка в отношении родопсинкиназы.



Рис. 37. Участие С-концевого сегмента NCS-1 в механизме ингибирования родопсинкиназы. Фосфорилирование родопсина под действием родопсинкиназы в реконструированной системе в присутствии NCS-1, рековерина и химерного белка NR (в контрольной пробе белки HKC отсутствуют). *p < 0,05 относительно связывания NCS-1 с мембранами в присутствии Ca²⁺, # – в отсутствие Ca²⁺.

3.2.2.4. Потенциальный механизм регуляции NCS-1 с участием С-концевого сегмента: исследование поверхностной гидрофобности химерного белка NR

Основные функциональные свойства белков НКС, а именно взаимодействие с мембранами и узнавание сигнальных партнеров, в значительной степени определяются поверхностной доступностью их гидрофобных сайтов, которые, во-первых, необходимы для обратимого связывания миристоильной группы, и, во-вторых, формируют участки присоединения белковмишеней. Подобные гидрофобные сайты можно детектировать с помощью флуоресцентных красителей, таких как АНС и бис-АНС, которые широко используются для анализа белков НКС [291, 383-385]. Чтобы определить изменения структуры гидрофобных сайтов, вызванные заменой С-концевого сегмента NCS-1 на C-конец рековерина, нами было выполнено флуоресцентное окрашивание бескальциевых (Mg²⁺-связанных) и Ca²⁺-связанных форм NCS-1, рековерина и NR с использованием бис-АНС. В целом, бексальциевые конформеры всех этих белков демонстрируют меньшую аффинность к бис-АНС, чем их Ca²⁺-связанные формы (Рис. 38).



Рис. 38. Влияние замены С-концевого сегмента NCS-1 на поверхностную гидрофобность белка. Спектры флуоресценции бис-АНС в присутствии (А) бескальциевых и (Б) Ca²⁺-связанных форм NCS-1, рековерина и химерного белка NR.

В случае рековерина связывание Ca^{2+} существенно увеличивает интенсивность флуоресценции бис-АНС, отражая экспонирование его гидрофобного кармана. При этом в случае NCS-1 это увеличение более умеренное, поскольку его гидрофобный карман прикрыт Сконцевым сегментом как в бескальциевой, так и в Ca^{2+} -связанной формах белка [34, 385, 386]. Закономерно, что в случае NR замена этого участка на соответствующую последовательность рековерина увеличивает поверхностную гидрофобность обоих конформеров химеры. Это может усиливать обратный захват миристоильной группы бескальциевой формой NR, что придает ей функциональный Ca^{2+} -миристоильный переключатель (см. Рис. 36Б). Кроме того, выравнивание поверхностной гидрофобности конформеров NR объясняет нарушение Ca^{2+} -зависимости регуляции родопсинкиназы (см. Рис. 37).

В целом, можно заключить, что структура С-концевого сегмента обуславливают различия в мембранной локализации NCS-1 и рековерина, и, как следствие, может диверсифицировать условия регуляции родопсинкиназы этими белками. В рековерине уникальная структура Сконцевого сегмента обеспечивает функциональность Ca²⁺-миристоильного переключателя и обратимость его связывания с фоторецепторными мембранами, в то время как в NCS-1 этот структурный элемент будет блокировать захват миристоильной группы при снижении концентрации Ca²⁺, что приведет к более длительной локализации белка на мембранной поверхности.

3.2.2.5. С-концевой сегмент как мишень для фармакологического таргетирования NCS-1

Добавим, что полученные нами данные могут иметь важное практическое применение. По нашим наблюдениям С-концевой сегмент NCS-1 играет ключевую роль как в механизме мембранной ассоциации, так и в обеспечении правильной регуляторной активности белка. Известно, что аберрантная экспрессия и активность NCS-1 ассоциированы с рядом неврологических расстройств (см. раздел 1.5). Например, при заболеваниях аутистического спектра точечная замена R102Q приводит к более прочному связыванию белка с мембранами при низком (базовом) уровне Ca^{2+} , таким образом, вызывая нарушения синаптической регуляции [34, 385, 386] *17502602*]. На основании полученных нами данных можно предположить, что С-концевой сегмент NCS-1 может выступать мишенью для селективного фармакологического подавления активности белка в нейронах, где присутствует сразу несколько белков HKC. Перспективность подобного подхода подтверждается работами, в которых С-концевой пептид NCS-1 применялся в качестве специфического (по-видимому, конкурентного) ингибитора этого белка *in vitro* [28, 75, 96, 97]. Кроме того, есть данные, что некоторые препараты, подавляющие активность NCS-1 в моделях нейродегенеративных заболеваний, связываются именно с С-концевым сегментом белка [231, 233].

3.2.3. Исследование роли металлсвязывающих центров NCS-1 в обеспечении специфичности функциональных свойств белка

Третьим типом элементов структуры NCS-1, потенциально обеспечивающих его уникальные функциональные свойства, являются Ca^{2+} -связывающие центры. Известно, что структура координационной сферы и, как следствие, функциональность EF-hand-мотивов белков НКС обеспечивает их разную чувствительность к Ca^{2+} и другим физиологическим катионам, тем самым позволяя им по-разному реагировать на внутриклеточные сигналы [260]. Для выявления роли этого структурного фактора, на следующем этапе настоящей работы мы сравнили сродство NCS-1 и рековерина к ионам кальция и магния, и охарактеризовали конформационные изменения, которые оба белка претерпевают при связывании этих катионов.

3.2.3.1. Характеристика Ca²⁺-связывающих и Mg²⁺-связывающих свойств NCS-1 и рековерина

По данным изотермической калориметрии титрования (ИКТ) NCS-1 последовательно связывает три иона кальция с константами диссоциации 0,23, 5 и 0,29 мкМ (Рис. 39А, Таблица 6). При этом заполнение двух высокоаффинных сайтов является энтальпийно-зависимым, а в более низкоаффинного сайта – энтропийно-зависимым, что указывает на перестройки гидрофобных

остатков белка. Полученные данные согласуется с результатами предыдущих исследований, согласно которым Ca²⁺-связывающие центры NCS-1 заполняются в порядке EF2 \rightarrow EF3 \rightarrow EF4, причем связывание в EF2 является низкоаффинным и энтропийно-зависимым [288, 293]. При этом по нашим данным NCS-1 связывает три иона магния с константами порядка 2 мкМ (Рис. 39Б), в то время как по данным литературы он связывает только два таких катиона [291, 294]. Эти различия могут быть связаны с разным качеством белкового препарата: например, наличием примесей немиристоилированной формы белка или остаточного Ca²⁺, от которых нам удалось избавиться (см. раздел 3.1.2), могут снижать стехиометрию связывания Mg²⁺. Тем не менее, все исследования, включая настоящую работу, согласуются в том, что на фоне связывания Mg²⁺ NCS-1 демонстрирует пониженное сродство к Ca²⁺ (Рис. 39В), а насыщенная Ca²⁺ форма NCS-1 вообще не связывает ионы магния (Рис. 39Г).

Ион 1*	Ион 2	К _D ¹ , мкМ	∆Н¹, кДж	К _D ² , мкМ	∆ Н², кДж	К _D ³ , мкМ	ΔH³, кДж
Ca ²⁺	-	0,23**	-10,1	5,00	1,4	0,29	-17,8
Ион 1	Ион 2	N^1	К ^{р1} , мкМ	∆Н¹, кДж	N^2	Кд ² , мкМ	$\Delta \mathbf{H}^2$, кДж
Ca ²⁺	Zn^{2+}	0,6	0,017	-3,9	0,9	0,29	-6,5
	Mg^{2+}	1,5	45	-17,6	1,2	0,23	-5,7
Zn^{2+}	-	0,7	4,34	-11,8	2,0	0,11	-7,3
	Ca ²⁺	1,7	0,34	1,0			
	Mg^{2+}	1,7	0,24	-6,3			
Mg^{2+}	-	2,7	1,92	-2,1			
	Ca ²⁺	Нет связывания					
	Zn^{2+}	Нет связывания					

Таблица 6. Термодинамические параметры связывания ионов (II) металлов и их сочетаний с NCS-1 по данным изотермической калориметрии титрования.

*NCS-1, содержащий избыток «иона 2», титровали «ионом 1».

**Термодинамические параметры связывания Ca²⁺ с апо-NCS-1 определяли по модели «последовательного связывания» 3 ионов. В остальных случаях использовалась модель «два набора сайтов».



Рис. 39. Связывание NCS-1 с ионами кальция и магния. Титрование 25 мкМ NCS-1 (А) ионами кальция, (Б) ионами магния, (В) ионами кальция на фоне 5 мМ хлорида магния, (Г) ионами магния на фоне 1 мМ хлорида кальция: репрезентативные кривые титрования (вверху) и изотермы связывания (внизу). На нижних графиках черными сплошными линиями представлены лучшие аппроксимирующие кривые (см. Таблицу 6).

Таким образом, можно говорить о наличии конкуренции между Ca^{2+} и Mg^{2+} за одни и те же сайты связывания в белке. Рековерин обладает намного менее выраженным сродством к Ca^{2+} и Mg^{2+} . Этот белок содержит только два функциональных EF-hand-мотива, которые заполняются последовательно (EF3 \rightarrow EF2) и кооперативно (K_D=17 мкM, n=1,75) [387], причем его Ca^{2+} -чувствительность усиливается в присутствии мембран и родопсинкиназы [365, 388, 389]. Кроме того, в отличие от NCS-1 рековерин связывает ионы магния в миллимолярном диапазоне концентраций этого металла [390].

3.2.3.2. Сравнение структурных свойств Ca²⁺-связывающих и Mg²⁺-связывающих форм NCS-1 и рековерина

Исследование спектров собственной флуоресценции NCS-1 выявило существенные различия в структуре конформеров этого белка, образующиеся при связывании Ca^{2+} и Mg²⁺, и их отличие от соответствующих форм рековерина. Так, связывание Ca^{2+} с NCS-1 повышает интенсивность флуоресценции и индуцирует коротковолновый сдвиг спектра ($\lambda_{\text{макс}}$ снижается от 338 до 334 нм), т.е. вызывает переход остатков триптофана в менее полярное и/или мобильное окружение. В этом белок отличается от рековерина, который демонстрирует сдвиг в длинноволновую область (красный сдвиг) [391]. При этом связывание Mg²⁺ с NCS-1 повышает только интенсивность его флуоресценции (Рис. 40А). Сравнение профилей тепловой денатурации NCS-1 и рековерина показало, что апо-форма NCS-1 сравнительно неустойчива ($T_{1/2} = 40^{\circ}$ С) и стабилизируется при связывании Mg²⁺ ($T_{1/2} = 70^{\circ}$ С) (Рис. 40Б), в то время как апо-форма рековерина является изначально достаточно стабильной ($T_{1/2}=65^{\circ}$ С) (Рис. 40В). В свою очередь, связывание Ca²⁺ повышает температуру плавления обоих белков до 80°С и выше.



Рис. 40. Влияние ионов кальция и магния на структуру NCS-1 и рековерина. (А) Спектры собственной флуоресценции апо, Mg²⁺- и Ca²⁺-связанной форм NCS-1. (Б) Профили тепловой денатурации NCS-1 в отсутствие катионов и в присутствии Mg²⁺ и Ca²⁺. (В) Профили температурной денатурации бескальциевой и Ca²⁺-связанной форм рековерина.

В целом, на основании полученных данных можно заключить, что, поскольку уровень Mg^{2+} в нейронах составляет около 1 мМ [295], в светоадаптированной фоторецепторной клетке NCS-1 будет находиться в Mg^{2+} -связанной, а рековерин – в апо-форме, которые при этом будут обладать примерно одинаковой структурной стабильностью. Хотя в темновом состоянии фоторецепторных клеток оба белка будут насыщаться ионами кальция, переход в Ca^{2+} -связанную конформацию и приобретение способности ингибировать родопсинкиназу в случае NCS-1 будет происходить при более низких концентрациях Ca^{2+} , чем в случае рековерина. Отличия в спектральных свойствах NCS-1 и рековерина отражают разницу в структурных перестройках, которые происходят при активации этих белков в ответ на связывание Ca^{2+} и могут служить объяснением их разной Ca^{2+} -чувствительности. Так, в случае рековерина более выраженное повышение гидрофобности при координации Ca^{2+} , которое следует из повышения его сродства к бис-АНС (см. Рис. 38) и красного сдвига спектра флуоресценции белка (экспонирование триптофанов в раствор) делает это связывание энергетически менее выгодным, чем в случае NCS-1.

3.2.4. NCS-1 и рековерин как Zn²⁺-связывающие белки

Помимо ионов кальция и магния, в нейронах содержится значительное количество цинка, общая концентрация которого достигает 0,2 мМ [392, 393]/. Несмотря на то, что в уровень свободного Zn^{2+} в цитоплазме строго регулируется, он может варьировать от нескольких пикомоль до нескольких микромоль и эти колебания могут играть не менее важную сигнальную роль, чем колебания концентрации Ca²⁺ [394]. Сетчатка характеризуется одним из самых высоких уровней цинка среди тканей организма [395]. В фоторецепторных клетках концентрация Zn²⁺ варьирует в зависимости от уровня освещения, что указывает на возможное участие этого металла в их метаболизме и функционировании [396, 397]. Достаточно сказать, что один димер зрительного рецептора родопсина связывает семь ионов цинка [398]. Согласно данным, полученным в нашей лаборатории ранее, в число Zn²⁺-чувствительных белков входит рековерин,

который связывает один ион цинка в микромолярном диапазоне концентраций [298]. В настоящей работе мы предположили, что NCS-1 также способен координировать Zn^{2+} , причем его чувствительность к этому катиону может отличаться от таковой в случае рековерина, тем самым обеспечивая функциональное различие этих белков в сетчатке. Для проверки этого предположения мы впервые изучили Zn^{2+} -связывающие свойства NCS-1 и провели детальное исследование влияния Zn^{2+} на структуру и функцию этого белка, в том числе, в сравнении с рековерином.

3.2.4.1. Характеристика Zn²⁺-связывающих свойств NCS-1 и рековерина

На первом этапе общая способность NCS-1 связывать ионы цинка была продемонстрирована с использованием прямого метода – микроравновесного диализа, сопряженного с атомно-адсорбционной спектроскопией с электротермической атомизацией (AAC). Полумаксимальное связывание наблюдалось при 4,7 мкМ свободного Zn²⁺ при максимальной стехиометрии равной 1,5 (Рис. 41).



Рис. 41. Связывание ионов цинка с NCS-1. Количество Zn²⁺, связавшегося с NCS-1 в процессе микроравновесного диализа по данным атомно-адсорбционной спектроскопии с электротермической атомизацией.

Поскольку было выявлено, что при проведении AAC-анализа происходит загрязнение NCS-1 ионами кальция, мы предположили, что дробная стехиометрия вызвана конкуренцией между Zn^{2+} и Ca^{2+} за общие сайты связывания. Это предположение было подтверждено при исследовании связывания Zn^{2+} с декальцифицированным NCS-1 методом ИКТ (Рис 42, Таблица 6). Оказалось, что NCS-1 на самом деле связывает три иона цинка: два сайта обладают одинаковым сродством к Zn^{2+} (K_D =0,11 мкМ), а третий является низкоаффинным (K_D =4,3 мкМ). При этом насыщение NCS-1 ионами кальция (или магния) препятствует связыванию только одного Zn^{2+} и именно в низкоаффинный сайт, т.е. как минимум один ион цинка связывается с одним из EF-hand-мотивов белка. Интересно, что Zn^{2+} -связанная форма NCS-1 связывает два иона кальция вместо трех (ионы магния эта форма не связывает), причем сродство к Ca^{2+} одного из оставшихся двух сайтов значительно повышается.



Рис. 42. Связывание NCS-1 с ионами цинка. Титрование 25 мкМ NCS-1 (А) ионами цинка, (Б) ионами цинка на фоне 1 мМ хлорида кальция, (В) ионами цинка на фоне 5 мМ хлорида магния, (Г) ионами кальция на фоне 250 мкМ хлорида цинка, (Д) ионами магния на фоне 250 мкМ хлорида цинка: репрезентативные кривые титрования (вверху) и изотермы связывания (внизу). На нижних графиках черными сплошными линиями представлены лучшие аппроксимирующие кривые (см. Таблицу 6).

Отдельно методом ИКТ было охарактеризовано связывание Zn^{2+} с рековерином (Рис. 43Б). Оказалось, апо-форма белка связывает один ион цинка с константой диссоциации около 13 мкМ (Таблица 7), что согласуется с результатом, полученным ранее путем мониторинга спектральных свойств белка [298]. Интересно, что в случае рековерина связывание Ca^{2+} и Zn^{2+} дает взаимоусиливающие эффекты: константа диссоциации комплекса Zn^{2+} с Ca^{2+} -заполненным белком составляет 9 мкМ, а в заполненном цинком белке сродство одного из EF-hand-мотивов к Ca^{2+} увеличивается на порядок (K_D=1,9 мкМ вместо 19 мкМ) (Рис. 43Г).

Ион 2	Кр ¹ , мкМ	∆Н ¹ , кДж	Кд ² , мкМ	∆Н², кДж
-	19,4**	-6,4	15,9	1,7
Zn^{2+}	1,9	-3,2	26,2	-0,9
-	12,8	-2,6		
Ca^{2+}	9,3	-3,4		
	Ион 2 - Zn ²⁺ - Ca ²⁺	Ион 2 Кр ¹ , мкМ - 19,4** Zn ²⁺ 1,9 - 12,8 Ca ²⁺ 9,3	Ион 2 Kb ¹ , мкМ ΔH ¹ , кДж - 19,4** -6,4 Zn ²⁺ 1,9 -3,2 - 12,8 -2,6 Ca ²⁺ 9,3 -3,4	Ион 2 Kb ¹ , мкМ ΔH ¹ , кДж Kb ² , мкМ - 19,4** -6,4 15,9 Zn ²⁺ 1,9 -3,2 26,2 - 12,8 -2,6 Ca ²⁺ 9,3 -3,4

Таблица 7. Термодинамические параметры связывания ионов кальция и цинка и их сочетаний с рековерином по данным изотермической калориметрии титрования.

* Рековерин, содержащий избыток «иона 2», титровали «ионом 1».

**Термодинамические параметры связывания Ca²⁺ с апо-рековерином определяли по модели «последовательного связывания» 2 ионов. В остальных случаях применялась модель «один набор сайтов».



Рис. 43. Связывание рековерина с ионами цинка. Титрование 25 мкМ рековерина (А) ионами кальция, (Б) ионами цинка, (В) ионами цинка на фоне 1 мМ хлорида кальция, (Г) ионами кальция на фоне 250 мкМ хлорида цинка: репрезентативные кривые титрования (вверху) и изотермы связывания (внизу). На нижних графиках черными сплошными линиями представлены лучшие аппроксимирующие кривые (см. Таблицу 7).

В целом, можно заключить, что существует целый ряд новых конформеров NCS-1 и рековерина, которые к тому же являются уникальными для каждого из этих белков. Для NCS-1, помимо Mg^{2+} - и Ca^{2+} -связанного, это Zn^{2+} -связанный конформер, а также $Zn^{2+}(Mg^{2+})$ -, $Zn^{2+}(Ca^{2+})$ - и $Ca^{2+}(Zn^{2+})$ -связанный конформеры, где Zn^{2+} или Ca^{2+} связываются на фоне избытка Mg^{2+} , Ca^{2+} и Zn^{2+} , соответственно (далее в круглых скобках указан катион, взятый в избытке). В случае же рековерина, который практически не связывает Mg^{2+} , имеет смысл говорить о четырех возможных формах белка: Ca^{2+} -, Zn^{2+} -, $Ca^{2+}(Zn^{2+})$ - и $Zn^{2+}(Ca^{2+})$ -связанной.

3.2.4.2. Сравнение структурных свойств Zn²⁺-связанных форм NCS-1 и рековерина

Для того чтобы подтвердить структурные различия выявленных новых конформеров NCS-1 и рековерина, мы применили ряд спектральных методов исследования белка. По данным спектроскопии КД, связывание Zn^{2+} сопровождается увеличением количества α-спиралей и снижением содержания β-слоев белка – изменениями, сходными с таковыми при связывании Ca^{2+} (Рис. 44, Таблица 8). Поскольку в структуре NCS-1 β-слои присутствуют только в EF-handмотивах [33, 34], этот результат косвенно указывает на то, что координация Zn^{2+} происходит именно в этих металлсвязывающих центрах. В свою очередь, связывание Zn^{2+} на фоне Ca^{2+} (Ca^{2+} против $Zn^{2+}(Ca^{2+})$ -связанной формы) или Mg^{2+} (Mg^{2+} - против $Zn^{2+}(Mg^{2+})$ -связанной формы) не влияет на долю α-спиралей, но увеличивает содержание β-слоев (в 1,46 и 1,27 раз, соответственно) в NCS-1, подтверждая тот факт, что координация Zn^{2+} не приводит к глобальным изменениям в молекуле белка, но затрагивает структуру его EF-hand доменов.



Рис. 44. Воздействие ионов (II) металлов на вторичную структуру NCS-1. (А) Спектры кругового дихроизма NCS-1, связанного с ионами кальция, магния и цинка и их различными сочетаниями. (Б) Доля элементов вторичной структуры у различных катион-связанных форм NCS-1.

Таблица 8. Характеристика вторичной структуры различных катион-связанных форм NCS-1 по данным спектроскопии кругового дихроизма.

Препарат	α-спирали, %	β-слои, %	Повороты, %	Неупорядоченная структура, %
апо-NCS-1	40,82	11,97	18,33	29,14
Mg ²⁺ -NCS-1	50,68	6,5	15,9	26,9
Ca ²⁺ -NCS-1	52,37	5,78	16,5	26,4
Zn ²⁺ -NCS-1	48,98	6,35	18,1	27,0
$Zn^{2+}(Mg^{2+})$ -NCS-1	48,87	7,73	20,2	23,9
Zn ²⁺ (Ca ²⁺)-NCS-1	52,43	8,43	15,9	24,0

По результатам исследования NCS-1 методом дифференциальной сканирующей флуориметрии (ДСФ), при низких концентрациях связывание Zn^{2+} практически не влияет на спектр собственной флуоресценции любого из конформеров белка (Рис. 45А). Однако при титровании апо-NCS-1 возрастающими концентрациями Zn^{2+} соотношение интенсивности флуоресценции при 350 и 330 нм (I₃₅₀/I₃₃₀) постепенно снижается (Рис. 45Б). Это снижение менее выражено, чем при титровании ионами кальция, указывая на то, что Zn^{2+} -связанная форма радикально отличается по своей структуре от Ca²⁺-связанной формы белка. При тировании цинком Mg^{2+} -NCS-1, соотношение не меняется, пока концентрация Zn^{2+} не достигнет 2,5-кратного избытка, в то время как дальнейшее повышение концентрации Zn^{2+} приводит последовательно к снижению, а затем к повышению соотношения I_{350}/I_{330} (Рис. 45В). Предположительно, подобная зависимость указывает на то, что сначала NCS-1 связывает один

ион цинка на фоне двух ионов магния, а затем происходит замена одного из ионов магния на ион цинка, что находит отражение в спектральных свойствах белка. Наконец, связывание Zn^{2+} с Ca^{2+} -NCS-1 лишь немного увеличивает соотношение I_{350}/I_{330} (Рис. 45Г). При этом связывание Ca^{2+} с Zn^{2+} -NCS-1 стимулирует образование конформера, похожего на Ca^{2+} -связанную форма, при более низких концентрациях Ca^{2+} , чем в случае связывания Ca^{2+} с апо-формой белка, что согласуется с увеличенной Ca^{2+} -чувствительностью Zn^{2+} -содержащей формы (см. Рис. 42 и Таблицу 6). Таким образом, полученные спектральные исследования демонстрируют явные структурные различия между апо-, Mg^{2+} -связанной, Ca^{2+} -связанной, Zn^{2+} -связанной, $Zn^{2+}(Ca^{2+})$ -связанной и $Ca^{2+}(Zn^{2+})$ -связанной конформациями NCS-1, что подтверждает данные, полученные с помощью ИКТ (см. предыдущий раздел).



Рис. 45. Воздействие ионов (II) металлов на спектральные свойства NCS-1. (A) Спектры собственной флуоресценции NCS-1 в присутствии ионов кальция, магния и цинка и их различных сочетаний. (Б-Г) Соотношение интенсивностей собственной флуоресценции NCS-1 при длинах волн 350 нм и 330 нм в присутствии возрастающих концентраций Ca^{2+} , Mg^{2+} и Zn^{2+} , измеренные методом дифференциальной сканирующей флуориметрии: (Б) связывание катионов с апоформой NCS-1; (В) связывание ионов цинка с Mg^{2+} -насыщенной формой NCS-1; (Г) связывание ионов цинка с Ca^{2+} -насыщенной формой NCS-1.

Аналогичные исследования в случае рековерина демонстрируют, что, в отличие от NCS-1, при связывании $Ca^{2+} I_{350}/I_{330}$ не снижается, а напротив, драматически повышается (Рис. 46А). При этом присутствие даже значительного избытка Mg^{2+} не оказывает существенного влияния на структуру рековерина, что отражает низкое сродство белка к этому катиону. В свою очередь,

титрование Zn²⁺, подобно титрованию Ca²⁺, хотя и в меньшей степени, способствует повышению I₃₅₀/I₃₃₀. Тирование ионами кальция Zn²⁺-связанного рековерина приводит к повышению I₃₅₀/I₃₃₀, однако полученная форма белка отличается от Ca²⁺-связанного конформера (Рис. 46Б). Аналогично, при связывании Zn²⁺ на фоне избытка Ca²⁺, соотношение I₃₅₀/I₃₃₀ снижается, не достигая, однако, уровня Zn²⁺-насыщенной формы. Таким образом, полученные данные подтверждают образование Ca²⁺, Zn²⁺, Ca²⁺(Zn²⁺)- и Zn²⁺(Ca²⁺)-связанного конформеров рековерина, что согласуется с данными ИКТ (см. Рис. 43 и Таблицу 7).



Рис. 46. Воздействие ионов (II) металлов на спектральные свойства рековерина. Соотношение интенсивностей собственной флуоресценции рековерина при длинах волн 350 нм и 330 нм в присутствии возрастающих концентраций Ca^{2+} , Mg^{2+} и Zn^{2+} , измеренные методом дифференциальной сканирующей флуориметрии: (А) связывание катионов с апо-формой рековерина; (Б) связывание ионов цинка с Ca^{2+} -насыщенной формой рековерина и связывание ионов кальция с Zn^{2+} -насыщенной формой рековерина.

Остается открытым вопрос о том, какие из выявленных *in vitro* конформеров NCS-1 и рековерина будут образовываться в физиологических условиях. Предположив, что в фоторецепторной клетке связывание происходит на фоне постоянной концентрации Mg^{2+} и регулярного повышения концентрации Ca^{2+} , можно сказать, что физиологически обоснованы только $Zn^{2+}(Mg^{2+})$ - и $Zn^{2+}(Ca^{2+})$ -связанные формы NCS-1, в дополнение к его хорошо изученным Mg^{2+} - и Ca^{2+} -связанным формам. Несмотря на это, даже формирование двух дополнительных форм может расширить функциональный репертуар белка. В свою очередь, рековерин теоретически может присутствовать как в Zn^{2+} -связанной, так и в $Zn^{2+}(Ca^{2+})$ или $Ca^{2+}(Zn^{2+})$ -связанной формах, однако для этого потребуется значительно (почти на 2 порядка) более высокая концентрация внутриклеточного Zn^{2+} , чем для NCS-1, что является еще одним важнейшим структурно-функциональным различием этих белков.

3.2.4.3. Влияние Zn²⁺ на структурную стабильность NCS-1 и рековерина

Поскольку известно, что связывание Zn²⁺ может дестабилизировать структуру белка, вызывая его агрегацию, далее мы исследовали профили тепловой денатурации различных конформеров NCS-1 в присутствии ионов цинка путем регистрации температурных

зависимостей $\lambda_{\text{макс}}$ эмиссии собственной флуоресценции белка. Выяснилось, что Mg²⁺-связанный NCS-1 имеет ярко выраженный профиль денатурации с температурой полуперехода около 67°С, однако добавление Zn²⁺ к этой форме приводит к возникновению дисперсии величины $\lambda_{\text{макс}}$ при температурах свыше 60°С, что указывает на агрегацию белка (Рис. 47А). В свою очередь, Ca²⁺- связанная форма NCS-1 дольше сохраняет структуру (T_{1/2}>90°С), однако при добавлении Zn²⁺ се профиль денатурации также меняется, указывая на конформационные различия между Ca²⁺- связанной и Zn²⁺(Ca²⁺)-связанной формами NCS-1, последняя из которых является менее стабильной (Рис. 47Б).



Рис. 47. Воздействие ионов цинка на термостабильность NCS-1. Профили тепловой денатурации (А) бескальциевых и (Б) Ca²⁺-связанных форм NCS-1 на фоне отсутствия/присутствия ионов цинка.

Более детально стабильность конформеров NCS-1 была охарактеризована методом ДСФ: температуру денатурации определяли, исходя из первой производной температурной зависимости соотношения I_{350}/I_{330} белка. Добавление четырехкратного избытка любого из трех катионов к апо-NCS-1 повышает стабильность белка в ряду Ca²⁺>Mg²⁺>Zn²⁺ (Puc. 48A). При менее чем 2,5-кратном избытке, связывание Zn²⁺ не оказывает существенного эффекта на стабильность Mg²⁺-NCS-1, однако дальнейшее повышение концентрации Zn²⁺ приводит сначала к росту, а затем к снижению температуры плавления, что, по-видимому, говорит о последовательном образовании двух различных промежуточных Zn²⁺/Mg²⁺-связанных форм (Puc. 48Б). Связывания Zn²⁺ с Ca²⁺-NCS-1 также выражается в постепенной дестабилизации белка, хотя при значительно более высоких концентрациях Zn²⁺ (Puc. 48B). Примечательно, что связывание Ca²⁺ с Zn²⁺-NCS-1, напротив, оказывает стабилизирующий эффект. Так, координация уже первого Ca²⁺ приводит к существенному возрастанию T_{1/2} (с 42 до 72°C), что говорит об образовании Ca²⁺(Zn²⁺)-связанной формы, значительно более стабильной, чем Zn²⁺-насыщення форма белка (Рис. 48Г).



Рис. 48. Воздействие ионов (II) металлов на термостабильность NCS-1 и его склонность к агрегации. (А-Г) Температуры полуперехода (T_{1/2}) термического разворачивания NCS-1 в присутствии ионов магния, кальция и цинка и их различных сочетаний, измеренные методом дифференциальной сканирующей флуориметрии. (Д-З) Температуры агрегации (T_{ar}) NCS-1 в этих условиях, определенные по светорассеянию при 350 нм.

Выявленное снижение термостабильности NCS-1 в присутствии Zn²⁺ ассоциировано с возрастанием склонности белка к агрегации, которая выражается в снижении температуры агрегации (T_{ar}): последнюю определяли методом мониторинга светорассеяния NCS-1 при 350 нм. Так, апо-NCS-1 имеет T_{ar}, равную 67°С. Присутствие Mg²⁺ не сказывается на этой величине, зато связывание Ca²⁺ способствует ее повышению до >90°С (Рис. 48Д). При этом добавление более чем четырехкратного избытка Zn²⁺ снижает T_{ar} всех форм NCS-1 (Рис. 48Д-Ж). Добавим, что связывание Ca²⁺ с Zn²⁺-NCS-1 предотвращает агрегацию, значительно повышая T_{ar} (Рис. 48З), что согласуется выявленным стабилизирующим действием Ca²⁺ на структуру белка (см. Рис. 48Г).



Рис. 49. Воздействие ионов (II) металлов на термостабильность рековерина и его склонность к агрегации. (А-Б) Температуры полуперехода (T_{1/2}) термического разворачивания рековерина в присутствии ионов кальция и цинка и их сочетаний, измеренные методом дифференциальной сканирующей флуориметрии. (В-Г) Температуры агрегации (T_{аг}) рековерина в этих условиях, определенные по светорассеянию при 350 нм.

Так же, как и в случае NCS-1, Zn²⁺ дестабилизирует структуру рековерина, однако для этого белка нарушение структуры и агрегация инициируются в присутствии даже небольших концентраций Zn²⁺. Апо-форма рековерина изначально несколько более стабильна (T_{1/2}=69°C), чем апо-форма NCS-1, а связывание Ca²⁺ дополнительно повышает ее T_{1/2} до 80°C (Рис. 49А). При этом в присутствии Zn²⁺ T_{1/2} Ca²⁺-связанной формы рековерина снижается до 65°C, а апо-формы – до 43°C (Рис. 49А-Б). Более того, уже двукратный избыток Zn²⁺ индуцирует агрегацию рековерина, причем этот эффект особенно выражен в отсутствие Ca²⁺ (Рис. 49В). Добавим, что,
как и в случае NCS-1, присутствие Ca^{2+} несколько стабилизирует Zn^{2+} -связанный рековерин, повышая как $T_{1/2}$, так и $T_{a\Gamma}$ белка (Рис. 34Б,Г).

На основании полученных данных можно заключить, что, в отличие от рековерина, структура апо-NCS-1 и Mg^{2+} -NCS-1 несколько стабилизируется в присутствии низких концентраций Zn^{2+} , соответствующих насыщению Zn^{2+} -связывающих сайтов в этих формах белка. Однако, в целом, при повышении уровня Zn^{2+} все варианты NCS-1 и рековерина постепенно становятся менее устойчивыми и более склонными к агрегации. В свою очередь, координация Ca^{2+} в Zn^{2+} -связанные формы обоих белков стабилизирует их за счет образования $Ca^{2+}(Zn^{2+})$ -связанных конформеров.

3.2.4.4. Выявление потенциальных Zn²⁺-связывающих сайтов в структуре NCS-1

Результаты описанных выше структурных исследований впервые продемонстрировали, что ионы цинка могут координироваться не только в апо-NCS-1, но и в Ca^{2+} -связанную форму белка с образованием нового конформера $Zn^{2+}(Ca^{2+})$ -NCS-1. Поскольку структура Ca^{2+} -NCS-1 ранее была разрешена методом рентгеноструктурного анализа (PDB 5AEO), мы попытались предсказать расположение сайтов связывания Zn²⁺ в этой форме методами структурной биоинформатики с использованием следующего подхода [33]. На первом этапе был произведен анализ усредненной геометрии координации Zn^{2+} во всех известных Zn^{2+} -связывающих белках, представленных в PDB. На основе полученных результатов были определены потенциальные области связывания Zn^{2+} в структуре Ca^{2+} -NCS-1 путем построения плотности вероятности связывания на сетке с шагом 0,1 Å (Рис. 50А). Было обнаружено, что единственными участками с необходимым количеством хелатирующих групп для Zn²⁺ являются петли трех функциональных EF-hand-мотивов, заполненных ионами кальция: EF2 (лучшая находка), EF3 и EF4. Размер этих участков составляет примерно 4,5 Å, что позволяет одновременно разместить в них ионы кальция и цинка. Более того, подобная конфигурация является выгодной, компенсируя негативный заряд (-2 в EF2, -1 в EF3 и EF4), который остается на петлях EF-hand-мотивов после связывания Ca²⁺. Чтобы верифицировать описанный вариант координации катионов, на втором этапе мы выполнили КМ/ММ моделирование молекулярной динамики, ассоциированной со связыванием Zn²⁺ в каждый из трех занятых Ca²⁺ EF-hand-мотивов. Выяснилось, что в EF2 в присутствии Zn²⁺ количество координаторов вокруг ионов кальция снижается с семи до шести, но большинство хелатирующих остатков петли (Asp73, Asn75, Asp77, Arg79, Glu81), как и молекула воды, остаются вовлеченными в связывание (Рис. 50Б). В этом случае координация Zn²⁺ эффективно осуществляется четырьмя атомами кислорода: двумя из Asp73 (атомы αкарбонильной и β-карбоксильной группы), и по одному из Asn75 и Glu84. Напротив, одновременная координация двух ионов в EF3 является невыгодной: Ca²⁺ при этом теряет три

хелатора и координируется Asp109, Asp111, Glu120 и молекулой воды, в то время как в связывании Zn^{2+} участвуют только три атома кислорода из Tyr115, Asp109 и Asp111 (Puc. 50B). Наконец, в EF4, оба катиона связываются в оптимальной координации: Ca²⁺ хелатирован Glu168, Asp157, Asn159, Asp161, Lys163 (основная цепь) и молекулой воды, в то время как цинк связан с Met156 (основная цепь), Asp157, Glu168 и молекулой воды (Puc. 50Г).



Рис. 50. Структура потенциальных Zn^{2+} -связывающих сайтов NCS-1. (A) Вероятностная плотность связывания ионов цинка в кристаллической структуре Ca²⁺-связанного NCS-1 (PDB 5AEQ), рассчитанная, исходя из усредненной геометрии Zn²⁺-связывающих сайтов белков из PDB: вероятность расположения катиона возрастает от желтого к черному. (Б-Г) Расположение Zn²⁺-хелатирующих групп в (Б) EF2, (В) EF3 и (Г) EF4, согласно результатам KM/MM моделирования. Синими сферами представлены ионы цинка, зелеными сферами – ионы кальция, голубыми сферами – молекулы воды.

Таким образом, проведенное молекулярное моделирование демонстрирует, что в случае Ca^{2+} -NCS-1 энергетически выгодным может быть связывание только двух ионов цинка в EF2 и EF4 (EF3 будет содержать только Ca^{2+}) что согласуется с результатами, полученными методом ИКТ (см. Рис. 42). Отметим, что полученные данные не только предлагают механизм координации цинка с Ca^{2+} -NCS-1, но и дают основания полагать, что связывание ионов кальция с Zn^{2+} -NCS-1 будет происходить в те же второй и четвертый EF-hand-мотивы, в то время как EF3 будет всегда заполнен либо одним, либо другим катионом. Кроме того, описанная конфигурация

косвенно свидетельствует о том, что и в апо- $/Mg^{2+}$ -связанной формах белка Zn^{2+} может координироваться в EF-hand-мотивы, что согласуется с данными спектроскопии КД (см. Рис. 44).

В случае рековерина ранее считалось, что белок связывает единственный ион цинка вне EFhand доменов, поскольку его мутанты с критичной для координации Ca²⁺ заменой E \rightarrow Q в 12-ом положении функциональных петель EF2 и EF3, сохраняют способность связывать Zn²⁺ [298]. Однако с учетом результатов проведенного нами моделирования указанные мутации совсем не обязательно должны препятствовать координации Zn²⁺, который может связываться с другими хелаторами внутри петли. Таким образом, нельзя исключить, что, подобно NCS-1, Ca²⁺связанный рековерин также связывает Zn²⁺ в один из функциональных EF-hand-мотивов. Поскольку в отличие от NCS-1 рековерин содержит только два таких мотива (EF4 не функционален из-за замен металлсвязывающих остатков в первом и третьем положениях петли), координация единственного иона цинка (см. Рис. 43) может, по аналогии с NCS-1, осуществляться в центр EF2 Ca²⁺-связанного рековерина [386].

3.2.4.5. Характеристика функциональных свойств NCS-1 в присутствии ионов цинка

Описанные выше структурные исследования показали, что физиологически релевантные формы Mg^{2+} -NCS-1 и Ca²⁺-NCS-1 способны связывать Zn^{2+} , причем в присутствии его низких концентраций образуются относительно стабильные $Zn^{2+}(Mg^{2+})$ - и $Zn^{2+}(Ca^{2+})$ -связанные формы NCS-1. Эти конформеры обладают уникальной структурой, а значит, могут иметь уникальную активность в фоторецепторной клетке. Для проверки этого предположения мы изучили влияние Zn²⁺ на обнаруженные нами новые функциональные свойства NCS-1 – его способность взаимодействовать с фоторецепторными мембранами и с родопсинкиназой, а также (в качестве контроля) – на его способность связываться с дофаминовым рецептором D2R, представляющим собой специфическую мишень белка в нейронах ЦНС [72, 104, 107, 108]. По данным, полученным методом равновесного центрифугирования, присутствие Zn²⁺ практически не оказывает влияния на ассоциацию Mg^{2+} -NCS-1 и Ca²⁺-NCS-1 с фоторецепторными мембранами (Рис. 51А). Этим NCS-1 отличается от рековерина, сродство которого к фоторецепторным мембранам усиливается при связывании Zn^{2+} даже в отсутствие Ca^{2+} , что будет определять внутриклеточную локализацию этого белка/2987. Между тем, Zn²⁺ оказывает заметное влияние на связывание мишеней NCS-1. По данным, полученным методом аффинного соосаждения, в присутствии концентраций Zn²⁺, обеспечивающих связывание одного катиона на молекулу белка, Ca²⁺-NCS-1 связывает родопсинкиназу (N-концевой домен, полученный в виде химерного белка с GST, GST-GRK1¹⁻¹⁸³), в два раза эффективнее, чем в отсутствие Zn²⁺ (Рис. 51В). Сходный эффект, по данным ИКТ, наблюдается при взаимодействии NCS-1 с пептидом D2R (N430-R443): в отсутствие Zn²⁺ один моль Ca²⁺-NCS-1 связывает два моля пептида с константой диссоциации

30 мкМ, в то время как при добавлении Zn²⁺ аффинность Ca²⁺-NCS-1 к D2R возрастает в 3,5 раза с сохранением исходной стехиометрии (Рис. 51Б). Добавим, что выраженное повышение концентрации Zn²⁺ наоборот приводит к постепенной дестабилизации комплексов NCS-1 с мишенями, что согласуется с зафиксированным ранее нарушением структуры белка в присутствии избытка этого металла (см. Рис. 48). Поскольку обнаруженный эффект Zn²⁺ на связывание с мишенями может быть обусловлен более выраженным экспонированием гидрофобных сайтов NCS-1, посредством которых он взаимодействует с родопсинкиназой и D2R, далее мы исследовали доступность таких сайтов в соответствующих конформерах белка, используя флуоресцентный краситель бис-АНС (Рис. 52) [33]. Оказалось, что в присутствии ионов цинка Ca²⁺-связанная форма NCS-1 действительно демонстрирует несколько повышенную поверхностную гидрофобность, что может частично обуславливать наблюдаемое увеличение сродства Zn²⁺(Ca²⁺)-связанного NCS-1 к родопсинкиназе и D2R.



Рис. 51. Функциональные особенности Zn^{2+} -связанного NCS-1. (A) Связывание NCS-1 с фоторецепторными мембранами при добавлении возрастающих концентраций Zn^{2+} (в % от контроля – связывания в присутствии Ca^{2+} /отсутствие Zn^{2+}). (Б) Титрование 50 мкМ пептида N430-R443 рецептора дофамина D2 0-500 мкМ NCS-1 в присутствии 1 мМ Ca^{2+} , либо 100 мкМ Zn^{2+} и 1 мМ Ca^{2+} : репрезентативные кривые титрования (вверху) и изотермы связывания (внизу). Внизу черными сплошными линиями показаны лучшие аппроксимирующие кривые по модели «один набор сайтов». (В) Относительная эффективность связывания NCS-1 с иммобилизованным фрагментом родопсинкиназы 1-25, определенная методом аффинного соосаждения. *p < 0,05.

В совокупности полученные данные указывают на то, что при низких концентрациях Zn^{2+} воздействует на NCS-1 как в состоянии покоя, оказывая стабилизирующее влияние на его Mg^{2+} - связанную форму (см. Рис. 48), так и в присутствии Ca^{2+} , увеличивая сродство активированного NCS-1 к родопсинкиназе и D2R и тем самым усиливая его регуляторную активность. В сетчатке

высвобождение небольших концентраций Zn^{2+} (формирование пула так называемого "слабосвязанного" цинка или loosely-bound zinc) может быть характерным для наружных сегментов фоторецепторов, где оперирует родопсинкиназа, а также в их синаптических окончаниях, где, по нашим данным, локализуется значительная часть NCS-1 (см. Рис. 23) [396]. Таким образом, связывание Zn^{2+} может оказывать влияние не только на новую активность NCS-1 как регулятора десенситизации родопсина, но и на его хорошо изученную роль в Ca²⁺ зависимой регуляции нейротрансмиссии и синаптической пластичности [75, 85, 108, 174]. Важно отметить, что, хотя координация Zn^{2+} является общим свойством NCS-1 и рековерина, связывание этого катиона оказывает разные эффекты на мембранную локализацию и активность обоих белков, что может диверсифицировать их функцию в фоторецепторной клетке.



Рис. 52. Влияние Zn^{2+} на поверхностную гидрофобность NCS-1. Спектры флуоресценции бис-АНС в присутствии Ca^{2+} - и Mg^{2+} -связанного NCS-1 до и после добавления 100 мкМ Zn^{2+} .

3.2.4.6. Характеристика структурных свойств NCS-1 в присутствии повышенной концентрации Zn²⁺

Как известно, неконтролируемое повышение уровня Zn^{2+} в нейронах может вызывать патологические эффекты, такие как агрегация нейрональных белков (см. далее). Поскольку аналогичные эффекты могут реализоваться в фоторецепторах, обладающих беспрецедентно высоким содержанием Zn^{2+} , на следующем этапе мы задались вопросом, насколько NCS-1 будет чувствителен к подобным патологическим изменениям внутриклеточной среды [396]. Мониторинг температурных зависимостей светорассеяния белка при 350 нм показал, что склонность NCS-1 к агрегации в присутствии высоких концентраций Zn^{2+} уменьшается в ряду апо-NCS-1>Mg²⁺-NCS-1>Ca²⁺-NCS-1 (Рис. 53А). Так, в случае апо-NCS-1 и Mg²⁺-NCS-1 снижение T_{ar} начинается сразу после того как концентрация Zn^{2+} превышает уровень, необходимый для насыщения соответствующей формы белка, в то время как на фоне Ca²⁺ это происходит при_{своб}.>100 мкМ. При физиологических температурах явные признаки агрегации апо-NCS-1 и Mg²⁺-NCS-1 наблюдаются уже при_{своб}.=300 мкМ, в то время как присутствие Ca²⁺ лишь немного снижает восприимчивость белка к дестабилизирующему воздействию высоких концентраций Zn^{2+} . Поскольку в пределе агрегация может приводить к необратимой преципитации белка, мы также исследовали влияние Zn^{2+} на преципитацию Mg^{2+} -связанного и Ca^{2+} -связанного NCS-1 (Рис. 53Б). Оказалось, что формирование преципитатов NCS-1 начинается уже при 200 и 300 мкМ свободного Zn^{2+} для каждой из этих форм, соответственно. Чтобы визуализировать макроструктуру нерастворимых конгломератов NCS-1, образующихся в присутствии Zn^{2+} , мы исследовали соответствующий белковый преципитат с помощью электронной микроскопии (Рис. 53В). Обнаружено, что Zn^{2+} -NCS-1 образует фибриллярные структуры типа «скрученная веревка», напоминающие агрегаты других нейрональных белков, Zn^{2+} -зависимая агрегация которых ассоциирована с развитием нейродегенеративных заболеваний [399]. На основании полученных результатов можно сделать вывод, что при высоких концентрациях Zn^{2+} связывается с NCS-1 неспецифическим образом, что дестабилизирует структуру белка, провоцирует его агрегацию и преципитацию, которые особенно заметны в отсутствие ионов кальция.



Рис. 53. Патологическое воздействие высоких концентраций Zn^{2+} на структуру NCS-1. (A) Зависимость температуры агрегации NCS-1 от концентрации свободного Zn^{2+} . (Б) Преципитация бескальциевой и Ca²⁺-связанной форм NCS-1 при добавлении 0-500 мкМ Zn²⁺. (В-Г) Электронные микрофотографии преципитатов NCS-1 в присутствии 5 мМ Zn²⁺. Масштабная линейка: 500 нм (В) и 200 нм (Г).

Важно отметить, что нарушения цинкового гомеостаза в нервной ткани тесно связаны с неврологическими и нейроофтальмологическими заболеваниями. Так, повышение Zn²⁺ в сетчатке, связанное с ишемией, нарушениями кровообращения и гипокликемией, приводит к гибели нейронов [400-402]. В целом, нейроны, подвергнутые воздействию высоких внутриклеточных концентраций Zn²⁺, проявляют повышенную склонность к апоптозу, механизм индукции которого может включать Zn²⁺-индуцированную агрегацию нейрональных белков12505647] [403-405]. Примером этих процессов является болезнь Альцгеймера, на ранних стадиях которой наблюдается повышенная экспрессия цинковых транспортеров, свидетельствующая о накоплении свободного Zn^{2+} , который может стимулировать агрегацию бета-амилоида [406]. NCS-1 с одной стороны имеет нейропротекторную функцию (см. раздел 1.4.8), а с другой – вовлечен в патогенез нейродегенеративных заболеваний, в том числе, болезни Альцгеймера, которая ассоциирована с изменениями экспрессии этого белка (см. раздел 1.5) [258]. Результаты настоявшей работы говорят о том, что неспецифическое связывание избыточного Zn²⁺ провоцирует агрегацию и преципитацию NCS-1, которые могут способствовать развитию дегенеративных процессов в нейронах, в том числе, в клетках сетчатки.

Подводя итог, можно сказать, что NCS-1 и его гомолог рековерин, несмотря на общее сходство, характеризуются целым набором индивидуальных особенностей, которые позволяют эффективно разграничить их роли в фоторецепторной клетке. Так, уникальная структура Сконцевого сегмента рековерина обуславливает функциональность его Ca²⁺-миристоильного переключателя и обратимость неспецифического связывания с фоторецепторными мембранами, в то время как специальные регуляторные участки на N-и C-концах NCS-1 обеспечивают распознавание белком фосфолипидного состава клеточных мембран (преимущественно кислых фосфолипидов и PI3P) и необратимое по Ca²⁺ связывание белка со строго определенными мембранными участками. Эти свойства будут определять различия в мембранной локализации рассматриваемых белков. Кроме того, гибкий С-концевой сегмент NCS-1 отвечает за формирование уникального сайта связывания родопсинкиназы, который отличается от такового в рековерине. Разная структура металлсвязывающих сайтов NCS-1 и рековерина будет приводить к тому, что в светоадаптированной фоторецепторной клетке первый будет находиться в Mg²⁺связанной, второй – в апо-форме, в то время как переход в активированную (открытую) конформацию в случае NCS-1 будет происходить при более низких концентрациях Ca^{2+} , чем в случае рековерина. Последнее свойство в совокупности с конститутивной мембранной локализацией будут способствовать тому, что NCS-1 будет быстрее реагировать на локальные сигналы Ca²⁺ и связывать родопсинкиназу в условиях, когда рековерин еще или уже не активен, т.е. ингибирование фосфорилирования родопсина этими белками будет происходить последовательно в соответствующих диапазонах концентрации катиона. Наконец, NCS-1,

подобно рековерину, связывает ионы цинка, причем намного эффективнее, чем рековерин, что делает NCS-1 не только кальциевым, но и потенциальным цинковым сенсором в фоторецепторах. Невысокие концентрации Zn^{2+} усиливают регуляторную активность Ca^{2+} -NCS-1 в отношении родопсинкиназы и стабилизируют структуру Mg^{2+} -NCS-1, что также будет отличать NCS-1 от рековерина, структура которого не толерантна даже к небольшим избыткам катиона. Вместе с тем, повышение внутриклеточного Zn^{2+} до микромолярного уровня способствует дестабилизации и агрегации обоих HKC, что может играть роль в инициации патологических процессов в фоторецепторной клетке.

3.3. АБЕРРАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ФОТОРЕЦЕПТОРНОГО NCS-1 В ПАТОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ

Как мы показали, присутствие избытка Zn²⁺ оказывает деструктивное воздействие на структуру NCS-1 *in vitro*. Эти эффекты аналогичны тем, которые наблюдаются в случае других нейрональных белков при различных нейродегенеративных протеинопатиях. С учетом этого, было необходимо ответить на ряд вопросов: в каких условиях подобный избыток Zn²⁺ может образовываться в фоторецепторной клетке и как повышение концентрации этого иона вместе с ассоциированной агрегацией NCS-1 могут быть связаны с развитием дегенеративных процессов в этих клетках. Известно, что в так называемых «глюцинергических» нейронах мозга, а также в нейронах сетчатки, включая фоторецепторы, Zn²⁺ выполняет роль нейротрансмиттера наряду с глутаматом [407, 408]. Воздействие глутамат-индуцированного повышения уровня Ca²⁺ может приводить к закислению цитоплазмы и высвобождению внутриклеточного Zn²⁺ [409]. Однако более важным является повышение свободного Zn^{2+} в условиях окислительного стресса, когда Zn²⁺ высвобождается из буферных белков металлотионеинов в ответ на окисление остатков цистеина, входящих в состав сайтов связывания этого катиона типа "цинковые пальцы" [403]. Нейроны сетчатки чрезвычайно склонны к развитию хронического окислительного стресса, что связано с высокой метаболической активностью этой ткани в сочетании с постоянным воздействием на нее светового излучения и высоким содержанием фоточувствительных молекул – производных хромофорной группы родопсина (ретиналя) [410]. Светоиндуцированный окислительный стресс вызывает повреждения липидов и белков, и, в конечном счете, может приводить к апоптозу фоторецепторов сетчатки. Эти процессы ассоциированы с накоплением токсичных уровней свободного Zn^{2+} , источником которого в этих клетках, помимо металлотионеинов, может быть окисленный родопсин, который составляет около 70% от суммарного белка и исходно связывает до 7 ионов цинка на димер [398, 411, 412]. Окислительная и Zn²⁺-зависимая гибель фоторецепторов и других нейронов сетчатки лежит в основе таких

распространенных зрительных заболеваний, как светоиндуцированная ретинопатия, возрастная макулодистрофия (ВМД), диабетическая ретинопатия и глаукома [398, 413, 414].

Эффекты избыточного Zn²⁺ обычно опосредуются регуляторными белками, содержащими различные сайты связывания этого металла [415, 416]. Условия окислительного стресса также распознаются специализированными белками, запускающими механизмы редокс-регуляции и компенсаторные ответы клетки. В настоящей работе мы предположили, что NCS-1 может совмещать оба этих свойства. Так, с одной стороны он способен высокоаффинно связывать Zn²⁺ (см. раздел 3.2.4). С другой стороны, по аналогии с другими НКС он может быть редоксчувствительным белком. Действительно, по нашим предыдущим данным, в структуре большинства НКС присутствуют консервативные (в составе первого, нефункционального ЕГhand-мотива) и неконсервативные редокс-чувствительные остатки цистеина [314, 417]. При воздействии основного внутриклеточного окислителя – перекиси водорода – сульфгидрильные группы подобных остатков в белках образуют остатки сульфеновой кислоты, которая либо (при сближенной SH-группы) наличии второй пространственно вступает В реакцию образованием диспропорционирования с дисульфидной связи И формированием соответствующего димера/мультимера, либо может далее необратимо окисляться до сульфиновой или сульфоновой кислот. По нашим предыдущим данным, рековерин, содержащий единственный консервативный остаток цистеина СЗ9, в условиях окислительного стресса фоторецепторных клеток образует дисульфидные димеры, что оказывает существенное влияние на его структуру и активность в фоторецепторной клетке [314]. Поскольку NCS-1 содержит точно такой же единственный остаток цистеина (СЗ8), на завершающем этапе работы мы задались целью проверить наличие редокс-чувствительности у этого белка in vivo и in vitro, охарактеризовать структуру и функцию его окисленных форм (в случае их наличия), а также определить вклад NCS-1 в механизмы редокс/Zn²⁺-зависимой гибели фоторецепторов.

3.3.1. Определение редокс-статуса фоторецепторного NCS-1 в условиях светоиндуцированного окислительного стресса *in vivo*

Для того чтобы охарактеризовать редокс-чувствтельность NCS-1 в фоторецепторной клетке вне и на фоне окислительного стресса мы использовали модель светоиндуцированного окислительного повреждения сетчатки (светоиндуцированной ретинопатии) экспериментальных животных – кроликов (*O. cuniculus*). Проведенный нами анализ литературных данных показал, что, хотя для создания моделей зрительных заболеваний часто применяются традиционные виды мелких грызунов, использование кроликов является более обоснованным, поскольку их зрительная система имеет значительно больше общих анатомических и биохимических особенностей с таковой у людей по сравнению с грызунами (включая больший размер глаз), а

153

также они имеют более длительную продолжительность жизни [418]. Для создания условий фотоповреждения глаза кроликов подвергали облучению видимым светом высокой интенсивности (30000 люкс; 0,15 Вт/см²) в течение 3 ч. Сразу после облучения, а также спустя 3 или 7 дней животных подвергали эвтаназии и получали образцы заднего сектора глаза (для гистологической характеристики произведенных повреждений и определения апоптоза нейронов сетчатки *in situ*), либо образцы сетчатки для выявления признаков окислительного стресса и определения редокс-статуса NCS-1 в соответствующих экстрактах.



Рис. 54. Морфология заднего сектора глаза кролика после облучения видимым светом высокой интенсивности. (А) Интактная сетчатка, окрашенная гематоксилином/эозином. (Б) Сетчатка сразу после облучения светом с интенсивностью 30000 люкс в течение 3 часов. (В-Г) Сетчатка спустя 3 дня после облучения. Ск – склера, ПЭС – пигментный эпителий, ФС – фоторецепторный слой, НЯС – наружный ядерный слой, ВЯС – внутренний ядерный слой, ГС – ганглиозный слой. На рисунке отмечены признаки светоиндуцированных повреждений сетчатки: белые стрелки – макрофагоподобные клетки в щели между пигментным эпителием и фоторецепторами, звездочки - области отслоения сетчатки, красные стрелки (В, врезка) – признаки кариопикноза в наружном ядерном слое, желтые стрелки (В, врезка) – изменения в пигментном эпителии. Масштабная линейка: 200 мкМ.

3.3.1.1. Морфологическая характеристика светоиндуцированного (окислительного) повреждения сетчатки кролика

Гистологический парафинизированных срезов сектора анализ заднего глаз экспериментальных животных показал, что сразу после облучения явных изменений по сравнению с интактным глазом не происходит, однако уже на 3-ий день в центральной светочувствительной области сетчатки развиваются очаговые повреждения, затрагивающие фоторецепторный слой и слой пигментного эпителия сетчатки (ПЭС) (Рис. 54). В области наибольшего поражения отсутствуют как наружные, так и внутренние сегменты фоторецепторов, а наружный ядерный слой сетчатки разрежен и демонстрирует признаки апоптоза. Эти повреждения сопровождаются гибелью клеток внутреннего ядерного слоя и истончением наружного плексиформного слоя, а клетки ПЭС активируются и увеличиваются в размерах, мигрируя в направлении гибнущих фоторецепторов. В очагах отслоения сетчатки, наполненных остатками фоторецепторов и активированными клетками ПЭС, также присутствуют группы макрофагов. Морфометрический анализ сетчатки, проведенный на 7-ой день эксперимента, показал, что средняя толщина наружного ядерного слоя (содержащего ядра фоторецепторов) в результате облучения снижается с ~20 мкм до <16 мкм, т.е. примерно на 20% (Рис. 55).



Рис. 55. Истончение наружного ядерного слоя сетчатки кролика после облучения видимым светом высокой интенсивности. (А) Репрезентативные микрофотографии сетчатки кроликов до и после облучения светом с интенсивностью 30000 люкс в течение 3 часов (окрашивание гематоксилином/эозином). Толщина наружного ядерного слоя для каждой сетчатки определена как среднее между измерениями в двух точках (красные стрелки) на расстоянии 1 мм от проекции зрительного нерва (синяя стрелка). (Б) Результаты расчетов средней толщины наружного ядерного слоя до и после облучения. *p < 0,05.

Мониторинг развития апоптоза фоторецепторов, выявленного при гистологическом анализе, был проведен *in situ* методом детекции олигонуклеосомных разрывов ДНК (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling, TUNEL) (Puc. 56). Показано, что отдельные фоторецепторы становятся TUNEL-положительными уже непосредственно после облучения, через 3 суток в области отслоения сетчатки присутствуют окрашенные апоптотические тельца и фагоцитирующие их макрофаги, а к 7-м суткам процесс полностью завершается. Добавим, что помимо ядер фоторецепторов выраженное окрашивание наблюдается во внутреннем ядерном и ганглиозном слоях, что указывает на вовлеченность и вторичных нейронов сетчатки в патологический процесс. В целом, разработанная нами модель воспроизводит повреждения фоторецепторов сетчатки, наблюдаемые у пациентов с светоиндуцированной ретиопатией и BMД, а также в ранее разработанных животных моделях окислительного фотоповреждения сетчатки, а значит, подходит для изучения редокс-статуса NCS-1 [419, 420].



Рис. 56. Детекция олигонуклеосомной деградации ДНК методом TUNEL в сетчатке кролика после облучения видимым светом высокой интенсивности. (А) Интактная сетчатка. (Б) Сетчатка сразу после облучения светом с интенсивностью 30000 люкс в течение 3 часов. (В) Сетчатка спустя 3 дня после облучения. (Г) Сетчатка спустя 7 дней после облучения. ФС – фоторецепторный слой, НЯС – наружный ядерный слой, ВЯС – внутренний ядерный слой, ГС – ганглиозный слой. Красные стрелки – апоптотические тельца, белая стрелка – макрофаг. Зеленый – сигнал TUNEL, синий – ядра (DAPI). Масштабная линейка: 50 мкМ.

3.3.1.2. Биохимическая характеристика светоиндуцированного (окислительного) повреждения сетчатки кролика и определение редокс-статуса NCS-1

Поскольку наиболее вероятной окисленной формой NCS-1 являлся его дисульфидный димер (по аналогии с рековерином), мониторинг редокс-статуса NCS-1 было решено проводить белка. детектируемой методом по накоплению этой формы иммуноблоттинга В невосстанавливающих условиях (без добавления β-меркаптоэтанола). Перед этим было необходимо охарактеризовать динамику развития светоиндуцированного окислительного стресса нейронов сетчатки кроликов, в первую очередь, по накоплению окислителя, вызванного облучением. По данным биохимических экспериментов с использованием колориметрической реакции на H_2O_2 (на основе системы Fe^{2+} /ксиленола оранжевого), уже на первые сутки после воздействия светом в экстрактах сетчатки кроликов наблюдается более чем трехкратное

увеличение концентрации H₂O₂ (Рис. 57А). Более того, этот эффект сопровождается 2,5-кратным увеличением уровня малонового диальдегида (его детекция производится с помощью цветной реакции тиобарбитуровой кислоты), который является маркером окислительного повреждения липидов (Рис. 57Б). Оба параметра постепенно нормализуются и достигают исходного уровня только на 7-ой день после облучения. Таким образом, именно в течение первых суток после облучения в клетках сетчатки происходит максимальное увеличение редокс-потенциала среды, что должно приводить к окислению белков.



Рис. 57. Развитие окислительного стресса в сетчатке кролика после облучения видимым светом высокой интенсивности. (А) Содержание перекиси водорода и (Б) малонового диальдегида в гомогенате сетчатки после облучения светом с интенсивностью 30000 люкс в течение 3 часов, нормализованное на общую концентрацию белка. *p < 0,05.

Важно отметить, что иммуноблоттинг тех же самых экстрактов сетчатки (образцы, полученные на 3 и 7 дней после облучения) показал, что NCS-1 окрашивается в виде единственной полосы, соответствующей мономерной форме белка (данные не показаны). Мы предположили, что на этих этапах NCS-1 либо восстановлен, либо образует необратимо окисленный мономер с остатком сульфиновой/сульфоновой кислоты. В связи с этим, поиск дисульфидного димера белка было решено осуществлять в экстрактах сетчатки, полученной сразу после или в процессе облучения. Действительно, проведенные исследования показали, что наибольшее количество NCS-1-позитивных полос наблюдается через 20 мин после начала засветки, причем одна из этих форм по массе соответствует димеру белка и исчезает при добавлении к пробе агентов, восстанавливающих серу (Рис. 58). При этом к завершению облучения (3 часа) снижается не только количество этой формы, но и общее содержание NCS-1 в сетчатке, что, предположительно, связано с интенсивной утилизацией различных окисленных форм белка (в том числе, окисленного мономера). С учетом полученных данных мы сделали вывод, что NCS-1 действительно чувствителен к окисляющим условиям в сетчатке и реагирует на них образованием дисульфидного димера, который очевидно образуется с участием единственного остатка цистеина СЗ8.



Рис. 58. Окисление NCS-1 в сетчатке кролика *in vivo* после облучения видимым светом высокой интенсивности. Иммуноблот в невосстанавливающих условиях экстракта сетчатки кроликов до и после облучения ярким светом (30000 люкс), окрашенный антителами против NCS-1.

3.3.2. Характеристика редокс-чувствительности NCS-1 in vitro

3.3.2.1. Определение условий и механизма дисульфидной димеризации NCS-1

Для того чтобы предсказать условия, способствующие дисульфидной димеризации NCS-1 в фоторецепторной клетке, мы протестировали влияние различных факторов на этот процесс в экспериментах *in vitro*. Установлено, что при инкубации очищенного рекомбинантного NCS-1 в присутствии возрастающих концентраций перекиси водорода действительно происходит накопление дисульфидного димера белка, причем наиболее эффективно окисляются его Zn^{2+} -связанная и $Zn^{2+}(Ca^{2+})$ -связанная формы (Рис. 59А). Примечательно, что образование димера полностью ингибируется в присутствии денатурирующих агентов, что говорит о структурной детерминированности процесса. По всей видимости, формированию межмолекулярной дисульфидной связи предшествует нековалентная димеризация белка, которая наиболее выгодна в случае Zn^{2+} -NCS-1 и $Zn^{2+}(Ca^{2+})$ -NCS-1. Отметим, что одновременное повышение концентрации Ca^{2+} и Zn^{2+} на фоне роста редокс-потенциала среды соответствует условиям, характерные для светоиндуцированного окислительного стресса фоторецепторов сетчатки, что еще раз подтверждает физиологичность дисульфидной димеризации NCS-1.

3.3.2.2. Определение механизма дисульфидной димеризации NCS-1

Поскольку Zn²⁺ является редокс-нейтральным металлом, одним из возможных механизмов, в соответствии с которым его присутствие способствует дисульфидной димеризации NCS-1, может быть увеличение поверхностной доступности сульфогруппы C38 в Zn²⁺-сязанных конформерах белка. Для проверки этого предположения мы произвели окрашивание различных форм NCS-1 красителем 5.5'-дитиобис-2-нитробензойной кислотой (реактив Эллмана), модифицирующим свободные SH-группы в белках. Однако выяснилось, что наибольшей поверхностной доступностью остаток цистеина обладает в апо-форме NCS-1, в то время как связывание любых ионов не увеличивает, а напротив, слегка уменьшает поверхностную доступность SH-группы NCS-1 (Рис. 59Б). Этот результат косвенно подтверждает, что восприимчивость конформеров NCS-1 в значительной степени определяется их структурными свойствами, которые обуславливают их склонность к нековалентной димеризации, предшествующей окислению. Одним таких свойств может быть ИЗ поверхностная гидрофобность: именно Zn²⁺-связанные формы (наряду с апо-формой) NCS-1 обладают наибольшей поверхностной гидрофобностью (см. Рис. 52) и более всего подвержены дисульфидной димеризации среди форм белка. Добавим, что связывание Zn²⁺ приводит к локальным изменениям в структуре NCS-1 (см. раздел 3.2.4.2), что может менять и восприимчивость SH-группы цистеина к окислению. Действительно, редокс-чувствительность цистеинов белка зависит от ИХ локального окружения, таких как присутствие протоноакцепторных групп, стимулирующих образование тиолят-анионов, а также от участия последних в образовании внутримолекулярных водородных связей [421, 422].



Рис. 59. Окисление NCS-1 *in vitro*. (А) Димеризация рекомбинантного NCS-1 на фоне возрастающих концентраций H₂O₂: репрезентативные электрофореграммы в невосстанавливающих условиях (вверху) и результаты их денситометрического обсчета (внизу). (Б) Поверхностная доступность редокс-чувствительной SH-группы NCS-1: развитие цветной реакции Эллмана при взаимодействии ДТНБ с цистеином-38 NCS-1 в присутствии ионов кальция, магния, цинка и их сочетаний.

3.3.2.3. Связывание Ca²⁺ и структурные свойства дисульфидного димера NCS-1

Для того, чтобы предсказать эффект окисления NCS-1 на его активность в фоторецепторной клетке, прежде всего, было необходимо охарактеризовать Ca²⁺-связывающие и структурные свойства дисульфидного димера белка. Очищенный препарат димера был получен путем мягкого окисления рекомбинантного NCS-1 в процессе диализа с последующим отделением примеси мономера с помощью гель-фильтрации (Рис. 60А). Исследование температурной зависимости $\lambda_{\text{макс}}$ собственной флуоресценции полученного димера NCS-1 показало, что в отсутствие Ca²⁺ он имеет примерно такую же температуру плавления ($T_{1/2}=65^{\circ}$ С в присутствии Mg^{2+}), как и мономер, и не теряет способности связывать Mg^{2+} и Ca^{2+} . В то же время, димер отличается тем, что координация Ca²⁺ достаточно слабо влияет на его термостабильность (Рис. 60Б). Это наблюдение согласуется с результатами, полученными другими спектральными методами. Так, по данным ДСФ, амплитуда снижения I₃₅₀/I₃₃₀, при связывании Ca²⁺ для димера выражена слабее, что говорит о более умеренных Ca²⁺-зависимых конформационных перестройках в димере, чем в восстановленном белке (Рис. 60Г). Более того, по данным КД, изменения вторичной структуры белка в результате координации Ca^{2+} (повышение доли α -спиралей и снижение доли β -слоев) в димере также выражены значительно в меньшей степени, то есть по своей вторичной структуре Ca²⁺-связанный димер больше напоминает апо-форму мономера NCS-1 (Рис. 60В). Наконец, эксперименты с использованием бис-АНС демонстрируют, что димер обладает значительно повышенной поверхностной гидрофобностью в сравнении с мономером, причем связывание Ca²⁺ не способствует повышению поверхностной гидрофобности димера, как это характерно для восстановленной формы NCS-1, а напротив, несколько снижает эту характеристику белка (Рис. 60Д).

Поскольку энергетическая выгодность конформационных изменений, ассоциированных со связыванием Ca^{2+} , обуславливает аффинность белка к этому катиону, можно предположить, что наблюдаемые изменения в структуре NCS-1 в результате его дисульфидной димеризации должны сказаться на общей Ca^{2+} -чувствительности белка. Действительно, по данным ИКТ димер связывает 4 иона кальция, т.е. 2 иона кальция на мономер вместо трех в восстановленном белке (Рис. 61). Таким образом, при окислении NCS-1 теряет способность координировать Ca^{2+} в один из трех EF-hand-мотивов, предположительно, в низкоаффинный сайт EF2. Примечательно, что при этом K_D для одного из оставшихся сайтов снижается примерно на порядок – с 0,29 до 0,036 мкМ (Таблица 9).



Рис. 60. Структурные особенности дисульфидного димера NCS-1. (А) Получение очищенного дисульфидного димера рекомбинантного NCS-1 с помощью гель-фильтрации. (Б) Профили термической денатурации мономера и димера NCS-1 в присутствии ионов магния и кальция. (В) Доля различных элементов вторичной структуры белка у апо- и Ca²⁺-связанных форм мономера и димера NCS-1 по данным спектроскопии кругового дихроизма. *p < 0,05. (Г) Изменение соотношения интенсивностей собственной флуоресценции NCS-1 при 350 нм и 330 нм в ответ на связывание ионов кальция, измеренное методом дифференциальной сканирующей флуориметрии. (Д) Поверхностная гидрофобность мономера и димера NCS-1 в присутствии Mg²⁺- и Ca²⁺, определенная с помощью флуоресцентного зонда бис-AHC.

Таким образом, дисульфидная димеризация NCS-1 не сказываясь на термостабильности, оказывает существенное влияние на его конформационную пластичность, что приводит к снижению стехиометрии и значительному повышению аффинности связывания Ca²⁺ с белком, одновременно делая его Ca²⁺-связанную форму структурно менее отличимой от апо-формы.

1	1		1		1 1		
Препарат	К ¹ , мкМ	$\Delta \mathbf{H}^{1}$, кДж	Кд², мкМ	∆Н², кДж	К _D ³ , мкМ	∆Н³, кДж	
NCS-1	0,23*	-10,1	5,00	1,4	0,29	-17,8	
dNCS-1	0,33**	-4,5	-	-	0,036	-13,9	

Таблица 9. Термодинамические параметры связывания Ca²⁺ с мономером и дисульфидным димером NCS-1 по данным изотермической калориметрии титрования.

*По модели «последовательного связывания» 3 ионов. **По модели «два набора сайтов».



Рис. 61. Связывание Ca²⁺ с дисульфидным димером NCS-1. Титрование 25 мкМ мономера и димера NCS-1 ионами кальция: репрезентативные кривые титрования (вверху) и изотермы связывания (внизу). На нижних графиках сплошными линиями представлены лучшие аппроксимирующие кривые (см. Таблицу 9).

3.3.2.5. Характеристика функциональных свойств дисульфидного димера NCS-1

Очевидно, что изменения в конформационной динамике NCS-1 и его чувствительности к Ca^{2+} в результате дисульфидной димеризации должны сказаться и на Ca^{2+} -зависимой регуляторной активности NCS-1 в фоторецепторной клетке. Действительно, окисление NCS-1 оказывает негативное влияние на мембранную ассоциацию белка: сродство димера к фоторецепторным мембранам снижается по сравнению с мономером, делая связывание практически независимым от Ca^{2+} (Рис. 62А), что хорошо согласуется с полученными структурными данными (см. предыдущий раздел). Однако, вопреки ожиданиям, в случае дисульфидного димера NCS-1 наблюдается драматическое усиление регуляторной активности в отношении родопсинкиназы. Так, по данным ППР, K_D комплекса этой формы NCS-1 с иммобилизованной химерой GRK1^{N-C} в высоком Ca^{2+} составляет 47,5 нМ, что на порядок превышает аффинность мономера (K_D =590 нМ) (Рис. 62Б, Таблица 10). Более того, полученные данные полностью согласуются с результатами функционального теста по ингибированию

фосфорилированию родопсина в реконструированной системе: в присутствии Ca²⁺ димер NCS-1 ингибирует родопсинкиназу в 2-10 раз более эффективно, чем мономер (Рис. 62В).



Рис. 62. Функциональные особенности дисульфидного димера NCS-1. (A) Связывание мономера и дисульфидного димера NCS-1 с фоторецепторными мембранами. *p < 0,05 относительно связывания мономера в присутствии Ca²⁺, # – в отсутствие Ca²⁺. (Б) ППР-сенсограммы взаимодействия различных концентраций Ca²⁺-связанного димера NCS-1 с иммобилизованным химерным белком GRK1^{N-C}. (В) Ингибирование фосфорилирования родопсина под действием родопсинкиназы в реконструированной системе в присутствии Ca²⁺-связанных форм мономера и димера NCS-1. *p < 0,05.

Таблица	ı 10.	Связывание	дисульфидного	димера	NCS-1	С	родопсинкиназой	ПО	данным
спектро	скоп	ии ППР.							

Аналит	kon1, c ⁻¹ M ⁻¹	koff1, c ⁻¹	K _{D1} , M	kon2, c ⁻¹ M ⁻¹	k _{off2} , c ⁻¹	K _{D2} , M
NCS-1	267±22	(1,58±0,63) ×10 ⁻⁴	(5,85±2,03) ×10 ⁻⁷	1910±650	(4,38±1,54) ×10 ⁻³	$(2,65\pm1,78) imes 10^{-6}$
dNCS-1	3580±2230*	(1,14±0,23) ×10 ⁻⁴	(4,75±3,94) ×10 ⁻⁸	1150±350	(2,46±0,27) ×10 ⁻³	(2,24±0,50) ×10 ⁻⁶
dNCS-1	9780±5700**	(2,27±0,63) ×10 ⁻⁴	(3,02±1,80) ×10 ⁻⁸			

*По модели «гетерогенного лиганда».

**По модели «бивалентного аналита».

Таким образом, при повышении редокс-потенциала среды в присутствии избыточной концентрации свободных ионов цинка или одновременно ионов кальция и цинка, т.е. в условиях, характерных для окислительного фотоповреждения сетчатки, может происходить образование и накопление дисульфидного димера NCS-1, который характеризуется редуцированной

конформационной динамикой и несколько сниженным сродством к мембранам, однако демонстрирует драматически усиленную чувствительность к Ca²⁺ и регуляторную активность в отношении родопсинкиназы [398, 423]. Мы предполагаем, что избыточная активность NCS-1, приобретаемая им за счет дисульфидной димеризации на фоне выраженного окислительного стресса фоторецепторов, будет запускать либо механизмы редокс-регуляции, тем самым обеспечивая компенсаторные ответы клетки, либо сигналы к клеточной смерти.

3.3.3. Характеристика редокс-чувствительности NCS-1 в условиях клеточной модели

Полученные нами результаты указывают на то, что *in vitro* дисульфидная димеризация NCS-1 стимулируется в условиях повышенного редокс-потенциала среды в присутствии Zn^{2+} , что оказывает влияние на структуру белка, усиливая его Ca^{2+} -чувствительность и регуляторную активность. Чтобы подтвердить, что выявленные эффекты реализуются в физиологических условиях, мы использовали две клеточные модели, созданные на основе линий, продуцирующих экзогенный или эндогенный NCS-1. С использованием первой модели, представляющей собой линию HEK293 со стабильной трансфекцией NCS-1, была изучена способность NCS-1 образовывать дисульфидные димеры в клетках при окислительном стрессе, определены условия, способствующие окислению белка, а также охарактеризованы механизмы утилизации его окисленных форм. В качестве второй модели были использованы клетки ретинобластомы Y79, близкородственные нейронам сетчатки и эндогенно экспрессирующие ряд фоторецепторных белков, а также NCS-1 [424]. Модель Y79 была внедрена для изучения потенциальной роли окисленных форм NCS-1 в механизмах клеточной гибели при окислительном стрессе.

3.3.3.1. Мониторинг редокс-статуса NCS-1 в клетках в условиях окислительного стресса

Для получения линии, экспрессирующей NCS-1 в количествах, необходимых для проведения обозначенных выше экспериментов, были использованы клетки НЕК293, в которых умеренная эндогенная экспрессия белка была усилена за счет стабильной транфекции генетической конструкцией, содержащей ген NCS-1 (Рис. 63А). С использованием полученной линии было показано, что инкубация клеток в присутствии перекиси водорода приводит к образованию в них дисульфидного димера NCS-1 63Б). (Рис. Так, по данным иммуноблоттинга в невосстанавливающих условиях доля димера в клеточных экстрактах составляет около 4-5% от суммарного NCS-1, причем это соотношение не меняется в результате индукции закачки Ca²⁺ в клетки с использованием иономицина или хелатирования этого металла с использованием ЭГТА. Между тем, инкубация клеток с перекисью водорода в условиях предобработки возрастающими концентрациями Zn^{2+} в присутствии ионофора хлорохина способствует нарастанию доли димера

164

более чем в 2 раза (до 8%) (Рис. 63В). Таким образом, в клеточной системе NCS-1 образует дисульфидные димеры в ответ на индукцию окислительного стресса, т.е. проявляет редоксчувствительность, аналогичную таковой, зафиксированной нами в модели окислительного фотоповреждения сетчатки (см. Рис. 58). Более того, этот процесс стимулируется при повышении концентрации внутриклеточного Zn^{2+} , что полностью согласуется с результатами экспериментов, проведенных в условиях *in vitro* (см. Рис. 59).



Рис. 63. Дисульфидная димеризация внутриклеточного NCS-1 в окисляющих условиях. (A) Иммуноблот экстракта клеток HEK293 до и после трансфекции с использованием антител против NCS-1. (Б) Дисульфидное окисление NCS-1 в HEK293 под действием 10 мМ H₂O₂ в присутствии ионов кальция и цинка (а также соответствующих ионофоров), либо хелатора (ЭГТА). *p < 0,05 относительно димеризации в неокисляющих условиях, # – относительно димеризации в присутствии Ca²⁺. (Б) Эффект возрастающих концентраций Zn²⁺ (в присутствии цинкового ионофора хлорохина) на окисление внутриклеточного NCS-1 при добавлении в среду 10 мМ H₂O₂. *p < 0,05.

3.3.3.2. Механизм утилизации окисленных форм NCS-1 в клетках

Разработанная модель на основе линии НЕК293 была далее использована для определения динамики накопления и утилизации дисульфидных димеров NCS-1 в клетках. Показано, что образование димеров является обратимым процессом: через полчаса после начала инкубации

клеток в присутствии перекиси водорода содержание димера начинает убывать и спустя 5 часов снижается вдвое (Рис. 64А). Для того чтобы определить механизм утилизации окисленных формы NCS-1, мы исследовали два возможных направления этого процесса: восстановление межмолекулярной дисульфидной связи при участии антиоксидантной системы клетки (тиоредоксина) и деградацию окисленных форм белка протеасомой. Оказалось, что инкубация клеток, предобработанных перекисью водорода, В присутствии ингибитора тиоредоксинредуктазы ауранофина, препятствует убыванию димера NCS-1 (Рис. 64Б). В свою очередь, подавление активности протеасом с использованием ингибитора MG132 приводит к трасформации дисульфидных димеров белка в более высокомолекулярные формы, доля которых может достигать 30-40% от суммарного NCS-1 (Рис. 64В).



Рис. 64. Механизмы утилизации окисленных форм NCS-1 в клетках. (А) Зависимость содержания димера NCS-1 в клеточном экстракте от времени инкубации при 10 мМ H₂O₂. (Б) Влияние ингибитора трансферрина (ауранофина) на скорость убывания дисульфидного димера NCS-1. *p < 0,05. (В) Влияние ингибитора протеасомы (MG132) на накопление окисленных форм NCS-1 в клетках. *p < 0,05 относительно исходного содержания димера.

Таким образом, первичным механизмом восполнения нормального содержания NCS-1 является его восстановление при участии тиоредоксиновой системы. При этом накопление димеров NCS-1 и последующее образование потенциально токсичных для клетки агрегатов белка предотвращается путем их деградации протеасомой.

3.3.3.2. Определение внутриклеточной локализации рекомбинантного NCS-1 в норме и в окисляющих условиях

Благодаря относительно высокому уровню экспрессии NCS-1 в разработанной модели на основе линии HEK293, нам удалось определить паттерны внутриклеточной локализации белка, а также охарактеризовать изменения этих паттернов, ассоциированные с окислением. Методом флуоресцентной микроскопии с использованием антител против NCS-1 было показано, что в нормальных условиях белок равномерно распределен в приядерной области клеток HEK293, что, в целом, соответствует его локализации в нейронах (где он помимо этого локализуется в синапсах) и других клетках (Рис. 65) (см. раздел 1.3.4). При этом в присутствии перекиси водорода в некоторых клетках наблюдается выраженное концентрирование NCS-1 в составе точечных структур вблизи ядра.

Природа этих структур остается неясной. Одним из вариантов может быть накопление избытка поврежденного белка в приядерной области в составе аутофагосом или агресом. Окислительный стресс вызывает повреждения множества белков и липидов, приводя к образованию многочисленных аутофагосом [425]. В случае если белок не удается переработать, формируются агресомы – его нерастворимые депозиты, часто фиксируемые в нейронах при таких заболеваниях, как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера и боковой амиотрофический склероз [426]. Подобные депозиты могут образовываться и в сетчатке: например, в модели пигментного ретинита в агресомах накапливается несвернутый мутантный родопсин [427]. Кроме того, наблюдаемые структуры могут представлять собой агрегаты окисленных форм NCS-1, связанных с протеасомами. В пользу этого предположения говорят следующие факты. Вопервых, как мы показали, димеры/агрегаты NCS-1 действительно утилизируются протеасомой (см. Рис. 64). Во-вторых, по нашим предыдущим данным другой НКС – рековерин – при светоиндуцированном окислительном стрессе связывается на поверхности протеасомы, образуя дисульфидные (т.е. ковалентные) комплексы с ее регуляторными субъединицами [314]. Втретьих, перегрузка протеасомы окисленными и склонными к агрегации белками (такими как димеры NCS-1 и рековерина) запускает сигнальные пути, приводящие к апоптозу [428]. Именно такой исход мы наблюдаем как на животной, так и на клеточной моделях (см. далее, а также Рис. 54).

167



Рис. 65. Внутриклеточная локализация NCS-1 в НЕК293. Детекция рекомбинантного NCS-1 в клетках с помощью флуоресцентно меченных антител в нормальных и окисляющих (10 мМ H₂O₂) условиях: репрезентативные микрофотографии. Красный - NCS-1, зеленый – актин, синий – ядра (DAPI). Масштабная линейка: 1 мкм.

3.3.3.3. Определение вклада окисленных форм NCS-1 в механизмы клеточной гибели при окислительном стрессе

Как уже говорилось, перегрузка протеасомной системы структурно дефектным в результате окисления белком может запускать сигнальные механизмы, индуцирующие апоптоз. Для того чтобы оценить возможный вклад окисленных форм NCS-1 в механизмы гибели фоторецепторов в условиях интенсивного окислительного стресса, мы использовали модель на основе клеток ретинобластомы Y79. Выбор Y79 был обоснован тем, что эти клетки имеют общих предшественников с фоторецепторами сетчатки и продуцируют все основные зрительные белки, а также тем, что в них присутствует эндогенная экспрессия NCS-1. На первом этапе мы показали, что в результате инкубации клеток Y79 с перекисью водорода в них, так же как и в HEK293, накапливаются окисленные формы NCS-1, включая дисульфидные димеры и агрегаты (Рис. 66Б). Для определения роли этих форм в механизмах стресс-индуцированной гибели клеток Y79 был использован метод сайленсинга NCS-1 на посттранскрипционном уровне (с помощью специфической PHK-интерференции) (Рис. 66А), после проведения которого с помощью проточной цитофлуориметрии (с использованием маркера апоптоза аннексина V) определялась доля клеток, вступающих в апоптоз вне и на фоне окислительного стресса. Как видно из Рис.

66В, в отсутствие перекиси водорода подавление эндогенной экспрессии NCS-1 не сказывается на склонности Y79 вступать в апоптоз, который наблюдается лишь у незначительной доли клеток (4,8-8%). При этом инкубация в присутствии перекиси водорода приводит к гибели 55,5% клеток в контрольной культуре, однако подавление экспрессии NCS-1 в 2,5 раза по сравнению с контролем снижает их долю до <30%, т.е. делает клетки более устойчивыми к окислительному стрессу.



Рис. 66. Вклад NCS-1 в механизмы гибели клеток ретинобластомы Y79 при окислительном стрессе. (А) Подавление эндогенной экспрессии NCS-1 в клетках Y79 путем PHK-интерференции: трансфекции клеток малыми интерферирующими PHK (siRNA). (Б) Образование окисленных форм NCS-1 в Y79 в присутствии возрастающих концентраций перекиси водорода. (В) Двухмерная визуализация (слева) и соответствующие гистограммы (справа) проточной цитофлуориметрии клеток Y79 в нормальных и окисляющих (10 мМ H₂O₂) условиях на фоне подавления эндогенной экспрессии NCS-1. Доля клеток, вступивших в апоптоз, оценивается по связыванию флуоресцентно меченного маркера апоптоза аннексина V и снижению интенсивности бокового светорассеяния (SSC-A). siRNA-A - трансфекция неспецифической siRNA; siRNA-NCS-1 - трансфекция специфической siRNA против NCS-1.

Суммируя результаты, полученные в этой части работы, можно заключить, что в условиях окислительного стресса фоторецепторных и модельных клеток происходит образование не

только дисульфидных димеров, но и агрегатов NCS-1. Димеризация NCS-1 является обратимым процессом благодаря внутренней антиоксидантной защите клетки: дисульфидные димеры восстанавливаются при участии тиоредоксиновой системы. При более выраженном окислительном стрессе возникает избыток димеров NCS-1 и формирование на их основе агрегатов белка, которые могут быть токсичными для клетки и утилизируются протеасомой. Наконец в случае перегрузки протеасомной системы окисленный NCS-1 накапливается внутри клетки. Указанные NCS-1-зависимые процессы принимают участие в запуске апоптоза клеток, который не инициируется в отсутствие этого белка.

3.4. ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ NCS-1 В НОРМАЛЬНОЙ И ПАТОЛОГИЧЕСКОЙ ФОТОРЕЦЕПТОРНЫХ СИСТЕМАХ

На основании всей совокупности полученных результатов мы можем предложить следующую гипотетическую схему регуляторной активности NCS-1 в фоторецепторной клетке (Рис. 67).



Рис. 67. Предполагаемая функция NCS-1 в фоторецепторной клетке в норме и при окислительном стрессе.

В норме NCS-1 Ca²⁺-зависимым образом ингибирует родопсинкиназу, дополняя эффект рековерина за счет разной мембранной локализации (в том числе, обусловленой повышенным сродством к сигнальным фосфолипидам, таким как PI3P) и более выраженной чувствительности к сигналам Ca²⁺. Окислительный стресс приводит к появлению свободного Zn²⁺ в клетке, что при его низких концентрациях стабилизирует NCS-1 и способствует формированию его дисульфидных димеров, которые характеризуются повышенной Ca²⁺-чувствительностью и усиленной сигнальной активностью в отношении родопсинкиназы [398]. Формирование такой гиперактивной формы белка может быть необходимо для запуска компенсаторного ответа фоторецепторной клетки на стресс, а ее содержание может регулироваться при участии

тиоредоксиновой системы [334]. Однако в ответ на прогрессирование окислительного стресса концентрация Zn^{2+} будет расти, приводя к избыточному накоплению димеров и формированию агрегатов NCS-1, что может способствовать перегрузке протеасомной системы и истощению протеолитического ресурса клетки в целом, тем самым инициируя сигнальные пути, ведущие к апоптозу.

Важно добавить, что гибель фоторецепторов в результате описанных выше процессов может быть связана с дегенеративными заболеваниями сетчатки, такими как ВМД, диабетическая ретинопатия и глаукома, приводящими к слепоте. Например, развитие ВМД ассоциировано с накоплением светоиндуцированных повреждений фоторецепторов в течение жизни человека, обусловленных неполной утилизацией фоторецепторных липидов и белков, несущих следы воздействия окислительного стресса, клетками пигментного эпителия и, как следствие, их отложениями в наиболее светочувствительной области сетчатки (макуле) [429]. Изза своей выраженной склонности к Zn²⁺/редокс-зависимой агрегации, фоторецепторный NCS-1 представляется одним из возможных участников патогенеза этого широко распространенного офтальмологического заболевания.

выводы

- 1. Определены последовательности NCS-1 сетчатки быка и кролика, и показано, что белок экспрессируется в виде единственной изоформы, которая соответствует канонической структуре ортолога человека (Uniprot P62166).
- 2. NCS-1 локализуется в наружных сегментах фоторецепторных нейронов, где возможна его компартментализация с компонентами зрительного каскада.
- NCS-1 способен эффективно связываться с фоторецепторными мембранами вне зависимости от присутствия Ca²⁺, отдавая предпочтение отрицательно заряженным (фосфатидилсерин) и сигнальным (фосфатидилинозитол-3-фосфат) фосфолипидам, что предполагает его участие в фосфоинозитид-зависимой сигнализации.
- 4. GRK1 является наиболее вероятной Ca²⁺-зависимой сигнальной мишенью NCS-1 в фоторецепторной клетке.
- Структурные особенности N- и C-концевого сегментов, а также металлсвязывающих сайтов NCS-1 и рековерина обуславливают различия в мембранной локализации и регуляторной активности этих белков в отношении GRK1.
- NCS-1 является Zn²⁺-связывающим белком, причем координация Zn²⁺ в высокоаффинных сайтах стабилизирует NCS-1 и усиливает его сигнальную активность, а в низкоаффинных сайтах приводит к денатурации и агрегации белка.
- 7. При индукции окислительного стресса клеток сетчатки и модельных клеток, а также при повышении редокс-потенциала среды и концентрации Zn²⁺ in vitro (т.е. в условиях, характерных для окислительного стресса), образуется дисульфидный димер NCS-1, который демонстрирует повышенное сродство к Ca²⁺ и отличается значительно усиленной регуляторной активностью в отношении GRK1.
- 8. В условиях окислительного стресса образуются дисульфидные димеры и агрегаты NCS-1: первые восстанавливаются при участии тиоредоксиновой системы, а вторые утилизируются протеасомой. Накопление этих окисленных форм может запускать апоптоз клеток, который не инициируется в отсутствие NCS-1.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pongs O., Krah-Jentgens I., Engelkamp D., Ferras A. Sequence and Possible Function of a Novel Ca²⁺-Binding Protein Encoded in the Shaker-Locus of *Drosophila* // Novel Calcium-Binding Proteins: Fundamentals and Clinical Implications / Heizmann C. W. – Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1991. – C. 497-503.

2. Persechini A., Moncrief N. D., Kretsinger R. H. The EF-hand family of calcium-modulated proteins // Trends Neurosci. – 1989. – T. 12, № 11. – C. 462-7.

3. Pongs O., Lindemeier J., Zhu X. R., Theil T., Engelkamp D., Krah-Jentgens I., Lambrecht H. G., Koch K. W., Schwemer J., Rivosecchi R., et al. Frequenin--a novel calcium-binding protein that modulates synaptic efficacy in the *Drosophila* nervous system // Neuron. – 1993. – T. 11, No 1. – C. 15-28.

4. Kawamura S. Photoreceptor light-adaptation mediated by S-modulin, a member of a possible regulatory protein family of protein phosphorylation in signal transduction // Neurosci Res. -1994. - T. 20, No 4. -C. 293-8.

5. De Castro E., Nef S., Fiumelli H., Lenz S. E., Kawamura S., Nef P. Regulation of rhodopsin phosphorylation by a family of neuronal calcium sensors // Biochem Biophys Res Commun. – 1995. – T. 216, N_{2} 1. – C. 133-40.

6. Olafsson P., Soares H. D., Herzog K. H., Wang T., Morgan J. I., Lu B. The Ca^{2+} binding protein, frequenin is a nervous system-specific protein in mouse preferentially localized in neurites // Brain Res Mol Brain Res. – 1997. – T. 44, No 1. – C. 73-82.

7. Chen C., Yu L., Zhang P., Jiang J., Zhang Y., Chen X., Wu Q., Wu Q., Zhao S. Human neuronal calcium sensor-1 shows the highest expression level in cerebral cortex // Neurosci Lett. -2002. - T.319, No 2. -C.67-70.

8. Blasiole B., Kabbani N., Boehmler W., Thisse B., Thisse C., Canfield V., Levenson R. Neuronal calcium sensor-1 gene ncs-1a is essential for semicircular canal formation in zebrafish inner ear // J Neurobiol. -2005. - T. 64, No 3. - C. 285-97.

9. Msghina M., Govind C. K., Atwood H. L. Synaptic structure and transmitter release in crustacean phasic and tonic motor neurons // J Neurosci. – 1998. – T. 18, № 4. – C. 1374-82.

10. Dyer J. R., Sossin W. S., Klein M. Cloning and characterization of aplycalcin and *Aplysia* neurocalcin, two new members of the calmodulin superfamily of small calcium-binding proteins // J Neurochem. – 1996. – T. 67, N $_{2}$ 3. – C. 932-42.

11. Nef S., Fiumelli H., de Castro E., Raes M. B., Nef P. Identification of neuronal calcium sensor (NCS-1) possibly involved in the regulation of receptor phosphorylation // J Recept Signal Transduct Res. - 1995. - T. 15, No 1-4. - C. 365-78.

12. Olafsson P., Wang T., Lu B. Molecular cloning and functional characterization of the *Xenopus* Ca(2+)-binding protein frequenin // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1995. – T. 92, № 17. – C. 8001-5.

13. Hendricks K. B., Wang B. Q., Schnieders E. A., Thorner J. Yeast homologue of neuronal frequenin is a regulator of phosphatidylinositol-4-OH kinase // Nat Cell Biol. – 1999. – T. 1, № 4. – C. 234-41.

14. Hamasaki-Katagiri N., Molchanova T., Takeda K., Ames J. B. Fission yeast homolog of neuronal calcium sensor-1 (Ncs1p) regulates sporulation and confers calcium tolerance // J Biol Chem. – 2004. – T. 279, № 13. – C. 12744-54.

15. Sanchez-Barrena M. J., Martinez-Ripoll M., Zhu J. K., Albert A. SOS3 (salt overly sensitive 3) from Arabidopsis thaliana: expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis // Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. – 2004. – T. 60, № Pt 7. – C. 1272-4.

16. Nagae M., Nozawa A., Koizumi N., Sano H., Hashimoto H., Sato M., Shimizu T. The crystal structure of the novel calcium-binding protein AtCBL2 from *Arabidopsis thaliana* // J Biol Chem. – 2003. – T. 278, № 43. – C. 42240-6.

17. Strahl T., Grafelmann B., Dannenberg J., Thorner J., Pongs O. Conservation of regulatory function in calcium-binding proteins: human frequenin (neuronal calcium sensor-1) associates productively with yeast phosphatidylinositol 4-kinase isoform, Pik1 // J Biol Chem. – 2003. – T. 278, № 49. – C. 49589-99.

18. Obara M., Szeliga M., Albrecht J. Regulation of pH in the mammalian central nervous system under normal and pathological conditions: facts and hypotheses // Neurochem Int. -2008. - T. 52, No 6. -C. 905-19.

19. Gong Y., Zhu Y., Zou Y., Ma B., Nussinov R., Zhang Q. Human Neuronal Calcium Sensor-1 Protein Avoids Histidine Residues To Decrease pH Sensitivity // J Phys Chem B. – 2017. – T. 121, № 3. – C. 508-517.

20. Bourne Y., Dannenberg J., Pollmann V., Marchot P., Pongs O. Immunocytochemical localization and crystal structure of human frequenin (neuronal calcium sensor 1) // J Biol Chem. – 2001. – T. 276, $N_{\rm P}$ 15. – C. 11949-55.

21. Sanchez-Gracia A., Romero-Pozuelo J., Ferrus A. Two frequenins in *Drosophila*: unveiling the evolutionary history of an unusual neuronal calcium sensor (NCS) duplication // BMC Evol Biol. -2010. -T. 10. -C. 54.

22. Gohain D., Tamuli R. Calcineurin responsive zinc-finger-1 binds to a unique promoter sequence to upregulate neuronal calcium sensor-1, whose interaction with MID-1 increases tolerance to calcium stress in *Neurospora crassa* // Mol Microbiol. – 2019. – T. 111, № 6. – C. 1510-1528.

23. Wightman B., Ebert B., Carmean N., Weber K., Clever S. The *C. elegans* nuclear receptor gene fax-1 and homeobox gene unc-42 coordinate interneuron identity by regulating the expression of glutamate receptor subunits and other neuron-specific genes // Dev Biol. -2005. - T. 287, No 1. -C. 74-85.

24. Magno L. A. V., Tenza-Ferrer H., Collodetti M., Nicolau E. S., Khlghatyan J., Del'Guidice T., Romano-Silva M. A., Beaulieu J. M. Contribution of neuronal calcium sensor 1 (Ncs-1) to anxiolytic-like and social behavior mediated by valproate and Gsk3 inhibition // Sci Rep. – 2020. – T. 10, $N_{\rm D}$ 1. – C. 4566.

25. Grosshans H. K., Fischer T. T., Steinle J. A., Brill A. L., Ehrlich B. E. Neuronal Calcium Sensor 1 is up-regulated in response to stress to promote cell survival and motility in cancer cells // Mol Oncol. – 2020. - T. 14, No 6. - C. 1134-1151.

26. Uchida A., Seki N., Mizuno K., Misono S., Yamada Y., Kikkawa N., Sanada H., Kumamoto T., Suetsugu T., Inoue H. Involvement of dual-strand of the miR-144 duplex and their targets in the pathogenesis of lung squamous cell carcinoma // Cancer Sci. -2019. - T. 110, No 1. -C. 420-432.

27. Zhou H., Yang C., Bai F., Ma Z., Wang J., Wang F., Li F., Wang Q., Xiong L. Electroacupuncture Alleviates Brain Damage Through Targeting of Neuronal Calcium Sensor 1 by miR-191a-5p After Ischemic Stroke // Rejuvenation Res. – 2017. – T. 20, № 6. – C. 492-505.

28. Romero-Pozuelo J., Dason J. S., Atwood H. L., Ferrus A. Chronic and acute alterations in the functional levels of Frequenins 1 and 2 reveal their roles in synaptic transmission and axon terminal morphology // Eur J Neurosci. -2007. - T. 26, No 9. - C. 2428-43.

29. Dason J. S., Romero-Pozuelo J., Marin L., Iyengar B. G., Klose M. K., Ferrus A., Atwood H. L. Frequenin/NCS-1 and the Ca²⁺-channel alpha1-subunit co-regulate synaptic transmission and nerve-terminal growth // J Cell Sci. – 2009. – T. 122, № Pt 22. – C. 4109-21.

30. Gerhard D. S., Wagner L., Feingold E. A., Shenmen C. M., Grouse L. H., Schuler G., Klein S. L., Old S., Rasooly R., Good P., Guyer M., Peck A. M., Derge J. G., Lipman D., Collins F. S., Jang W., Sherry S., Feolo M., Misquitta L., Lee E., Rotmistrovsky K., Greenhut S. F., Schaefer C. F., Buetow K., Bonner T. I., Haussler D., Kent J., Kiekhaus M., Furey T., Brent M., Prange C., Schreiber K., Shapiro N., Bhat N. K., Hopkins R. F., Hsie F., Driscoll T., Soares M. B., Casavant T. L., Scheetz T. E., Brownstein M. J., Usdin T. B., Toshiyuki S., Carninci P., Piao Y., Dudekula D. B., Ko M. S., Kawakami K., Suzuki Y., Sugano S., Gruber C. E., Smith M. R., Simmons B., Moore T., Waterman R., Johnson S. L., Ruan Y., Wei C. L., Mathavan S., Gunaratne P. H., Wu J., Garcia A. M., Hulyk S. W., Fuh E., Yuan Y., Sneed A., Kowis C., Hodgson A., Muzny D. M., McPherson J., Gibbs R. A., Fahey J., Helton E., Ketteman M., Madan A., Rodrigues S., Sanchez A., Whiting M., Madari A., Young A. C., Wetherby K. D., Granite S. J., Kwong P. N., Brinkley C. P., Pearson R. L., Bouffard G. G., Blakesly R. W., Green E. D., Dickson M. C., Rodriguez A. C., Grimwood J., Schmutz J., Myers R. M., Butterfield Y. S., Griffith M., Griffith O. L., Krzywinski M. I., Liao N., Morin R., Palmquist D., Petrescu A. S., Skalska U., Smailus D. E., Stott J. M., Schnerch A., Schein J. E., Jones S. J., Holt R. A., Baross A., Marra M. A., Clifton S., Makowski K. A., Bosak S., Malek J., Team M. G. C. P. The status, quality, and expansion of

the NIH full-length cDNA project: the Mammalian Gene Collection (MGC) // Genome Res. – 2004. – T. 14, № 10B. – C. 2121-7.

31. Wang B., Boeckel G. R., Huynh L., Nguyen L., Cao W., De La Cruz E. M., Kaftan E. J., Ehrlich B. E. Neuronal Calcium Sensor 1 Has Two Variants with Distinct Calcium Binding Characteristics // PLoS One. – 2016. – T. 11, № 8. – C. e0161414.

32. Romero-Pozuelo J., Dason J. S., Mansilla A., Banos-Mateos S., Sardina J. L., Chaves-Sanjuan A., Jurado-Gomez J., Santana E., Atwood H. L., Hernandez-Hernandez A., Sanchez-Barrena M. J., Ferrus A. The guanine-exchange factor Ric8a binds to the Ca(2)(+) sensor NCS-1 to regulate synapse number and neurotransmitter release // J Cell Sci. – 2014. – T. 127, № Pt 19. – C. 4246-59.

33. Pandalaneni S., Karuppiah V., Saleem M., Haynes L. P., Burgoyne R. D., Mayans O., Derrick J. P., Lian L. Y. Neuronal Calcium Sensor-1 Binds the D2 Dopamine Receptor and G-protein-coupled Receptor Kinase 1 (GRK1) Peptides Using Different Modes of Interactions // J Biol Chem. – 2015. – T. 290, № 30. – C. 18744-56.

34. Heidarsson P. O., Bjerrum-Bohr I. J., Jensen G. A., Pongs O., Finn B. E., Poulsen F. M., Kragelund B. B. The C-terminal tail of human neuronal calcium sensor 1 regulates the conformational stability of the Ca(2)(+)(-) activated state // J Mol Biol. – 2012. – T. 417, No 1-2. – C. 51-64.

35. Fik-Rymarkiewicz E., Duda T., Sharma R. K. Novel frequenin-modulated Ca²⁺-signaling membrane guanylate cyclase (ROS-GC) transduction pathway in bovine hippocampus // Mol Cell Biochem. – 2006. – T. 291, № 1-2. – C. 187-204.

36. Hong H., Lin J. S., Chen L. Regulatory factors governing adenosine-to-inosine (A-to-I) RNA editing // Biosci Rep. – 2015. – T. 35, № 2.

37. Gierke P., Zhao C., Brackmann M., Linke B., Heinemann U., Braunewell K. H. Expression analysis of members of the neuronal calcium sensor protein family: combining bioinformatics and Western blot analysis // Biochem Biophys Res Commun. – 2004. – T. 323, № 1. – C. 38-43.

38. Schaad N. C., De Castro E., Nef S., Hegi S., Hinrichsen R., Martone M. E., Ellisman M. H., Sikkink R., Rusnak F., Sygush J., Nef P. Direct modulation of calmodulin targets by the neuronal calcium sensor NCS-1 // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1996. – T. 93, № 17. – C. 9253-8.

39. Pitt J. C., Lindemeier J., Habbes H. W., Veh R. W. Haptenylation of antibodies during affinity purification: a novel and convenient procedure to obtain labeled antibodies for quantification and double labeling // Histochem Cell Biol. – 1998. – T. 110, N_{2} 3. – C. 311-22.

40. Martone M. E., Edelmann V. M., Ellisman M. H., Nef P. Cellular and subcellular distribution of the calcium-binding protein NCS-1 in the central nervous system of the rat // Cell Tissue Res. – 1999. – T. 295, N_{2} 3. – C. 395-407.

41. Paterlini M., Revilla V., Grant A. L., Wisden W. Expression of the neuronal calcium sensor protein family in the rat brain // Neuroscience. – 2000. – T. 99, № 2. – C. 205-16.

42. Sage C., Venteo S., Jeromin A., Roder J., Dechesne C. J. Distribution of frequenin in the mouse inner ear during development, comparison with other calcium-binding proteins and synaptophysin // Hear Res. -2000. - T. 150, No 1-2. - C. 70-82.

43. Treloar H. B., Uboha U., Jeromin A., Greer C. A. Expression of the neuronal calcium sensor protein NCS-1 in the developing mouse olfactory pathway // J Comp Neurol. – 2005. – T. 482, № 2. – C. 201-16.

44. Kawasaki T., Nishio T., Kurosawa H., Roder J., Jeromin A. Spatiotemporal distribution of neuronal calcium sensor-1 in the developing rat spinal cord // J Comp Neurol. – 2003. – T. 460, № 4. – C. 465-75.

45. Garcia N., Lanuza M. A., Besalduch N., Santafe M. M., Jeromin A., Tomas J. Localization of neuronal calcium sensor-1 at the adult and developing rat neuromuscular junction // J Neurosci Res. -2005. - T. 82, No 1. - C. 1-9.

46. Werle M. J., Roder J., Jeromin A. Expression of frequenin at the frog (Rana) neuromuscular junction, muscle spindle and nerve // Neurosci Lett. – 2000. – T. 284, № 1-2. – C. 33-6.

47. Lourenssen S., Jeromin A., Roder J., Blennerhassett M. G. Intestinal inflammation modulates expression of the synaptic vesicle protein neuronal calcium sensor-1 // Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. -2002. - T. 282, No 6. - C. G1097-104.

48. Averill S., Robson L. G., Jeromin A., Priestley J. V. Neuronal calcium sensor-1 is expressed by dorsal root ganglion cells, is axonally transported to central and peripheral terminals, and is concentrated at nodes // Neuroscience. -2004. - T. 123, No 2. - C. 419-27.

49. Duan X. Q., Li Y. H., Zhang X. Y., Zhao Z. T., Wang Y., Wang H., Li G. S., Jing L. Mechanisms of Intracellular Calcium Homeostasis in MC3T3-E1 Cells and Bone Tissues of Sprague-Dawley Rats Exposed to Fluoride // Biol Trace Elem Res. – 2016. – T. 170, № 2. – C. 331-9.

50. Ohya S., Horowitz B. Differential transcriptional expression of Ca^{2+} BP superfamilies in murine gastrointestinal smooth muscles // Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. – 2002. – T. 283, No 6. – C. G1290-7.

51. Guo W., Malin S. A., Johns D. C., Jeromin A., Nerbonne J. M. Modulation of Kv4-encoded K(+) currents in the mammalian myocardium by neuronal calcium sensor-1 // J Biol Chem. – 2002. – T. 277, № 29. – C. 26436-43.

52. Nakamura T. Y., Sturm E., Pountney D. J., Orenzoff B., Artman M., Coetzee W. A. Developmental expression of NCS-1 (frequenin), a regulator of Kv4 K⁺ channels, in mouse heart // Pediatr Res. -2003. -T. 53, No 4. -C. 554-7.

53. Weisz O. A., Gibson G. A., Leung S. M., Roder J., Jeromin A. Overexpression of frequenin, a modulator of phosphatidylinositol 4-kinase, inhibits biosynthetic delivery of an apical protein in polarized madin-darby canine kidney cells // J Biol Chem. – 2000. – T. 275, № 32. – C. 24341-7.

54. McFerran B. W., Graham M. E., Burgoyne R. D. Neuronal Ca^{2+} sensor 1, the mammalian homologue of frequenin, is expressed in chromaffin and PC12 cells and regulates neurosecretion from dense-core granules // J Biol Chem. – 1998. – T. 273, No 35. – C. 22768-72.

55. Koizumi S., Rosa P., Willars G. B., Challiss R. A., Taverna E., Francolini M., Bootman M. D., Lipp P., Inoue K., Roder J., Jeromin A. Mechanisms underlying the neuronal calcium sensor-1-evoked enhancement of exocytosis in PC12 cells // J Biol Chem. – 2002. – T. 277, № 33. – C. 30315-24.

56. Scalettar B. A., Rosa P., Taverna E., Francolini M., Tsuboi T., Terakawa S., Koizumi S., Roder J., Jeromin A. Neuronal calcium sensor-1 binds to regulated secretory organelles and functions in basal and stimulated exocytosis in PC12 cells // J Cell Sci. – 2002. – T. 115, № Pt 11. – C. 2399-412.

57. Zhao X., Varnai P., Tuymetova G., Balla A., Toth Z. E., Oker-Blom C., Roder J., Jeromin A., Balla T. Interaction of neuronal calcium sensor-1 (NCS-1) with phosphatidylinositol 4-kinase beta stimulates lipid kinase activity and affects membrane trafficking in COS-7 cells // J Biol Chem. – 2001. – T. 276, N_{2} 43. – C. 40183-9.

58. Chen X. L., Zhong Z. G., Yokoyama S., Bark C., Meister B., Berggren P. O., Roder J., Higashida H., Jeromin A. Overexpression of rat neuronal calcium sensor-1 in rodent NG108-15 cells enhances synapse formation and transmission // J Physiol. – 2001. – T. 532, № Pt 3. – C. 649-59.

59. Guild S. B., Murray A. T., Wilson M. L., Wiegand U. K., Apps D. K., Jin Y., Rindler M., Roder J., Jeromin A. Over-expression of NCS-1 in AtT-20 cells affects ACTH secretion and storage // Mol Cell Endocrinol. – 2001. – T. 184, № 1-2. – C. 51-63.

60. Kapp-Barnea Y., Melnikov S., Shefler I., Jeromin A., Sagi-Eisenberg R. Neuronal calcium sensor-1 and phosphatidylinositol 4-kinase beta regulate IgE receptor-triggered exocytosis in cultured mast cells // J Immunol. – 2003. – T. 171, № 10. – C. 5320-7.

61. Brochetta C., Perrotta M. G., Jeromin A., Romano M., Vita F., Soranzo M. R., Borelli V., Roder J., Zabucchi G. Identification and subcellular localization of neuronal calcium sensor-1 (NCS-1) in human neutrophils and HL-60 cells // Inflammation. – 2003. – T. 27, № 6. – C. 361-72.

62. Oshikawa M., Tsutsui C., Ikegami T., Fuchida Y., Matsubara M., Toyama S., Usami R., Ohtoko K., Kato S. Full-length transcriptome analysis of human retina-derived cell lines ARPE-19 and Y79 using the vector-capping method // Invest Ophthalmol Vis Sci. -2011. - T. 52, No 9. - C. 6662-70.

63. Taverna E., Francolini M., Jeromin A., Hilfiker S., Roder J., Rosa P. Neuronal calcium sensor 1 and phosphatidylinositol 4-OH kinase beta interact in neuronal cells and are translocated to membranes during nucleotide-evoked exocytosis // J Cell Sci. – 2002. – T. 115, № Pt 20. – C. 3909-22.

64. Nakao S., Wakabayashi S., Nakamura T. Y. Stimulus-dependent regulation of nuclear Ca2+ signaling in cardiomyocytes: a role of neuronal calcium sensor-1 // PLoS One. -2015. - T. 10, No 4. - C. e0125050.

65. Deka R., Kumar R., Tamuli R. *Neurospora crassa* homologue of Neuronal Calcium Sensor-1 has a role in growth, calcium stress tolerance, and ultraviolet survival // Genetica. – 2011. – T. 139, № 7. – C. 885-94.

66. Hamasaki-Katagiri N., Ames J. B. Neuronal calcium sensor-1 (Ncs1p) is up-regulated by calcineurin to promote Ca²⁺ tolerance in fission yeast // J Biol Chem. -2010. - T. 285, No 7. -C. 4405-14.

67. Saitoh K., Arie T., Teraoka T., Yamaguchi I., Kamakura T. Targeted gene disruption of the neuronal calcium sensor 1 homologue in rice blast fungus, *Magnaporthe grisea* // Biosci Biotechnol Biochem. – 2003. – T. 67, № 3. – C. 651-3.

68. Fan Y., Ortiz-Urquiza A., Kudia R. A., Keyhani N. O. A fungal homologue of neuronal calcium sensor-1, Bbcsa1, regulates extracellular acidification and contributes to virulence in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* // Microbiology (Reading). – 2012. – T. 158, № Pt 7. – C. 1843-1851.

69. Gomez M., De Castro E., Guarin E., Sasakura H., Kuhara A., Mori I., Bartfai T., Bargmann C. I., Nef P. Ca^{2+} signaling via the neuronal calcium sensor-1 regulates associative learning and memory in *C. elegans* // Neuron. – 2001. – T. 30, No 1. – C. 241-8.

70. Ratai O., Hermainski J., Ravichandran K., Pongs O. NCS-1 Deficiency Is Associated With Obesity and Diabetes Type 2 in Mice // Front Mol Neurosci. – 2019. – T. 12. – C. 78.

71. Nakamura T. Y., Jeromin A., Mikoshiba K., Wakabayashi S. Neuronal calcium sensor-1 promotes immature heart function and hypertrophy by enhancing Ca^{2+} signals // Circ Res. – 2011. – T. 109, No 5. – C. 512-23.

72. Ng E., Varaschin R. K., Su P., Browne C. J., Hermainski J., Le Foll B., Pongs O., Liu F., Trudeau L. E., Roder J. C., Wong A. H. Neuronal calcium sensor-1 deletion in the mouse decreases motivation and dopamine release in the nucleus accumbens // Behav Brain Res. – 2016. – T. 301. – C. 213-25.

73. Mun H. S., Saab B. J., Ng E., McGirr A., Lipina T. V., Gondo Y., Georgiou J., Roder J. C. Selfdirected exploration provides a Ncs1-dependent learning bonus // Sci Rep. – 2015. – T. 5. – C. 17697.

74. de Rezende V. B., Rosa D. V., Comim C. M., Magno L. A., Rodrigues A. L., Vidigal P., Jeromin A., Quevedo J., Romano-Silva M. A. NCS-1 deficiency causes anxiety and depressive-like behavior with impaired non-aversive memory in mice // Physiol Behav. – 2014. – T. 130. – C. 91-8.

75. Tsujimoto T., Jeromin A., Saitoh N., Roder J. C., Takahashi T. Neuronal calcium sensor 1 and activity-dependent facilitation of P/Q-type calcium currents at presynaptic nerve terminals // Science. – 2002. – T. 295, № 5563. – C. 2276-9.

76. Wang C. Y., Yang F., He X., Chow A., Du J., Russell J. T., Lu B. Ca(2+) binding protein frequenin mediates GDNF-induced potentiation of Ca(2+) channels and transmitter release // Neuron. -2001. - T. 32, No 1. - C. 99-112.

77. Jinno S., Jeromin A., Roder J., Kosaka T. Compartmentation of the mouse cerebellar cortex by neuronal calcium sensor-1 // J Comp Neurol. – 2003. – T. 458, № 4. – C. 412-24.

78. Jinno S., Jeromin A., Roder J., Kosaka T. Immunocytochemical localization of neuronal calcium sensor-1 in the hippocampus and cerebellum of the mouse, with special reference to presynaptic terminals // Neuroscience. -2002. - T. 113, No 2. - C. 449-61.

79. Bergmann M., Grabs D., Roder J., Rager G., Jeromin A. Differential expression of neuronal calcium sensor-1 in the developing chick retina // J Comp Neurol. – 2002. – T. 449, № 3. – C. 231-40.

80. Citri A., Malenka R. C. Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms // Neuropsychopharmacology. – 2008. – T. 33, № 1. – C. 18-41.

81. Goncalves J. T., Schafer S. T., Gage F. H. Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior // Cell. – 2016. – T. 167, № 4. – C. 897-914.

82. Genin A., Davis S., Meziane H., Doyere V., Jeromin A., Roder J., Mallet J., Laroche S. Regulated expression of the neuronal calcium sensor-1 gene during long-term potentiation in the dentate gyrus in vivo // Neuroscience. -2001. - T. 106, No 3. - C. 571-7.

83. Saab B. J., Georgiou J., Nath A., Lee F. J., Wang M., Michalon A., Liu F., Mansuy I. M., Roder J. C. NCS-1 in the dentate gyrus promotes exploration, synaptic plasticity, and rapid acquisition of spatial memory // Neuron. – 2009. – T. 63, № 5. – C. 643-56.

84. Kesner R. P., Lee I., Gilbert P. A behavioral assessment of hippocampal function based on a subregional analysis // Rev Neurosci. – 2004. – T. 15, № 5. – C. 333-51.

85. Sippy T., Cruz-Martin A., Jeromin A., Schweizer F. E. Acute changes in short-term plasticity at synapses with elevated levels of neuronal calcium sensor-1 // Nat Neurosci. -2003. - T. 6, $N_{2} 10. - C.$ 1031-8.

86. Zucker R. S. NCS-1 stirs somnolent synapses // Nat Neurosci. – 2003. – T. 6, № 10. – C. 1006-8.

87. Brackmann M., Zhao C., Kuhl D., Manahan-Vaughan D., Braunewell K. H. MGluRs regulate the expression of neuronal calcium sensor proteins NCS-1 and VILIP-1 and the immediate early gene arg3.1/arc in the hippocampus in vivo // Biochem Biophys Res Commun. – 2004. – T. 322, No 3. – C. 1073-9.

88. Jo J., Heon S., Kim M. J., Son G. H., Park Y., Henley J. M., Weiss J. L., Sheng M., Collingridge G. L., Cho K. Metabotropic glutamate receptor-mediated LTD involves two interacting Ca(2+) sensors, NCS-1 and PICK1 // Neuron. – 2008. – T. 60, № 6. – C. 1095-111.

89. Hanley J. G., Henley J. M. PICK1 is a calcium-sensor for NMDA-induced AMPA receptor trafficking // EMBO J. – 2005. – T. 24, № 18. – C. 3266-78.

90. Hansel C., Linden D. J., D'Angelo E. Beyond parallel fiber LTD: the diversity of synaptic and non-synaptic plasticity in the cerebellum // Nat Neurosci. -2001. - T. 4, No 5. - C. 467-75.

91. Miller K. G., Emerson M. D., McManus J. R., Rand J. B. RIC-8 (Synembryn): a novel conserved protein that is required for G(q)alpha signaling in the *C. elegans* nervous system // Neuron. – 2000. – T. 27, No 2. – C. 289-99.

92. Miller K. G., Emerson M. D., Rand J. B. Goalpha and diacylglycerol kinase negatively regulate the Gqalpha pathway in *C. elegans* // Neuron. – 1999. – T. 24, № 2. – C. 323-33.

93. Reynolds A. J., Bartlett S. E., Morgans C. The distribution of neuronal calcium sensor-1 protein in the developing and adult rat retina // Neuroreport. – 2001. – T. 12, № 4. – C. 725-8.

94. Angaut-Petit D., Ferrus A., Faille L. Plasticity of motor nerve terminals in *Drosophila* T (X,Y)V7 mutant: effect of deregulation of the novel calcium-binding protein frequenin // Neurosci Lett. – 1993. – T. 153, № 2. – C. 227-31.

95. Angaut-Petit D., Toth P., Rogero O., Faille L., Tejedor F. J., Ferrus A. Enhanced neurotransmitter release is associated with reduction of neuronal branching in a *Drosophila* mutant overexpressing frequenin // Eur J Neurosci. – 1998. – T. 10, № 2. – C. 423-34.

96. Hui K., Feng Z. P. NCS-1 differentially regulates growth cone and somata calcium channels in *Lymnaea* neurons // Eur J Neurosci. – 2008. – T. 27, № 3. – C. 631-43.

97. Hui K., Fei G. H., Saab B. J., Su J., Roder J. C., Feng Z. P. Neuronal calcium sensor-1 modulation of optimal calcium level for neurite outgrowth // Development. – 2007. – T. 134, № 24. – C. 4479-89.

98. Hui H., McHugh D., Hannan M., Zeng F., Xu S. Z., Khan S. U., Levenson R., Beech D. J., Weiss J. L. Calcium-sensing mechanism in TRPC5 channels contributing to retardation of neurite outgrowth // J Physiol. – 2006. – T. 572, № Pt 1. – C. 165-72.

99. Martin V. M., Johnson J. R., Haynes L. P., Barclay J. W., Burgoyne R. D. Identification of key structural elements for neuronal calcium sensor-1 function in the regulation of the temperature-dependency of locomotion in *C. elegans* // Mol Brain. -2013. - T. 6. - C. 39.

100. Ye H. Y., Ye B. P., Wang D. Y. Evaluation of the long-term memory for thermosensation regulated by neuronal calcium sensor-1 in *Caenorhabditis elegans* // Neurosci Bull. – 2008. – T. 24, № 1. – C. 1-6.

101. Drumond L. E., Mourao F. A., Leite H. R., Abreu R. V., Reis H. J., Moraes M. F., Pereira G. S., Massensini A. R. Differential effects of swimming training on neuronal calcium sensor-1 expression in rat hippocampus/cortex and in object recognition memory tasks // Brain Res Bull. – 2012. – T. 88, No 4. – C. 385-91.

102. Nakamura T. Y., Nakao S., Nakajo Y., Takahashi J. C., Wakabayashi S., Yanamoto H. Possible Signaling Pathways Mediating Neuronal Calcium Sensor-1-Dependent Spatial Learning and Memory in Mice // PLoS One. – 2017. – T. 12, № 1. – C. e0170829.

103. Bergson C., Levenson R., Goldman-Rakic P. S., Lidow M. S. Dopamine receptor-interacting proteins: the Ca(2+) connection in dopamine signaling // Trends Pharmacol Sci. – 2003. – T. 24, No 9. – C. 486-92.

104. Kabbani N., Negyessy L., Lin R., Goldman-Rakic P., Levenson R. Interaction with neuronal calcium sensor NCS-1 mediates desensitization of the D2 dopamine receptor // J Neurosci. – 2002. – T. 22, N_{2} 19. – C. 8476-86.

105. Evron T., Daigle T. L., Caron M. G. GRK2: multiple roles beyond G protein-coupled receptor desensitization // Trends Pharmacol Sci. – 2012. – T. 33, № 3. – C. 154-64.

106. Ferre S., Casado V., Devi L. A., Filizola M., Jockers R., Lohse M. J., Milligan G., Pin J. P., Guitart X. G protein-coupled receptor oligomerization revisited: functional and pharmacological perspectives // Pharmacol Rev. – 2014. – T. 66, № 2. – C. 413-34.

107. Navarro G., Aguinaga D., Moreno E., Hradsky J., Reddy P. P., Cortes A., Mallol J., Casado V., Mikhaylova M., Kreutz M. R., Lluis C., Canela E. I., McCormick P. J., Ferre S. Intracellular calcium levels determine differential modulation of allosteric interactions within G protein-coupled receptor heteromers // Chem Biol. – 2014. – T. 21, N_{0} 11. – C. 1546-56.

108. Negyessy L., Goldman-Rakic P. S. Subcellular localization of the dopamine D2 receptor and coexistence with the calcium-binding protein neuronal calcium sensor-1 in the primate prefrontal cortex // J Comp Neurol. -2005. - T. 488, Nº 4. - C. 464-75.

109. Welton R. M., Hoffman C. S. Glucose monitoring in fission yeast via the Gpa2 galpha, the git5 Gbeta and the git3 putative glucose receptor // Genetics. – 2000. – T. 156, № 2. – C. 513-21.

110. Guimaraes M. M., Reis H. J., Guimaraes L. P., Carneiro D. S., Ribeiro F. M., Gomez M. V., Jeromin A., Romano-Silva M. A. Modulation of muscarinic signaling in PC12 cells overexpressing neuronal Ca²⁺ sensor-1 protein // Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). – 2009. – T. 55 Suppl. – C. OL1138-50.

111. Angelats E., Requesens M., Aguinaga D., Kreutz M. R., Franco R., Navarro G. Neuronal Calcium and cAMP Cross-Talk Mediated by Cannabinoid CB1 Receptor and EF-Hand Calcium Sensor Interactions // Front Cell Dev Biol. – 2018. – T. 6. – C. 67.

112. Navarro G., Hradsky J., Lluis C., Casado V., McCormick P. J., Kreutz M. R., Mikhaylova M. NCS-1 associates with adenosine A(2A) receptors and modulates receptor function // Front Mol Neurosci. – 2012. – T. 5. – C. 53.

113. Gurevich E. V., Tesmer J. J., Mushegian A., Gurevich V. V. G protein-coupled receptor kinases: more than just kinases and not only for GPCRs // Pharmacol Ther. -2012. -T. 133, No 1. -C. 40-69.

114. Rajebhosale M., Greenwood S., Vidugiriene J., Jeromin A., Hilfiker S. Phosphatidylinositol 4-OH kinase is a downstream target of neuronal calcium sensor-1 in enhancing exocytosis in neuroendocrine cells // J Biol Chem. – 2003. – T. 278, № 8. – C. 6075-84.

115. Pitcher J. A., Fredericks Z. L., Stone W. C., Premont R. T., Stoffel R. H., Koch W. J., Lefkowitz R. J. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2)-enhanced G protein-coupled receptor kinase (GRK) activity. Location, structure, and regulation of the PIP2 binding site distinguishes the GRK subfamilies // J Biol Chem. – 1996. – T. 271, N_{0} 40. – C. 24907-13.

116. Pan C. Y., Jeromin A., Lundstrom K., Yoo S. H., Roder J., Fox A. P. Alterations in exocytosis induced by neuronal Ca^{2+} sensor-1 in bovine chromaffin cells // J Neurosci. – 2002. – T. 22, No 7. – C. 2427-33.

117. McFerran B. W., Weiss J. L., Burgoyne R. D. Neuronal Ca(2+) sensor 1. Characterization of the myristoylated protein, its cellular effects in permeabilized adrenal chromaffin cells, Ca(2+)-independent membrane association, and interaction with binding proteins, suggesting a role in rapid Ca(2+) signal transduction // J Biol Chem. – 1999. – T. 274, N_{0} 42. – C. 30258-65.

118. Walch-Solimena C., Novick P. The yeast phosphatidylinositol-4-OH kinase pik1 regulates secretion at the Golgi // Nat Cell Biol. – 1999. – T. 1, № 8. – C. 523-5.

119. Hama H., Schnieders E. A., Thorner J., Takemoto J. Y., DeWald D. B. Direct involvement of phosphatidylinositol 4-phosphate in secretion in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // J Biol Chem. – 1999. – T. 274, № 48. – C. 34294-300.

120. Czech M. P. PIP2 and PIP3: complex roles at the cell surface // Cell. – 2000. – T. 100, No 6. – C. 603-6.

121. Godi A., Pertile P., Meyers R., Marra P., Di Tullio G., Iurisci C., Luini A., Corda D., De Matteis M. A. ARF mediates recruitment of PtdIns-4-OH kinase-beta and stimulates synthesis of PtdIns(4,5)P2 on the Golgi complex // Nat Cell Biol. – 1999. – T. 1, N_{0} 5. – C. 280-7.

122. Mills I. G., Praefcke G. J., Vallis Y., Peter B. J., Olesen L. E., Gallop J. L., Butler P. J., Evans P. R., McMahon H. T. EpsinR: an AP1/clathrin interacting protein involved in vesicle trafficking // J Cell Biol. – 2003. – T. 160, № 2. – C. 213-22.

123. Crottet P., Meyer D. M., Rohrer J., Spiess M. ARF1.GTP, tyrosine-based signals, and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate constitute a minimal machinery to recruit the AP-1 clathrin adaptor to membranes // Mol Biol Cell. -2002. - T. 13, No 10. -C. 3672-82.

124. de Barry J., Janoshazi A., Dupont J. L., Procksch O., Chasserot-Golaz S., Jeromin A., Vitale N. Functional implication of neuronal calcium sensor-1 and phosphoinositol 4-kinase-beta interaction in regulated exocytosis of PC12 cells // J Biol Chem. – 2006. – T. 281, № 26. – C. 18098-111.

125. Gromada J., Bark C., Smidt K., Efanov A. M., Janson J., Mandic S. A., Webb D. L., Zhang W., Meister B., Jeromin A., Berggren P. O. Neuronal calcium sensor-1 potentiates glucose-dependent exocytosis in pancreatic beta cells through activation of phosphatidylinositol 4-kinase beta // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2005. – T. 102, N 29. – C. 10303-8.

126. Mora S., Durham P. L., Smith J. R., Russo A. F., Jeromin A., Pessin J. E. NCS-1 inhibits insulinstimulated GLUT4 translocation in 3T3L1 adipocytes through a phosphatidylinositol 4-kinasedependent pathway // J Biol Chem. – 2002. – T. 277, № 30. – C. 27494-500.

127. Bartlett S. E., Reynolds A. J., Weible M., Jeromin A., Roder J., Hendry I. A. PtdIns 4-kinasebeta and neuronal calcium sensor-1 co-localize but may not directly associate in mammalian neurons // J Neurosci Res. -2000. - T. 62, No 2. - C. 216-24.

128. Zheng Q., Bobich J. A., Vidugiriene J., McFadden S. C., Thomas F., Roder J., Jeromin A. Neuronal calcium sensor-1 facilitates neuronal exocytosis through phosphatidylinositol 4-kinase // J Neurochem. – 2005. – T. 92, № 3. – C. 442-51.

129. Tuosto L., Capuano C., Muscolini M., Santoni A., Galandrini R. The multifaceted role of PIP2 in leukocyte biology // Cell Mol Life Sci. – 2015. – T. 72, № 23. – C. 4461-74.

130. Kapp-Barnea Y., Ninio-Many L., Hirschberg K., Fukuda M., Jeromin A., Sagi-Eisenberg R. Neuronal calcium sensor-1 and phosphatidylinositol 4-kinase beta stimulate extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling by accelerating recycling through the endocytic recycling compartment // Mol Biol Cell. – 2006. – T. 17, No 9. – C. 4130-41.

131. Bar-Gill A. B., Efergan A., Seger R., Fukuda M., Sagi-Eisenberg R. The extra-cellular signal regulated kinases ERK1 and ERK2 segregate displaying distinct spatiotemporal characteristics in activated mast cells // Biochim Biophys Acta. -2013. - T. 1833, No 9. -C. 2070-82.

132. Uzureau S., Lecordier L., Uzureau P., Hennig D., Graversen J. H., Homble F., Mfutu P. E., Oliveira Arcolino F., Ramos A. R., La Rovere R. M., Luyten T., Vermeersch M., Tebabi P., Dieu M., Cuypers B., Deborggraeve S., Rabant M., Legendre C., Moestrup S. K., Levtchenko E., Bultynck G., Erneux C., Perez-Morga D., Pays E. APOL1 C-Terminal Variants May Trigger Kidney Disease through Interference with APOL3 Control of Actomyosin // Cell Rep. – 2020. – T. 30, № 11. – C. 3821-3836 e13.

133. Mikhaylova M., Reddy P. P., Munsch T., Landgraf P., Suman S. K., Smalla K. H., Gundelfinger E. D., Sharma Y., Kreutz M. R. Calneurons provide a calcium threshold for trans-Golgi network to plasma membrane trafficking // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2009. – T. 106, № 22. – C. 9093-8.

134. Petko J. A., Kabbani N., Frey C., Woll M., Hickey K., Craig M., Canfield V. A., Levenson R. Proteomic and functional analysis of NCS-1 binding proteins reveals novel signaling pathways required for inner ear development in zebrafish // BMC Neurosci. – 2009. – T. 10. – C. 27.

135. Haynes L. P., Sherwood M. W., Dolman N. J., Burgoyne R. D. Specificity, promiscuity and localization of ARF protein interactions with NCS-1 and phosphatidylinositol-4 kinase-III beta // Traffic. -2007. - T. 8, No 8. - C. 1080-92.

136. Haynes L. P., Fitzgerald D. J., Wareing B., O'Callaghan D. W., Morgan A., Burgoyne R. D. Analysis of the interacting partners of the neuronal calcium-binding proteins L-CaBP1, hippocalcin, NCS-1 and neurocalcin delta // Proteomics. -2006. - T. 6, No 6. - C. 1822-32.
137. Haynes L. P., Thomas G. M., Burgoyne R. D. Interaction of neuronal calcium sensor-1 and ADPribosylation factor 1 allows bidirectional control of phosphatidylinositol 4-kinase beta and trans-Golgi network-plasma membrane traffic // J Biol Chem. – 2005. – T. 280, № 7. – C. 6047-54.

138. Todd P. A., McCue H. V., Haynes L. P., Barclay J. W., Burgoyne R. D. Interaction of ARF-1.1 and neuronal calcium sensor-1 in the control of the temperature-dependency of locomotion in *Caenorhabditis elegans* // Sci Rep. – 2016. – T. 6. – C. 30023.

139. Poulain C., Ferrus A., Mallart A. Modulation of type A K⁺ current in *Drosophila* larval muscle by internal Ca²⁺; effects of the overexpression of frequenin // Pflugers Arch. – 1994. – T. 427, № 1-2. – C. 71-9.

140. Moran O., Dascal N., Lotan I. Modulation of a Shaker potassium A-channel by protein kinase C activation // FEBS Lett. – 1991. – T. 279, № 2. – C. 256-60.

141. Serodio P., Rudy B. Differential expression of Kv4 K⁺ channel subunits mediating subthreshold transient K⁺ (A-type) currents in rat brain // J Neurophysiol. – 1998. – T. 79, № 2. – C. 1081-91.

142. Nakamura T. Y., Pountney D. J., Ozaita A., Nandi S., Ueda S., Rudy B., Coetzee W. A. A role for frequenin, a Ca^{2+} -binding protein, as a regulator of Kv4 K⁺-currents // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2001. – T. 98, No 22. – C. 12808-13.

143. Zaika O., Tolstykh G. P., Jaffe D. B., Shapiro M. S. Inositol triphosphate-mediated Ca^{2+} signals direct purinergic P2Y receptor regulation of neuronal ion channels // J Neurosci. – 2007. – T. 27, No 33. – C. 8914-26.

144. Winks J. S., Hughes S., Filippov A. K., Tatulian L., Abogadie F. C., Brown D. A., Marsh S. J. Relationship between membrane phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and receptor-mediated inhibition of native neuronal M channels // J Neurosci. – 2005. – T. 25, № 13. – C. 3400-13.

145. Xiao L., Koopmann T. T., Ordog B., Postema P. G., Verkerk A. O., Iyer V., Sampson K. J., Boink G. J., Mamarbachi M. A., Varro A., Jordaens L., Res J., Kass R. S., Wilde A. A., Bezzina C. R., Nattel S. Unique cardiac Purkinje fiber transient outward current beta-subunit composition: a potential molecular link to idiopathic ventricular fibrillation // Circ Res. – 2013. – T. 112, № 10. – C. 1310-22.

146. Weiss J. L., Archer D. A., Burgoyne R. D. Neuronal Ca^{2+} sensor-1/frequenin functions in an autocrine pathway regulating Ca^{2+} channels in bovine adrenal chromaffin cells // J Biol Chem. – 2000. – T. 275, No 51. – C. 40082-7.

147. Weiss J. L., Burgoyne R. D. Voltage-independent inhibition of P/Q-type Ca^{2+} channels in adrenal chromaffin cells via a neuronal Ca^{2+} sensor-1-dependent pathway involves Src family tyrosine kinase // J Biol Chem. – 2001. – T. 276, No 48. – C. 44804-11.

148. Rousset M., Cens T., Gavarini S., Jeromin A., Charnet P. Down-regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels by neuronal calcium sensor-1 is beta subunit-specific // J Biol Chem. – 2003. – T. 278, No 9. – C. 7019-26.

149. Gambino F., Pavlowsky A., Begle A., Dupont J. L., Bahi N., Courjaret R., Gardette R., Hadjkacem H., Skala H., Poulain B., Chelly J., Vitale N., Humeau Y. IL1-receptor a^{ccessory protein-like 1} (IL1RAPL1), a protein involved in cognitive functions, regulates N-type Ca2+-channel and neurite elongation // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2007.

- T. 104, № 21. - C. 9063-8.

150. Scott V. E., De Waard M., Liu H., Gurnett C. A., Venzke D. P., Lennon V. A., Campbell K. P. Beta subunit heterogeneity in N-type Ca²⁺ channels // J Biol Chem. – 1996. – T. 271, № 6. – C. 3207-12.

151. Yan J., Leal K., Magupalli V. G., Nanou E., Martinez G. Q., Scheuer T., Catterall W. A. Modulation of CaV2.1 channels by neuronal calcium sensor-1 induces short-term synaptic facilitation // Mol Cell Neurosci. – 2014. – T. 63. – C. 124-31.

152. Lian L. Y., Pandalaneni S. R., Todd P. A., Martin V. M., Burgoyne R. D., Haynes L. P. Demonstration of binding of neuronal calcium sensor-1 to the cav2.1 p/q-type calcium channel // Biochemistry. -2014. - T. 53, No 38. - C. 6052-62.

153. Schlecker C., Boehmerle W., Jeromin A., DeGray B., Varshney A., Sharma Y., Szigeti-Buck K., Ehrlich B. E. Neuronal calcium sensor-1 enhancement of InsP3 receptor activity is inhibited by therapeutic levels of lithium // J Clin Invest. – 2006. – T. 116, № 6. – C. 1668-74.

154. Iketani M., Imaizumi C., Nakamura F., Jeromin A., Mikoshiba K., Goshima Y., Takei K. Regulation of neurite outgrowth mediated by neuronal calcium sensor-1 and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in nerve growth cones // Neuroscience. -2009. - T. 161, No 3. - C. 743-52.

155. Tang J., Lin Y., Zhang Z., Tikunova S., Birnbaumer L., Zhu M. X. Identification of common binding sites for calmodulin and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors on the carboxyl termini of trp channels // J Biol Chem. – 2001. – T. 276, № 24. – C. 21303-10.

156. Bofill-Cardona E., Kudlacek O., Yang Q., Ahorn H., Freissmuth M., Nanoff C. Binding of calmodulin to the D2-dopamine receptor reduces receptor signaling by arresting the G protein activation switch // J Biol Chem. -2000. - T. 275, No 42. - C. 32672-80.

157. Fitzgerald D. J., Burgoyne R. D., Haynes L. P. Neuronal calcium sensor proteins are unable to modulate NFAT activation in mammalian cells // Biochim Biophys Acta. – 2008. – T. 1780, № 2. – C. 240-8.

158. Nakamura T. Y., Jeromin A., Smith G., Kurushima H., Koga H., Nakabeppu Y., Wakabayashi S., Nabekura J. Novel role of neuronal Ca²⁺ sensor-1 as a survival factor up-regulated in injured neurons // J Cell Biol. – 2006. – T. 172, № 7. – C. 1081-91.

159. Soler R. M., Dolcet X., Encinas M., Egea J., Bayascas J. R., Comella J. X. Receptors of the glial cell line-derived neurotrophic factor family of neurotrophic factors signal cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in spinal cord motoneurons // J Neurosci. – 1999. – T. 19, N_{2} 21. – C. 9160-9.

160. Yip P. K., Wong L. F., Sears T. A., Yanez-Munoz R. J., McMahon S. B. Cortical overexpression of neuronal calcium sensor-1 induces functional plasticity in spinal cord following unilateral pyramidal tract injury in rat // PLoS Biol. -2010. - T. 8, $N_{0} 6. - C.$ e1000399.

161. Nakamura T. Y., Nakao S., Wakabayashi S. Neuronal Ca(2+) sensor-1 contributes to stress tolerance in cardiomyocytes via activation of mitochondrial detoxification pathways // J Mol Cell Cardiol. -2016. - T. 99. - C. 23-34.

162. Wright D. C., Geiger P. C., Han D. H., Jones T. E., Holloszy J. O. Calcium induces increases in peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-lalpha and mitochondrial biogenesis by a pathway leading to p38 mitogen-activated protein kinase activation // J Biol Chem. – 2007. – T. 282, $N \ge 26. - C. 18793-9.$

163. Yano S., Tokumitsu H., Soderling T. R. Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway // Nature. – 1998. – T. 396, № 6711. – C. 584-7.

164. Angebault C., Fauconnier J., Patergnani S., Rieusset J., Danese A., Affortit C. A., Jagodzinska J., Megy C., Quiles M., Cazevieille C., Korchagina J., Bonnet-Wersinger D., Milea D., Hamel C., Pinton P., Thiry M., Lacampagne A., Delprat B., Delettre C. ER-mitochondria cross-talk is regulated by the Ca(2+) sensor NCS1 and is impaired in Wolfram syndrome // Sci Signal. – 2018. – T. 11, № 553.

165. Nguyen L. D., Fischer T. T., Abreu D., Arroyo A., Urano F., Ehrlich B. E. Calpain inhibitor and ibudilast rescue beta cell functions in a cellular model of Wolfram syndrome // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2020. – T. 117, № 29. – C. 17389-17398.

166. Wilkinson B. L., Jeromin A., Roder J., Hyson R. L. Activity-dependent regulation of the subcellular localization of neuronal calcium sensor-1 in the avian cochlear nucleus // Neuroscience. -2003. - T. 117, No 4. -C. 957-64.

167. Warchol M. E., Dallos P. Neural coding in the chick cochlear nucleus // J Comp Physiol A. – 1990. – T. 166, № 5. – C. 721-34.

168. Murakami H., Bessinger K., Hellmann J., Murakami S. Aging-dependent and -independent modulation of associative learning behavior by insulin/insulin-like growth factor-1 signal in *Caenorhabditis elegans* // J Neurosci. – 2005. – T. 25, № 47. – C. 10894-904.

169. Murakami S., Murakami H. The effects of aging and oxidative stress on learning behavior in *C. elegans* // Neurobiol Aging. – 2005. – T. 26, № 6. – C. 899-905.

170. Ye H., Ye B., Wang D. Trace administration of vitamin E can retrieve and prevent UV-irradiationand metal exposure-induced memory deficits in nematode *Caenorhabditis elegans* // Neurobiol Learn Mem. – 2008. – T. 90, № 1. – C. 10-8.

171. van Heemst D. Insulin, IGF-1 and longevity // Aging Dis. – 2010. – T. 1, № 2. – C. 147-57.

172. Wetzel G. T., Klitzner T. S. Developmental cardiac electrophysiology recent advances in cellular physiology // Cardiovasc Res. – 1996. – T. 31 Spec No. – C. E52-60.

173. Heineke J., Molkentin J. D. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways // Nat Rev Mol Cell Biol. – 2006. – T. 7, № 8. – C. 589-600.

174. De Raad S., Comte M., Nef P., Lenz S. E., Gundelfinger E. D., Cox J. A. Distribution pattern of three neural calcium-binding proteins (NCS-1, VILIP and recoverin) in chicken, bovine and rat retina // Histochem J. – 1995. – T. 27, N_{2} 7. – C. 524-35.

175. Mercer A. J., Thoreson W. B. The dynamic architecture of photoreceptor ribbon synapses: cytoskeletal, extracellular matrix, and intramembrane proteins // Vis Neurosci. -2011. - T. 28, No 6. -C. 453-71.

176. Krizaj D., Copenhagen D. R. Calcium regulation in photoreceptors // Front Biosci. – 2002. – T. 7. – C. d2023-44.

177. Philippov P. P. Phototransduction and calcium // Membr Cell Biol. – 2000. – T. 13, № 2. – C. 195-206.

178. Van Hook M. J., Nawy S., Thoreson W. B. Voltage- and calcium-gated ion channels of neurons in the vertebrate retina // Prog Retin Eye Res. – 2019. – T. 72. – C. 100760.

179. Nachman-Clewner M., St Jules R., Townes-Anderson E. L-type calcium channels in the photoreceptor ribbon synapse: localization and role in plasticity // J Comp Neurol. – 1999. – T. 415, N_{P} 1. – C. 1-16.

180. Stella S. L., Jr., Bryson E. J., Thoreson W. B. A2 adenosine receptors inhibit calcium influx through L-type calcium channels in rod photoreceptors of the salamander retina // J Neurophysiol. -2002. - T. 87, No 1. -C. 351-60.

181. Xu H. P., Zhao J. W., Yang X. L. Expression of voltage-dependent calcium channel subunits in the rat retina // Neurosci Lett. – 2002. – T. 329, № 3. – C. 297-300.

182. Balakrishnan S. S., Basu U., Shinde D., Thakur R., Jaiswal M., Raghu P. Regulation of PI4P levels by PI4KIIIalpha during G-protein-coupled PLC signaling in *Drosophila* photoreceptors // J Cell Sci. – 2018. – T. 131, № 15.

183. Zolyomi A., Zhao X., Downing G. J., Balla T. Localization of two distinct type III phosphatidylinositol 4-kinase enzyme mRNAs in the rat // Am J Physiol Cell Physiol. – 2000. – T. 278, N_{2} 5. – C. C914-20.

184. Firsov M. L., Astakhova L. A. The Role of Dopamine in Controlling Retinal Photoreceptor Function in Vertebrates // Neuroscience and Behavioral Physiology. -2016. - T. 46, No 2. -C. 138-145. 185. Butler M. R., Ma H., Yang F., Belcher J., Le Y. Z., Mikoshiba K., Biel M., Michalakis S., Iuso A., Krizaj D., Ding X. Q. Endoplasmic reticulum (ER) Ca(2+)-channel activity contributes to ER stress and cone death in cyclic nucleotide-gated channel deficiency // J Biol Chem. -2017. - T. 292, No 27. -C. 11189-11205.

186. de Almeida Gomes C. P., Ventura A. L. Localization of G protein-coupled receptor kinases (GRKs) in the avian retina // Brain Res Bull. – 2004. – T. 63, № 6. – C. 499-507.

187. Ma H., Butler M. R., Thapa A., Belcher J., Yang F., Baehr W., Biel M., Michalakis S., Ding X. Q. cGMP/Protein Kinase G Signaling Suppresses Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Phosphorylation and Promotes Endoplasmic Reticulum Stress in Photoreceptors of Cyclic Nucleotide-gated Channel-deficient Mice // J Biol Chem. – 2015. – T. 290, № 34. – C. 20880-20892.

188. Beatty S., Koh H., Phil M., Henson D., Boulton M. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration // Surv Ophthalmol. – 2000. – T. 45, № 2. – C. 115-34.

189. Benkert J., Hess S., Roy S., Beccano-Kelly D., Wiederspohn N., Duda J., Simons C., Patil K., Gaifullina A., Mannal N., Dragicevic E., Spaich D., Muller S., Nemeth J., Hollmann H., Deuter N., Mousba Y., Kubisch C., Poetschke C., Striessnig J., Pongs O., Schneider T., Wade-Martins R., Patel S., Parlato R., Frank T., Kloppenburg P., Liss B. Cav2.3 channels contribute to dopaminergic neuron loss in a model of Parkinson's disease // Nat Commun. – 2019. – T. 10, № 1. – C. 5094.

190. Wang D., O'Halloran D., Goodman M. B. GCY-8, PDE-2, and NCS-1 are critical elements of the cGMP-dependent thermotransduction cascade in the AFD neurons responsible for *C. elegans* thermotaxis // J Gen Physiol. -2013. - T. 142, Nº 4. -C. 437-49.

191. Terao R., Honjo M., Ueta T., Obinata H., Izumi T., Kurano M., Yatomi Y., Koso H., Watanabe S., Aihara M. Light Stress-Induced Increase of Sphingosine 1-Phosphate in Photoreceptors and Its Relevance to Retinal Degeneration // Int J Mol Sci. – 2019. – T. 20, № 15.

192. McDougald D. S., Papp T. E., Zezulin A. U., Zhou S., Bennett J. AKT3 Gene Transfer Promotes Anabolic Reprogramming and Photoreceptor Neuroprotection in a Pre-clinical Model of Retinitis Pigmentosa // Mol Ther. – 2019. – T. 27, N 7. – C. 1313-1326.

193. Burgoyne R. D., Haynes L. P. Understanding the physiological roles of the neuronal calcium sensor proteins // Mol Brain. – 2012. – T. 5, № 1. – C. 2.

194. Braunewell K. H. The darker side of Ca^{2+} signaling by neuronal Ca^{2+} -sensor proteins: from Alzheimer's disease to cancer // Trends Pharmacol Sci. – 2005. – T. 26, No 7. – C. 345-51.

195. Bandura J., Feng Z. P. Current Understanding of the Role of Neuronal Calcium Sensor 1 in Neurological Disorders // Mol Neurobiol. – 2019. – T. 56, № 9. – C. 6080-6094.

196. Boeckel G. R., Ehrlich B. E. NCS-1 is a regulator of calcium signaling in health and disease // Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. – 2018. – T. 1865, № 11 Pt B. – C. 1660-1667.

197. Koh P. O., Undie A. S., Kabbani N., Levenson R., Goldman-Rakic P. S., Lidow M. S. Up-regulation of neuronal calcium sensor-1 (NCS-1) in the prefrontal cortex of schizophrenic and bipolar patients // Proc Natl Acad Sci U S A. -2003. - T. 100, No 1. - C. 313-7.

198. Bai J., He F., Novikova S. I., Undie A. S., Dracheva S., Haroutunian V., Lidow M. S. Abnormalities in the dopamine system in schizophrenia may lie in altered levels of dopamine receptor-interacting proteins // Biol Psychiatry. -2004. - T. 56, No 6. - C. 427-40.

199. Souza B. R., Torres K. C., Miranda D. M., Motta B. S., Caetano F. S., Rosa D. V., Souza R. P., Giovani A., Jr., Carneiro D. S., Guimaraes M. M., Martins-Silva C., Reis H. J., Gomez M. V., Jeromin A., Romano-Silva M. A. Downregulation of the cAMP/PKA pathway in PC12 cells overexpressing NCS-1 // Cell Mol Neurobiol. – 2011. – T. 31, № 1. – C. 135-43.

200. Souza B. R., Souza R. P., Rosa D. V., Guimaraes M. M., Correa H., Romano-Silva M. A. Dopaminergic intracellular signal integrating proteins: relevance to schizophrenia // Dialogues Clin Neurosci. – 2006. – T. 8, N 1. – C. 95-100.

201. Torres K. C., Souza B. R., Miranda D. M., Sampaio A. M., Nicolato R., Neves F. S., Barros A. G., Dutra W. O., Gollob K. J., Correa H., Romano-Silva M. A. Expression of neuronal calcium sensor-1 (NCS-1) is decreased in leukocytes of schizophrenia and bipolar disorder patients // Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. – 2009. – T. 33, № 2. – C. 229-34.

202. Harvey A. G., Talbot L. S., Gershon A. Sleep Disturbance in Bipolar Disorder Across the Lifespan // Clin Psychol (New York). – 2009. – T. 16, № 2. – C. 256-277.

203. D'Onofrio S., Kezunovic N., Hyde J. R., Luster B., Messias E., Urbano F. J., Garcia-Rill E. Modulation of gamma oscillations in the pedunculopontine nucleus by neuronal calcium sensor protein-1: relevance to schizophrenia and bipolar disorder // J Neurophysiol. – 2015. – T. 113, № 3. – C. 709-19.

204. Garcia-Rill E., D'Onofrio S., Mahaffey S. C., Bisagno V., Urbano F. J. Bottom-up gamma and bipolar disorder, clinical and neuroepigenetic implications // Bipolar Disord. -2019. - T. 21, No 2. -C. 108-116.

205. Jiang X., Lautermilch N. J., Watari H., Westenbroek R. E., Scheuer T., Catterall W. A. Modulation of CaV2.1 channels by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II bound to the C-terminal domain // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2008. – T. 105, № 1. – C. 341-6.

206. D'Onofrio S., Hyde J., Garcia-Rill E. Interaction between neuronal calcium sensor protein 1 and lithium in pedunculopontine neurons // Physiol Rep. -2017. - T. 5, No 7.

207. D'Onofrio S., Urbano F. J., Messias E., Garcia-Rill E. Lithium decreases the effects of neuronal calcium sensor protein 1 in pedunculopontine neurons // Physiol Rep. – 2016. – T. 4, № 6.

208. Souza B. R., Torres K. C., Miranda D. M., Motta B. S., Scotti-Muzzi E., Guimaraes M. M., Carneiro D. S., Rosa D. V., Souza R. P., Reis H. J., Jeromin A., Romano-Silva M. A. Lack of effects of typical and atypical antipsychotics in DARPP-32 and NCS-1 levels in PC12 cells overexpressing NCS-1 // J Negat Results Biomed. – 2010. – T. 9. – C. 4.

209. Souza B. R., Motta B. S., Rosa D. V., Torres K. C., Castro A. A., Comim C. M., Sampaio A. M., Lima F. F., Jeromin A., Quevedo J., Romano-Silva M. A. DARPP-32 and NCS-1 expression is not altered in brains of rats treated with typical or atypical antipsychotics // Neurochem Res. – 2008. – T. 33, N° 3. – C. 533-8.

210. Kabbani N., Levenson R. Antipsychotic-induced alterations in D2 dopamine receptor interacting proteins within the cortex // Neuroreport. – 2006. – T. 17, № 3. – C. 299-301.

211. Muralidhar D., Kunjachen Jobby M., Jeromin A., Roder J., Thomas F., Sharma Y. Calcium and chlorpromazine binding to the EF-hand peptides of neuronal calcium sensor-1 // Peptides. -2004. - T. 25, No 6. -C. 909-17.

212. Kabbani N., Woll M. P., Nordman J. C., Levenson R. Dopamine receptor interacting proteins: targeting neuronal calcium sensor-1/D2 dopamine receptor interaction for antipsychotic drug development // Curr Drug Targets. – 2012. – T. 13, № 1. – C. 72-9.

213. Nestler E. J. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction // Nat Rev Neurosci. – 2001. – T. 2, N_{2} 2. – C. 119-28.

214. Chen X., Marrero H. G., Murphy R., Lin Y. J., Freedman J. E. Altered gating of opiate receptormodulated K⁺ channels on amygdala neurons of morphine-dependent rats // Proc Natl Acad Sci U S A. -2000. - T. 97, No 26. - C. 14692-6.

215. Stefanski R., Ladenheim B., Lee S. H., Cadet J. L., Goldberg S. R. Neuroadaptations in the dopaminergic system after active self-administration but not after passive administration of methamphetamine // Eur J Pharmacol. – 1999. – T. 371, No 2-3. – C. 123-35.

216. Jenney C. B., Petko J., Ebersole B., Njatcha C. V., Uzamere T. O., Alexander D. N., Grigson P. S., Levenson R. Early avoidance of a heroin-paired taste-cue and subsequent addiction-like behavior in rats // Brain Res Bull. – 2016. – T. 123. – C. 61-70.

217. Rodriguez Parkitna J. M., Bilecki W., Mierzejewski P., Stefanski R., Ligeza A., Bargiela A., Ziolkowska B., Kostowski W., Przewlocki R. Effects of morphine on gene expression in the rat amygdala // J Neurochem. – 2004. – T. 91, № 1. – C. 38-48.

218. Dahl J. P., Jepson C., Levenson R., Wileyto E. P., Patterson F., Berrettini W. H., Lerman C. Interaction between variation in the D2 dopamine receptor (DRD2) and the neuronal calcium sensor-1 (FREQ) genes in predicting response to nicotine replacement therapy for tobacco dependence // Pharmacogenomics J. – 2006. – T. 6, No 3. – C. 194-9.

219. Multani P. K., Clarke T. K., Narasimhan S., Ambrose-Lanci L., Kampman K. M., Pettinati H. M., Oslin D. W., O'Brien C. P., Berrettini W. H., Lohoff F. W. Neuronal calcium sensor-1 and cocaine addiction: a genetic association study in African-Americans and European Americans // Neurosci Lett. -2012. - T. 531, No 1. - C. 46-51.

220. Bahi N., Friocourt G., Carrie A., Graham M. E., Weiss J. L., Chafey P., Fauchereau F., Burgoyne R. D., Chelly J. IL1 receptor accessory protein like, a protein involved in X-linked mental retardation, interacts with Neuronal Calcium Sensor-1 and regulates exocytosis // Hum Mol Genet. – 2003. – T. 12, N 12. – C. 1415-25.

221. Pavlowsky A., Gianfelice A., Pallotto M., Zanchi A., Vara H., Khelfaoui M., Valnegri P., Rezai X., Bassani S., Brambilla D., Kumpost J., Blahos J., Roux M. J., Humeau Y., Chelly J., Passafaro M., Giustetto M., Billuart P., Sala C. A postsynaptic signaling pathway that may account for the cognitive defect due to IL1RAPL1 mutation // Curr Biol. – 2010. – T. 20, No 2. – C. 103-15.

222. Carrie A., Jun L., Bienvenu T., Vinet M. C., McDonell N., Couvert P., Zemni R., Cardona A., Van Buggenhout G., Frints S., Hamel B., Moraine C., Ropers H. H., Strom T., Howell G. R., Whittaker A., Ross M. T., Kahn A., Fryns J. P., Beldjord C., Marynen P., Chelly J. A new member of the IL-1 receptor family highly expressed in hippocampus and involved in X-linked mental retardation // Nat Genet. – 1999. – T. 23, N 1. – C. 25-31.

223. Gambino F., Kneib M., Pavlowsky A., Skala H., Heitz S., Vitale N., Poulain B., Khelfaoui M., Chelly J., Billuart P., Humeau Y. IL1RAPL1 controls inhibitory networks during cerebellar development in mice // Eur J Neurosci. – 2009. – T. 30, № 8. – C. 1476-86.

224. Reeber S. L., Otis T. S., Sillitoe R. V. New roles for the cerebellum in health and disease // Front Syst Neurosci. – 2013. – T. 7. – C. 83.

225. Ng E., Georgiou J., Avila A., Trought K., Mun H. S., Hodgson M., Servinis P., Roder J. C., Collingridge G. L., Wong A. H. C. Mice lacking neuronal calcium sensor-1 show social and cognitive deficits // Behav Brain Res. – 2020. – T. 381. – C. 112420.

226. Piton A., Michaud J. L., Peng H., Aradhya S., Gauthier J., Mottron L., Champagne N., Lafreniere R. G., Hamdan F. F., team S. D., Joober R., Fombonne E., Marineau C., Cossette P., Dube M. P., Haghighi P., Drapeau P., Barker P. A., Carbonetto S., Rouleau G. A. Mutations in the calcium-related gene IL1RAPL1 are associated with autism // Hum Mol Genet. – 2008. – T. 17, № 24. – C. 3965-74.

227. Handley M. T., Lian L. Y., Haynes L. P., Burgoyne R. D. Structural and functional deficits in a neuronal calcium sensor-1 mutant identified in a case of autistic spectrum disorder // PLoS One. – 2010. – T. 5, N_{2} 5. – C. e10534.

228. Krey J. F., Dolmetsch R. E. Molecular mechanisms of autism: a possible role for Ca^{2+} signaling // Curr Opin Neurobiol. – 2007. – T. 17, No 1. – C. 112-9.

229. Tabet R., Moutin E., Becker J. A., Heintz D., Fouillen L., Flatter E., Krezel W., Alunni V., Koebel P., Dembele D., Tassone F., Bardoni B., Mandel J. L., Vitale N., Muller D., Le Merrer J., Moine H. Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP) controls diacylglycerol kinase activity in neurons // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2016. – T. 113, № 26. – C. E3619-28.

230. Tessier C. R., Broadie K. The fragile X mental retardation protein developmentally regulates the strength and fidelity of calcium signaling in *Drosophila* mushroom body neurons // Neurobiol Dis. -2011. - T. 41, No 1. - C. 147-59.

231. Mansilla A., Chaves-Sanjuan A., Campillo N. E., Semelidou O., Martinez-Gonzalez L., Infantes L., Gonzalez-Rubio J. M., Gil C., Conde S., Skoulakis E. M., Ferrus A., Martinez A., Sanchez-Barrena M. J. Interference of the complex between NCS-1 and Ric8a with phenothiazines regulates synaptic function and is an approach for fragile X syndrome // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2017. – T. 114, Nº 6. – C. E999-E1008.

232. Irwin S. A., Patel B., Idupulapati M., Harris J. B., Crisostomo R. A., Larsen B. P., Kooy F., Willems P. J., Cras P., Kozlowski P. B., Swain R. A., Weiler I. J., Greenough W. T. Abnormal dendritic spine characteristics in the temporal and visual cortices of patients with fragile-X syndrome: a quantitative examination // Am J Med Genet. -2001. - T. 98, $N_{\odot} 2. - C. 161-7$.

233. Roca C., Martinez-Gonzalez L., Daniel-Mozo M., Sastre J., Infantes L., Mansilla A., Chaves-Sanjuan A., Gonzalez-Rubio J. M., Gil C., Canada F. J., Martinez A., Sanchez-Barrena M. J., Campillo N. E. Deciphering the Inhibition of the Neuronal Calcium Sensor 1 and the Guanine Exchange Factor Ric8a with a Small Phenothiazine Molecule for the Rational Generation of Therapeutic Synapse Function Regulators // J Med Chem. – 2018. – T. 61, Nº 14. – C. 5910-5921.

234. Canal-Martin A., Sastre J., Sanchez-Barrena M. J., Canales A., Baldominos S., Pascual N., Martinez-Gonzalez L., Molero D., Fernandez-Valle M. E., Saez E., Blanco-Gabella P., Gomez-Rubio E., Martin-Santamaria S., Saiz A., Mansilla A., Canada F. J., Jimenez-Barbero J., Martinez A., Perez-Fernandez R. Insights into real-time chemical processes in a calcium sensor protein-directed dynamic library // Nat Commun. – 2019. – T. 10, № 1. – C. 2798.

235. Surmeier D. J., Guzman J. N., Sanchez-Padilla J., Schumacker P. T. The role of calcium and mitochondrial oxidant stress in the loss of substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons in Parkinson's disease // Neuroscience. -2011. - T. 198. - C. 221-31.

236. Dragicevic E., Poetschke C., Duda J., Schlaudraff F., Lammel S., Schiemann J., Fauler M., Hetzel A., Watanabe M., Lujan R., Malenka R. C., Striessnig J., Liss B. Cav1.3 channels control D2autoreceptor responses via NCS-1 in substantia nigra dopamine neurons // Brain. – 2014. – T. 137, № Pt 8. – C. 2287-302.

237. Poetschke C., Dragicevic E., Duda J., Benkert J., Dougalis A., DeZio R., Snutch T. P., Striessnig J., Liss B. Compensatory T-type Ca^{2+} channel activity alters D2-autoreceptor responses of Substantia nigra dopamine neurons from Cav1.3 L-type Ca^{2+} channel KO mice // Sci Rep. – 2015. – T. 5. – C. 13688.

238. Borgkvist A., Mosharov E. V., Sulzer D. Calcium currents regulate dopamine autoreceptors // Brain. – 2014. – T. 137, № Pt 8. – C. 2113-5.

239. Simons C., Benkert J., Deuter N., Poetschke C., Pongs O., Schneider T., Duda J., Liss B. NCS-1 Deficiency Affects mRNA Levels of Genes Involved in Regulation of ATP Synthesis and Mitochondrial Stress in Highly Vulnerable Substantia nigra Dopaminergic Neurons // Front Mol Neurosci. – 2019. – T. 12. – C. 252.

240. Wakisaka Y., Niwano S., Niwano H., Saito J., Yoshida T., Hirasawa S., Kawada H., Izumi T. Structural and electrical ventricular remodeling in rat acute myocarditis and subsequent heart failure // Cardiovasc Res. -2004. - T. 63, N 4. - C. 689-99.

241. Comim C. M., Silva N. C., Mina F., Dominguini D., Scaini G., Morais M. O., Rosa D. V., Magno L. A., Streck E. L., Romano-Silva M. A., Quevedo J., Dal-Pizzol F. Evaluation of NCS-1, DARPP-32, and neurotrophins in hippocampus and prefrontal cortex in rats submitted to sepsis // Synapse. – 2014. – T. 68, N 10. – C. 474-9.

242. Raghavendra Rao V. L., Bowen K. K., Dhodda V. K., Song G., Franklin J. L., Gavva N. R., Dempsey R. J. Gene expression analysis of spontaneously hypertensive rat cerebral cortex following transient focal cerebral ischemia // J Neurochem. -2002. - T. 83, No 5. - C. 1072-86.

243. Antony A. K., Kong W., Lorenz H. P. Upregulation of neurodevelopmental genes during scarless healing // Ann Plast Surg. – 2010. – T. 64, № 2. – C. 247-50.

244. Schuette D., Moore L. M., Robert M. E., Taddei T. H., Ehrlich B. E. Hepatocellular Carcinoma Outcome Is Predicted by Expression of Neuronal Calcium Sensor 1 // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. -2018. - T. 27, No 9. - C. 1091-1100.

245. Moore L. M., England A., Ehrlich B. E., Rimm D. L. Calcium Sensor, NCS-1, Promotes Tumor Aggressiveness and Predicts Patient Survival // Mol Cancer Res. – 2017. – T. 15, № 7. – C. 942-952.

246. Apasu J. E., Schuette D., LaRanger R., Steinle J. A., Nguyen L. D., Grosshans H. K., Zhang M., Cai W. L., Yan Q., Robert M. E., Mak M., Ehrlich B. E. Neuronal calcium sensor 1 (NCS1) promotes motility and metastatic spread of breast cancer cells in vitro and in vivo // FASEB J. – 2019. – T. 33, № 4. – C. 4802-4813.

247. Bong A. H. L., Robitaille M., Milevskiy M. J. G., Roberts-Thomson S. J., Monteith G. R. NCS-1 expression is higher in basal breast cancers and regulates calcium influx and cytotoxic responses to doxorubicin // Mol Oncol. -2020. - T. 14, No 1. - C. 87-104.

248. Yang S., Zhang J. J., Huang X. Y. Orai1 and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis // Cancer Cell. – 2009. – T. 15, № 2. – C. 124-34.

249. Moore L. M., Wilkinson R., Altan M., Toki M., Carvajal-Hausdorf D. E., McGuire J., Ehrlich B. E., Rimm D. L. An assessment of neuronal calcium sensor-1 and response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients // NPJ Breast Cancer. -2018. - T. 4. - C. 6.

250. Rowinsky E. K., Eisenhauer E. A., Chaudhry V., Arbuck S. G., Donehower R. C. Clinical toxicities encountered with paclitaxel (Taxol) // Semin Oncol. – 1993. – T. 20, № 4 Suppl 3. – C. 1-15.

251. Benbow J. H., Mann T., Keeler C., Fan C., Hodsdon M. E., Lolis E., DeGray B., Ehrlich B. E. Inhibition of paclitaxel-induced decreases in calcium signaling // J Biol Chem. – 2012. – T. 287, № 45. – C. 37907-16.

252. Boehmerle W., Splittgerber U., Lazarus M. B., McKenzie K. M., Johnston D. G., Austin D. J., Ehrlich B. E. Paclitaxel induces calcium oscillations via an inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and neuronal calcium sensor 1-dependent mechanism // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2006. – T. 103, № 48. – C. 18356-61.

253. Boehmerle W., Zhang K., Sivula M., Heidrich F. M., Lee Y., Jordt S. E., Ehrlich B. E. Chronic exposure to paclitaxel diminishes phosphoinositide signaling by calpain-mediated neuronal calcium sensor-1 degradation // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2007. – T. 104, № 26. – C. 11103-8.

254. Blachford C., Celic A., Petri E. T., Ehrlich B. E. Discrete proteolysis of neuronal calcium sensor-1 (NCS-1) by mu-calpain disrupts calcium binding // Cell Calcium. – 2009. – T. 46, № 4. – C. 257-62.

255. Wang M. S., Davis A. A., Culver D. G., Wang Q., Powers J. C., Glass J. D. Calpain inhibition protects against Taxol-induced sensory neuropathy // Brain. – 2004. – T. 127, № Pt 3. – C. 671-9.

256. Benbow J. H., DeGray B., Ehrlich B. E. Protection of neuronal calcium sensor 1 protein in cells treated with paclitaxel // J Biol Chem. – 2011. – T. 286, № 40. – C. 34575-82.

257. Mo M., Erdelyi I., Szigeti-Buck K., Benbow J. H., Ehrlich B. E. Prevention of paclitaxel-induced peripheral neuropathy by lithium pretreatment // FASEB J. – 2012. – T. 26, № 11. – C. 4696-709.

258. Karim S., Mirza Z., Ansari S. A., Rasool M., Iqbal Z., Sohrab S. S., Kamal M. A., Abuzenadah A. M., Al-Qahtani M. H. Transcriptomics study of neurodegenerative disease: emphasis on synaptic dysfunction mechanism in Alzheimer's disease // CNS Neurol Disord Drug Targets. – 2014. – T. 13, № 7. – C. 1202-12.

259. Khanim F., Kirk J., Latif F., Barrett T. G. WFS1/wolframin mutations, Wolfram syndrome, and associated diseases // Hum Mutat. – 2001. – T. 17, № 5. – C. 357-67.

260. Grabarek Z. Structural basis for diversity of the EF-hand calcium-binding proteins // J Mol Biol. – 2006. – T. 359, № 3. – C. 509-25.

261. Burgoyne R. D., Weiss J. L. The neuronal calcium sensor family of Ca²⁺-binding proteins // Biochem J. – 2001. – T. 353, № Pt 1. – C. 1-12.

262. Lim S., Strahl T., Thorner J., Ames J. B. Structure of a Ca^{2+} -myristoyl switch protein that controls activation of a phosphatidylinositol 4-kinase in fission yeast // J Biol Chem. – 2011. – T. 286, No 14. – C. 12565-77.

263. Stephen R., Bereta G., Golczak M., Palczewski K., Sousa M. C. Stabilizing function for myristoyl group revealed by the crystal structure of a neuronal calcium sensor, guanylate cyclase-activating protein 1 // Structure. -2007. - T. 15, No 11. - C. 1392-402.

264. Ames J. B., Ishima R., Tanaka T., Gordon J. I., Stryer L., Ikura M. Molecular mechanics of calciummyristoyl switches // Nature. – 1997. – T. 389, № 6647. – C. 198-202.

265. Ames J. B., Hamasaki N., Molchanova T. Structure and calcium-binding studies of a recoverin mutant (E85Q) in an allosteric intermediate state // Biochemistry. – 2002. – T. 41, N $_{2}$ 18. – C. 5776-87. 266. Tanaka T., Ames J. B., Harvey T. S., Stryer L., Ikura M. Sequestration of the membrane-targeting myristoyl group of recoverin in the calcium-free state // Nature. – 1995. – T. 376, N $_{2}$ 6539. – C. 444-7. 267. Lian L. Y., Pandalaneni S. R., Patel P., McCue H. V., Haynes L. P., Burgoyne R. D. Characterisation of the interaction of the C-terminus of the dopamine D2 receptor with neuronal calcium sensor-1 // PLoS One. – 2011. – T. 6, N $_{2}$ 11. – C. e27779.

268. Wang H., Yan Y., Liu Q., Huang Y., Shen Y., Chen L., Chen Y., Yang Q., Hao Q., Wang K., Chai J. Structural basis for modulation of Kv4 K^+ channels by auxiliary KChIP subunits // Nat Neurosci. – 2007. – T. 10, No 1. – C. 32-9.

269. Weiergraber O. H., Senin, II, Zernii E. Y., Churumova V. A., Kovaleva N. A., Nazipova A. A., Permyakov S. E., Permyakov E. A., Philippov P. P., Granzin J., Koch K. W. Tuning of a neuronal calcium sensor // J Biol Chem. – 2006. – T. 281, № 49. – C. 37594-602.

270. Zernii E. Y., Komolov K. E., Permyakov S. E., Kolpakova T., Dell'orco D., Poetzsch A., Knyazeva E. L., Grigoriev, II, Permyakov E. A., Senin, II, Philippov P. P., Koch K. W. Involvement of the recoverin C-terminal segment in recognition of the target enzyme rhodopsin kinase // Biochem J. – 2011. – T. 435, No 2. – C. 441-50.

271. Lim S., Dizhoor A. M., Ames J. B. Structural diversity of neuronal calcium sensor proteins and insights for activation of retinal guanylyl cyclase by GCAP1 // Front Mol Neurosci. – 2014. – T. 7. – C. 19.

272. Peshenko I. V., Olshevskaya E. V., Lim S., Ames J. B., Dizhoor A. M. Identification of target binding site in photoreceptor guanylyl cyclase-activating protein 1 (GCAP1) // J Biol Chem. – 2014. – T. 289, N 14. – C. 10140-54.

273. Peshenko I. V., Olshevskaya E. V., Lim S., Ames J. B., Dizhoor A. M. 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. – T. 287, No 17. – C. 13972-84.

274. Zernii E. Y., Grigoriev, II, Nazipova A. A., Scholten A., Kolpakova T. V., Zinchenko D. V., Kazakov A. S., Senin, II, Permyakov S. E., Dell'Orco D., Philippov P. P., Koch K. W. Regulatory function of the C-terminal segment of guanylate cyclase-activating protein 2 // Biochim Biophys Acta. -2015. - T. 1854, No 10 Pt A. - C. 1325-37.

275. Ames J. B., Hendricks K. B., Strahl T., Huttner I. G., Hamasaki N., Thorner J. Structure and calcium-binding properties of Frq1, a novel calcium sensor in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Biochemistry. -2000. - T. 39, $N_{0} 40. - C. 12149-61$.

276. Ames J. B., Tanaka T., Stryer L., Ikura M. Portrait of a myristoyl switch protein // Curr Opin Struct Biol. – 1996. – T. 6, № 4. – C. 432-8.

277. Zhu Y., Yang S., Qi R., Zou Y., Ma B., Nussinov R., Zhang Q. Effects of the C-Terminal Tail on the Conformational Dynamics of Human Neuronal Calcium Sensor-1 Protein // J Phys Chem B. – 2015. – T. 119, № 44. – C. 14236-44.

278. Zhu Y., Ma B., Qi R., Nussinov R., Zhang Q. Temperature-Dependent Conformational Properties of Human Neuronal Calcium Sensor-1 Protein Revealed by All-Atom Simulations // J Phys Chem B. – 2016. – T. 120, № 14. – C. 3551-9.

279. Woll M. P., De Cotiis D. A., Bewley M. C., Tacelosky D. M., Levenson R., Flanagan J. M. Interaction between the D2 dopamine receptor and neuronal calcium sensor-1 analyzed by fluorescence anisotropy // Biochemistry. -2011. - T. 50, No 41. - C. 8780-91.

280. Williamson M. P. Many residues in cytochrome c populate alternative states under equilibrium conditions // Proteins. – 2003. – T. 53, № 3. – C. 731-9.

281. Chandra K., Sharma Y., Chary K. V. Characterization of low-energy excited states in the native state ensemble of non-myristoylated and myristoylated neuronal calcium sensor-1 // Biochim Biophys Acta. -2011. - T. 1814, No 2. - C. 334-44.

282. Zhu Y., Wu Y., Luo Y., Zou Y., Ma B., Zhang Q. R102Q mutation shifts the salt-bridge network and reduces the structural flexibility of human neuronal calcium sensor-1 protein // J Phys Chem B. -2014. - T. 118, No 46. - C. 13112-22.

283. Ames J. B., Lim S. Molecular structure and target recognition of neuronal calcium sensor proteins // Biochim Biophys Acta. – 2012. – T. 1820, № 8. – C. 1205-13.

284. Naqvi M. M., Heidarsson P. O., Otazo M. R., Mossa A., Kragelund B. B., Cecconi C. Single-molecule folding mechanisms of the apo- and Mg(2+)-bound states of human neuronal calcium sensor-1 // Biophys J. - 2015. - T. 109, No 1. - C. 113-23.

285. Heidarsson P. O., Otazo M. R., Bellucci L., Mossa A., Imparato A., Paci E., Corni S., Di Felice R., Kragelund B. B., Cecconi C. Single-molecule folding mechanism of an EF-hand neuronal calcium sensor // Structure. – 2013. – T. 21, № 10. – C. 1812-21.

286. Stigler J., Ziegler F., Gieseke A., Gebhardt J. C., Rief M. The complex folding network of single calmodulin molecules // Science. – 2011. – T. 334, № 6055. – C. 512-6.

287. Muralidhar D., Jobby M. K., Krishnan K., Annapurna V., Chary K. V., Jeromin A., Sharma Y. Equilibrium unfolding of neuronal calcium sensor-1: N-terminal myristoylation influences unfolding and reduces protein stiffening in the presence of calcium // J Biol Chem. – 2005. – T. 280, № 16. – C. 15569-78.

288. Jeromin A., Muralidhar D., Parameswaran M. N., Roder J., Fairwell T., Scarlata S., Dowal L., Mustafi S. M., Chary K. V., Sharma Y. N-terminal myristoylation regulates calcium-induced conformational changes in neuronal calcium sensor-1 // J Biol Chem. – 2004. – T. 279, № 26. – C. 27158-67.

289. Heidarsson P. O., Naqvi M. M., Otazo M. R., Mossa A., Kragelund B. B., Cecconi C. Direct single-molecule observation of calcium-dependent misfolding in human neuronal calcium sensor-1 // Proc Natl Acad Sci U S A. -2014. - T. 111, No 36. - C. 13069-74.

290. Huttner I. G., Strahl T., Osawa M., King D. S., Ames J. B., Thorner J. Molecular interactions of yeast frequenin (Frq1) with the phosphatidylinositol 4-kinase isoform, Pik1 // J Biol Chem. -2003. - T. 278, N_{2} 7. -C. 4862-74.

291. Aravind P., Chandra K., Reddy P. P., Jeromin A., Chary K. V., Sharma Y. Regulatory and structural EF-hand motifs of neuronal calcium sensor-1: Mg^{2+} modulates Ca^{2+} binding, Ca^{2+} -induced conformational changes, and equilibrium unfolding transitions // J Mol Biol. – 2008. – T. 376, No 4. – C. 1100-15.

292. Rajanikanth V., Sharma A. K., Rajyalakshmi M., Chandra K., Chary K. V., Sharma Y. Liaison between myristoylation and cryptic EF-hand motif confers Ca(2+) sensitivity to neuronal calcium sensor-1 // Biochemistry. – 2015. – T. 54, № 4. – C. 1111-22.

293. Chandra K., Ramakrishnan V., Sharma Y., Chary K. V. N-terminal myristoylation alters the calcium binding pathways in neuronal calcium sensor-1 // J Biol Inorg Chem. -2011. - T. 16, No 1. - C. 81-95.

294. Cox J. A., Durussel I., Comte M., Nef S., Nef P., Lenz S. E., Gundelfinger E. D. Cation binding and conformational changes in VILIP and NCS-1, two neuron-specific calcium-binding proteins // J Biol Chem. – 1994. – T. 269, № 52. – C. 32807-13.

295. Grubbs R. D. Intracellular magnesium and magnesium buffering // Biometals. – 2002. – T. 15, № 3. – C. 251-9.

296. Jakobsson E., Arguello-Miranda O., Chiu S. W., Fazal Z., Kruczek J., Nunez-Corrales S., Pandit S., Pritchet L. Towards a Unified Understanding of Lithium Action in Basic Biology and its Significance for Applied Biology // J Membr Biol. – 2017. – T. 250, № 6. – C. 587-604.

297. Gorkhali R., Huang K., Kirberger M., Yang J. J. Defining potential roles of Pb(2+) in neurotoxicity from a calciomics approach // Metallomics. -2016. - T. 8, No 6. -C. 563-78.

298. Permyakov S. E., Cherskaya A. M., Wasserman L. A., Khokhlova T. I., Senin, II, Zargarov A. A., Zinchenko D. V., Zernii E. Y., Lipkin V. M., Philippov P. P., Uversky V. N., Permyakov E. A. Recoverin is a zinc-binding protein // J Proteome Res. – 2003. – T. 2, № 1. – C. 51-7.

299. Strahl T., Huttner I. G., Lusin J. D., Osawa M., King D., Thorner J., Ames J. B. Structural insights into activation of phosphatidylinositol 4-kinase (Pik1) by yeast frequenin (Frq1) // J Biol Chem. – 2007. – T. 282, № 42. – C. 30949-59.

300. Baksheeva V. E., Nazipova A. A., Zinchenko D. V., Serebryakova M. V., Senin, II, Permyakov S. E., Philippov P. P., Li Y., Zamyatnin A. A., Zernii E. Y., Aliev G. Ca^{2+} -myristoyl switch in neuronal calcium sensor-1: a role of C-terminal segment // CNS Neurol Disord Drug Targets. – 2015. – T. 14, No 4. – C. 437-51.

301. Ames J. B., Levay K., Wingard J. N., Lusin J. D., Slepak V. Z. Structural basis for calcium-induced inhibition of rhodopsin kinase by recoverin // J Biol Chem. – 2006. – T. 281, № 48. – C. 37237-45.

302. Pioletti M., Findeisen F., Hura G. L., Minor D. L., Jr. Three-dimensional structure of the KChIP1-Kv4.3 T1 complex reveals a cross-shaped octamer // Nat Struct Mol Biol. – 2006. – T. 13, № 11. – C. 987-95.

303. Nguyen L. D., Petri E. T., Huynh L. K., Ehrlich B. E. Characterization of NCS1-InsP3R1 interaction and its functional significance // J Biol Chem. – 2019. – T. 294, № 49. – C. 18923-18933.

304. Bellucci L., Corni S., Di Felice R., Paci E. The structure of neuronal calcium sensor-1 in solution revealed by molecular dynamics simulations // PLoS One. – 2013. – T. 8, № 9. – C. e74383.

305. Brumback A. C., Ellwood I. T., Kjaerby C., Iafrati J., Robinson S., Lee A. T., Patel T., Nagaraj S., Davatolhagh F., Sohal V. S. Identifying specific prefrontal neurons that contribute to autism-associated abnormalities in physiology and social behavior // Mol Psychiatry. – 2018. – T. 23, № 10. – C. 2078-2089.

306. O'Callaghan D. W., Burgoyne R. D. Identification of residues that determine the absence of a Ca(2+)/myristoyl switch in neuronal calcium sensor-1 // J Biol Chem. – 2004. – T. 279, № 14. – C. 14347-54.

307. O'Callaghan D. W., Hasdemir B., Leighton M., Burgoyne R. D. Residues within the myristoylation motif determine intracellular targeting of the neuronal Ca^{2+} sensor protein KChIP1 to post-ER transport vesicles and traffic of Kv4 K⁺ channels // J Cell Sci. – 2003. – T. 116, No Pt 23. – C. 4833-45.

308. O'Callaghan D. W., Burgoyne R. D. Role of myristoylation in the intracellular targeting of neuronal calcium sensor (NCS) proteins // Biochem Soc Trans. – 2003. – T. 31, № Pt 5. – C. 963-5.

309. Valentine K. G., Mesleh M. F., Opella S. J., Ikura M., Ames J. B. Structure, topology, and dynamics of myristoylated recoverin bound to phospholipid bilayers // Biochemistry. – 2003. – T. 42, № 21. – C. 6333-40.

310. O'Callaghan D. W., Haynes L. P., Burgoyne R. D. High-affinity interaction of the N-terminal myristoylation motif of the neuronal calcium sensor protein hippocalcin with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate // Biochem J. – 2005. – T. 391, \mathbb{N} Pt 2. – C. 231-8.

311. De Cotiis D. A., Woll M. P., Fox T. E., Hill R. B., Levenson R., Flanagan J. M. Optimized expression and purification of myristoylated human neuronal calcium sensor 1 in E. coli // Protein Expr Purif. – 2008. – T. 61, № 2. – C. 103-12.

312. Salaun C., James D. J., Chamberlain L. H. Lipid rafts and the regulation of exocytosis // Traffic. – 2004. – T. 5, N_{2} 4. – C. 255-64.

313. Taverna E., Saba E., Linetti A., Longhi R., Jeromin A., Righi M., Clementi F., Rosa P. Localization of synaptic proteins involved in neurosecretion in different membrane microdomains // J Neurochem. – 2007. – T. 100, № 3. – C. 664-77.

314. Zernii E. Y., Nazipova A. A., Gancharova O. S., Kazakov A. S., Serebryakova M. V., Zinchenko D. V., Tikhomirova N. K., Senin, II, Philippov P. P., Permyakov E. A., Permyakov S. E. Light-induced disulfide dimerization of recoverin under ex vivo and in vivo conditions // Free Radic Biol Med. – 2015. – T. 83. – C. 283-95.

315. Liebl M. P., Kaya A. M., Tenzer S., Mittenzwei R., Koziollek-Drechsler I., Schild H., Moosmann B., Behl C., Clement A. M. Dimerization of visinin-like protein 1 is regulated by oxidative stress and calcium and is a pathological hallmark of amyotrophic lateral sclerosis // Free Radic Biol Med. – 2014. – T. 72. – C. 41-54.

316. Permyakov S. E., Nazipova A. A., Denesyuk A. I., Bakunts A. G., Zinchenko D. V., Lipkin V. M., Uversky V. N., Permyakov E. A. Recoverin as a redox-sensitive protein // J Proteome Res. -2007. - T. 6, No 5. - C. 1855-63.

317. Matz M., Shagin D., Bogdanova E., Britanova O., Lukyanov S., Diatchenko L., Chenchik A. Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR // Nucleic Acids Res. -1999. - T. 27, No 6. -C. 1558-60.

318. Bryksin A., Matsumura I. Overlap extension PCR cloning // Methods Mol Biol. – 2013. – T. 1073. – C. 31-42.

319. Senin, II, Zargarov A. A., Alekseev A. M., Gorodovikova E. N., Lipkin V. M., Philippov P. P. N-myristoylation of recoverin enhances its efficiency as an inhibitor of rhodopsin kinase // FEBS Lett. – 1995. – T. 376, № 1-2. – C. 87-90.

320. Komolov K. E., Senin, II, Kovaleva N. A., Christoph M. P., Churumova V. A., Grigoriev, II, Akhtar M., Philippov P. P., Koch K. W. Mechanism of rhodopsin kinase regulation by recoverin // J Neurochem. -2009. - T. 110, No 1. - C. 72-9.

321. Ranaghan M. J., Kumar R. P., Chakrabarti K. S., Buosi V., Kern D., Oprian D. D. A highly conserved cysteine of neuronal calcium-sensing proteins controls cooperative binding of Ca^{2+} to recoverin // J Biol Chem. – 2013. – T. 288, No 50. – C. 36160-7.

322. Gurevich V. V., Benovic J. L. Arrestin: mutagenesis, expression, purification, and functional characterization // Methods Enzymol. – 2000. – T. 315. – C. 422-37.

323. Vladimirov V. I., Baksheeva V. E., Mikhailova I. V., Ismailov R. G., Litus E. A., Tikhomirova N. K., Nazipova A. A., Permyakov S. E., Zernii E. Y., Zinchenko D. V. A Novel Approach to Bacterial Expression and Purification of Myristoylated Forms of Neuronal Calcium Sensor Proteins // Biomolecules. – 2020. – T. 10, № 7.

324. Duronio R. J., Jackson-Machelski E., Heuckeroth R. O., Olins P. O., Devine C. S., Yonemoto W., Slice L. W., Taylor S. S., Gordon J. I. Protein N-myristoylation in Escherichia coli: reconstitution of a eukaryotic protein modification in bacteria // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1990. – T. 87, № 4. – C. 1506-10.

325. Kazakov A. S., Sokolov A. S., Vologzhannikova A. A., Permyakova M. E., Khorn P. A., Ismailov R. G., Denessiouk K. A., Denesyuk A. I., Rastrygina V. A., Baksheeva V. E., Zernii E. Y., Zinchenko D. V., Glazatov V. V., Uversky V. N., Mirzabekov T. A., Permyakov E. A., Permyakov S. E. Interleukin-11 binds specific EF-hand proteins via their conserved structural motifs // J Biomol Struct Dyn. – 2017. – T. 35, N 1. – C. 78-91.

326. De Bessa T., Breuzard G., Allegro D., Devred F., Peyrot V., Barbier P. Tau Interaction with Tubulin and Microtubules: From Purified Proteins to Cells // Methods Mol Biol. – 2017. – T. 1523. – C. 61-85. 327. Zernii E. Y., Tikhomirova N. K., Philippov P. P., Senin, II. Detection of annexin IV in bovine

retinal rods // Biochemistry (Mosc). – 2003. – T. 68, № 1. – C. 129-60. 328. Banker M. J., Clark T. H., Williams J. A. Development and validation of a 96-well equilibrium dialysis apparatus for measuring plasma protein binding // J Pharm Sci. – 2003. – T. 92, № 5. – C. 967-74.

329. Tsvetkov P. O., Barbier P., Breuzard G., Peyrot V., Devred F. Microtubule-associated proteins and tubulin interaction by isothermal titration calorimetry // Methods Cell Biol. – 2013. – T. 115. – C. 283-302.

330. Tsvetkov P. O., Makarov A. A., Malesinski S., Peyrot V., Devred F. New insights into taumicrotubules interaction revealed by isothermal titration calorimetry // Biochimie. -2012. - T. 94, No 3. - C. 916-9.

331. Permyakov S. E., Cherskaya A. M., Senin, II, Zargarov A. A., Shulga-Morskoy S. V., Alekseev A. M., Zinchenko D. V., Lipkin V. M., Philippov P. P., Uversky V. N., Permyakov E. A. Effects of mutations in the calcium-binding sites of recoverin on its calcium affinity: evidence for successive filling of the calcium binding sites // Protein Eng. – 2000. – T. 13, $N_{\rm P}$ 11. – C. 783-90.

332. Farris F. J., Weber G., Chiang C. C., Paul I. C. Preparation, crystalline structure, and spectral properties of the fluorescent probe 4,4'-bis-1-phenylamino-8-naphthalenesulfonate // Journal of the American Chemical Society. – 1978. – T. 100, № 14. – C. 4469-4474.

333. Burstein E. A., Emelyanenko V. I. Log - normal description of fluorescence spectra of organic fluorophores // Photochemistry and Photobiology. – 1996. – T. 64, № 2. – C. 316-320.

334. Permyakov S. E., Zernii E. Y., Knyazeva E. L., Denesyuk A. I., Nazipova A. A., Kolpakova T. V., Zinchenko D. V., Philippov P. P., Permyakov E. A., Senin, II. Oxidation mimicking substitution of conservative cysteine in recoverin suppresses its membrane association // Amino Acids. – 2012. – T. 42, $N_{\rm P} 4. - C. 1435-42.$

335. Permyakov E. A., Burstein E. A. Some aspects of studies of thermal transitions in proteins by means of their intrinsic fluorescence // Biophys Chem. – 1984. – T. 19, № 3. – C. 265-71.

336. Sreerama N., Woody R. W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set // Anal Biochem. -2000. - T. 287, No 2. - C. 252-60.

337. Grigoriev, II, Senin, II, Tikhomirova N. K., Komolov K. E., Permyakov S. E., Zernii E. Y., Koch K. W., Philippov P. P. Synergetic effect of recoverin and calmodulin on regulation of rhodopsin kinase // Front Mol Neurosci. – 2012. – T. 5. – C. 28.

338. Machaidze G. G., Mikeladze D. Different effects of lectins on the ligand binding of the NMDA receptors and sigma sites in rat brain hippocampus synaptic membranes // Neurochem Res. -2001. - T. 26, No 5. - C. 457-62.

339. Senin, II, Fischer T., Komolov K. E., Zinchenko D. V., Philippov P. P., Koch K. W. Ca^{2+} -myristoyl switch in the neuronal calcium sensor recoverin requires different functions of Ca^{2+} -binding sites // J Biol Chem. – 2002. – T. 277, No 52. – C. 50365-72.

340. Perevoshchikova I. V., Zorov D. B., Antonenko Y. N. Peak intensity analysis as a method for estimation of fluorescent probe binding to artificial and natural nanoparticles: tetramethylrhodamine uptake by isolated mitochondria // Biochim Biophys Acta. – 2008. – T. 1778, № 10. – C. 2182-90.

341. Hess S. T., Huang S., Heikal A. A., Webb W. W. Biological and chemical applications of fluorescence correlation spectroscopy: a review // Biochemistry. – 2002. – T. 41, № 3. – C. 697-705.

342. Petrasek Z., Schwille P. Precise measurement of diffusion coefficients using scanning fluorescence correlation spectroscopy // Biophys J. – 2008. – T. 94, № 4. – C. 1437-48.

343. Antonenko Y. N., Lapashina A. S., Kotova E. A., Ramonova A. A., Moisenovich M. M., Agapov, II. Application of Peak Intensity Analysis to Measurements of Protein Binding to Lipid Vesicles and Erythrocytes Using Fluorescence Correlation Spectroscopy: Dependence on Particle Size // J Membr Biol. -2017. - T. 250, No 1. - C. 77-87.

344. Serowy S., Saparov S. M., Antonenko Y. N., Kozlovsky W., Hagen V., Pohl P. Structural proton diffusion along lipid bilayers // Biophys J. – 2003. – T. 84, № 2 Pt 1. – C. 1031-7.

345. National Research Council Committee for the Update of the Guide for the C., Use of Laboratory A. The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health // Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. – Washington (DC): National Academies Press (US) Copyright © 2011, National Academy of Sciences., 2011.

346. Milam A. H., Dacey D. M., Dizhoor A. M. Recoverin immunoreactivity in mammalian cone bipolar cells // Vis Neurosci. – 1993. – T. 10, № 1. – C. 1-12.

347. Hanwell M. D., Curtis D. E., Lonie D. C., Vandermeersch T., Zurek E., Hutchison G. R. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform // J Cheminform. -2012. - T. 4, No 1. - C. 17.

348. Laitaoja M., Valjakka J., Jänis J. Zinc Coordination Spheres in Protein Structures // Inorganic Chemistry. – 2013. – T. 52, № 19. – C. 10983-10991.

349. Lindorff-Larsen K., Piana S., Palmo K., Maragakis P., Klepeis J. L., Dror R. O., Shaw D. E. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field // Proteins. -2010. - T. 78, No 8. - C. 1950-8.

350. Gaus M., Cui Q., Elstner M. DFTB3: Extension of the self-consistent-charge density-functional tight-binding method (SCC-DFTB) // J Chem Theory Comput. – 2012. – T. 7, № 4. – C. 931-948.

351. Grimme S., Antony J., Ehrlich S., Krieg H. A consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H-Pu // J Chem Phys. – 2010. – T. 132, № 15. – C. 154104.

352. Vreven T., Byun K. S., Komaromi I., Dapprich S., Montgomery J. A., Morokuma K., Frisch M. J. Combining Quantum Mechanics Methods with Molecular Mechanics Methods in ONIOM // J Chem Theory Comput. -2006. - T. 2, $N_{2} 3. - C. 815-26$.

353. Bussi G., Donadio D., Parrinello M. Canonical sampling through velocity rescaling // J Chem Phys. – 2007. – T. 126, № 1. – C. 014101.

354. Abraham M. J., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith J. C., Hess B., Lindahl E. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers // SoftwareX. -2015. - T. 1-2. - C. 19-25.

355. Kubar T., Welke K., Groenhof G. New QM/MM implementation of the DFTB3 method in the gromacs package // J Comput Chem. – 2015. – T. 36, № 26. – C. 1978-89.

356. Fisher J. R., Sharma Y., Iuliano S., Piccioti R. A., Krylov D., Hurley J., Roder J., Jeromin A. Purification of myristoylated and nonmyristoylated neuronal calcium sensor-1 using single-step hydrophobic interaction chromatography // Protein Expr Purif. – 2000. – T. 20, № 1. – C. 66-72.

357. Maurer-Stroh S., Eisenhaber B., Eisenhaber F. N-terminal N-myristoylation of proteins: refinement of the sequence motif and its taxon-specific differences // J Mol Biol. – 2002. – T. 317, № 4. – C. 523-40.

358. Rocque W. J., McWherter C. A., Wood D. C., Gordon J. I. A comparative analysis of the kinetic mechanism and peptide substrate specificity of human and *Saccharomyces cerevisiae* myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferase // J Biol Chem. – 1993. – T. 268, № 14. – C. 9964-71.

359. Zernii E. Y., Nazipova A. A., Nemashkalova E. L., Kazakov A. S., Gancharova O. S., Serebryakova M. V., Tikhomirova N. K., Baksheeva V. E., Vladimirov V. I., Zinchenko D. V., Philippov P. P., Senin, II, Permyakov S. E. Light-Induced Thiol Oxidation of Recoverin Affects Rhodopsin Desensitization // Front Mol Neurosci. – 2018. – T. 11. – C. 474.

360. Krishnan A., Venkataraman V., Fik-Rymarkiewicz E., Duda T., Sharma R. K. Structural, biochemical, and functional characterization of the calcium sensor neurocalcin delta in the inner retinal neurons and its linkage with the rod outer segment membrane guanylate cyclase transduction system // Biochemistry. -2004. - T. 43, N 10. - C. 2708-23.

361. Tsvetkov P. O., Roman A. Y., Baksheeva V. E., Nazipova A. A., Shevelyova M. P., Vladimirov V. I., Buyanova M. F., Zinchenko D. V., Zamyatnin A. A., Jr., Devred F., Golovin A. V., Permyakov S. E., Zernii E. Y. Functional Status of Neuronal Calcium Sensor-1 Is Modulated by Zinc Binding // Front Mol Neurosci. – 2018. – T. 11. – C. 459.

362. Zozulya S., Ladant D., Stryer L. Expression and characterization of calcium-myristoyl switch proteins // Methods Enzymol. – 1995. – T. 250. – C. 383-93.

363. Martin D. D., Beauchamp E., Berthiaume L. G. Post-translational myristoylation: Fat matters in cellular life and death // Biochimie. – 2011. – T. 93, № 1. – C. 18-31.

364. Olive J. The structural organization of mammalian retinal disc membrane // Int Rev Cytol. – 1980. – T. 64. – C. 107-69.

365. Vladimirov V. I., Zernii E. Y., Baksheeva V. E., Wimberg H., Kazakov A. S., Tikhomirova N. K., Nemashkalova E. L., Mitkevich V. A., Zamyatnin A. A., Jr., Lipkin V. M., Philippov P. P., Permyakov S. E., Senin, II, Koch K. W., Zinchenko D. V. Photoreceptor calcium sensor proteins in detergent-resistant membrane rafts are regulated via binding to caveolin-1 // Cell Calcium. – 2018. – T. 73. – C. 55-69.

366. Wells K., Farooqui A. A., Liss L., Horrocks L. A. Neural membrane phospholipids in Alzheimer disease // Neurochem Res. – 1995. – T. 20, № 11. – C. 1329-33.

367. Boesze-Battaglia K., Albert A. D. Phospholipid distribution among bovine rod outer segment plasma membrane and disk membranes // Exp Eye Res. – 1992. – T. 54, № 5. – C. 821-3.

368. O'Callaghan D. W., Ivings L., Weiss J. L., Ashby M. C., Tepikin A. V., Burgoyne R. D. Differential use of myristoyl groups on neuronal calcium sensor proteins as a determinant of spatio-temporal aspects of Ca^{2+} signal transduction // J Biol Chem. – 2002. – T. 277, No 16. – C. 14227-37.

369. Stace C. L., Ktistakis N. T. Phosphatidic acid- and phosphatidylserine-binding proteins // Biochim Biophys Acta. – 2006. – T. 1761, № 8. – C. 913-26.

370. Yagisawa H., Sakuma K., Paterson H. F., Cheung R., Allen V., Hirata H., Watanabe Y., Hirata M., Williams R. L., Katan M. Replacements of single basic amino acids in the pleckstrin homology domain of phospholipase C-delta1 alter the ligand binding, phospholipase activity, and interaction with the plasma membrane // J Biol Chem. – 1998. – T. 273, $N_{\rm P}$ 1. – C. 417-24.

371. Hurley J. H., Meyer T. Subcellular targeting by membrane lipids // Curr Opin Cell Biol. – 2001. – T. 13, № 2. – C. 146-52.

372. Raghu P., Joseph A., Krishnan H., Singh P., Saha S. Phosphoinositides: Regulators of Nervous System Function in Health and Disease // Front Mol Neurosci. – 2019. – T. 12. – C. 208.

373. Gaidarov I., Smith M. E., Domin J., Keen J. H. The class II phosphoinositide 3-kinase C2alpha is activated by clathrin and regulates clathrin-mediated membrane trafficking // Mol Cell. – 2001. – T. 7, N 2. – C. 443-9.

374. Odorizzi G., Babst M., Emr S. D. Phosphoinositide signaling and the regulation of membrane trafficking in yeast // Trends Biochem Sci. – 2000. – T. 25, № 5. – C. 229-35.

375. Noda T., Matsunaga K., Taguchi-Atarashi N., Yoshimori T. Regulation of membrane biogenesis in autophagy via PI3P dynamics // Semin Cell Dev Biol. – 2010. – T. 21, № 7. – C. 671-6.

376. Morel E., Chamoun Z., Lasiecka Z. M., Chan R. B., Williamson R. L., Vetanovetz C., Dall'Armi C., Simoes S., Point Du Jour K. S., McCabe B. D., Small S. A., Di Paolo G. Phosphatidylinositol-3-phosphate regulates sorting and processing of amyloid precursor protein through the endosomal system // Nat Commun. – 2013. – T. 4. – C. 2250.

377. Ivanovic I., Allen D. T., Dighe R., Le Y. Z., Anderson R. E., Rajala R. V. Phosphoinositide 3-kinase signaling in retinal rod photoreceptors // Invest Ophthalmol Vis Sci. – 2011. – T. 52, N $_{2}$ 9. – C. 6355-62.

378. Chuang J. Z., Zhao Y., Sung C. H. SARA-regulated vesicular targeting underlies formation of the light-sensing organelle in mammalian rods // Cell. – 2007. – T. 130, № 3. – C. 535-47.

379. Guo X., Ghalayini A. J., Chen H., Anderson R. E. Phosphatidylinositol 3-kinase in bovine photoreceptor rod outer segments // Invest Ophthalmol Vis Sci. – 1997. – T. 38, № 9. – C. 1873-82.

380. Palczewski K., Buczylko J., Kaplan M. W., Polans A. S., Crabb J. W. Mechanism of rhodopsin kinase activation // J Biol Chem. – 1991. – T. 266, № 20. – C. 12949-55.

381. Calvez P., Schmidt T. F., Cantin L., Klinker K., Salesse C. Phosphatidylserine Allows Observation of the Calcium-Myristoyl Switch of Recoverin and Its Preferential Binding // J Am Chem Soc. – 2016. – T. 138, N 41. – C. 13533-13540.

382. Lemmon M. A. Phosphoinositide recognition domains // Traffic. – 2003. – T. 4, № 4. – C. 201-13.

383. Gonzalez W. G., Miksovska J. Application of ANS fluorescent probes to identify hydrophobic sites on the surface of DREAM // Biochim Biophys Acta. – 2014. – T. 1844, № 9. – C. 1472-80.

384. Hawe A., Sutter M., Jiskoot W. Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization // Pharm Res. -2008. - T. 25, No 7. - C. 1487-99.

385. Permiakov S. E., Uverskii V. N., Cherskaia A. M., Shul'ga-Morskoi S. V., Zinchenko D. V., Alekseev A. M., Zernii E., Zargarov A. A., Senin, II, Lipkin V. M., Filippov P. P., Permiakov E. A. [Point amino acid substitutions in Ca²⁺-binding centers of recoverin. III. Mutant with the fourth reconstructed Ca²⁺-binding site] // Bioorg Khim. – 2000. – T. 26, № 4. – C. 285-9.

386. Flaherty K. M., Zozulya S., Stryer L., McKay D. B. Three-dimensional structure of recoverin, a calcium sensor in vision // Cell. – 1993. – T. 75, № 4. – C. 709-16.

387. Ames J. B., Porumb T., Tanaka T., Ikura M., Stryer L. Amino-terminal myristoylation induces cooperative calcium binding to recoverin // J Biol Chem. – 1995. – T. 270, № 9. – C. 4526-33.

388. Marino V., Riva M., Zamboni D., Koch K. W., Dell'Orco D. Bringing the Ca(2+) sensitivity of myristoylated recoverin into the physiological range // Open Biol. -2021. - T. 11, No 1. - C. 200346.

389. Senin, II, Churumova V. A., Philippov P. P., Koch K. W. Membrane binding of the neuronal calcium sensor recoverin - modulatory role of the charged carboxy-terminus // BMC Biochem. -2007. -T. 8. -C. 24.

390. Ozawa T., Fukuda M., Nara M., Nakamura A., Komine Y., Kohama K., Umezawa Y. How can Ca^{2+} selectively activate recoverin in the presence of Mg^{2+} ? Surface plasmon resonance and FT-IR spectroscopic studies // Biochemistry. – 2000. – T. 39, No 47. – C. 14495-503.

391. Ray S., Zozulya S., Niemi G. A., Flaherty K. M., Brolley D., Dizhoor A. M., McKay D. B., Hurley J., Stryer L. Cloning, expression, and crystallization of recoverin, a calcium sensor in vision // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1992. – T. 89, № 13. – C. 5705-9.

392. Colvin R. A., Bush A. I., Volitakis I., Fontaine C. P., Thomas D., Kikuchi K., Holmes W. R. Insights into Zn^{2+} homeostasis in neurons from experimental and modeling studies // Am J Physiol Cell Physiol. – 2008. – T. 294, No 3. – C. C726-42.

393. Frederickson C. J., Koh J. Y., Bush A. I. The neurobiology of zinc in health and disease // Nat Rev Neurosci. -2005. - T. 6, No 6. - C. 449-62.

394. Krezel A., Maret W. Zinc-buffering capacity of a eukaryotic cell at physiological pZn // J Biol Inorg Chem. – 2006. – T. 11, № 8. – C. 1049-62.

395. Ugarte M., Osborne N. N. Zinc in the retina // Prog Neurobiol. – 2001. – T. 64, № 3. – C. 219-49.

396. Ugarte M., Osborne N. N. Recent advances in the understanding of the role of zinc in ocular tissues // Metallomics. – 2014. – T. 6, № 2. – C. 189-200.

397. Ugarte M., Grime G. W., Lord G., Geraki K., Collingwood J. F., Finnegan M. E., Farnfield H., Merchant M., Bailey M. J., Ward N. I., Foster P. J., Bishop P. N., Osborne N. N. Concentration of various trace elements in the rat retina and their distribution in different structures // Metallomics. – 2012. – T. 4, № 12. – C. 1245-54.

398. Sheline C. T., Zhou Y., Bai S. Light-induced photoreceptor and RPE degeneration involve zinc toxicity and are attenuated by pyruvate, nicotinamide, or cyclic light // Mol Vis. – 2010. – T. 16. – C. 2639-52.

399. Garnier C., Devred F., Byrne D., Puppo R., Roman A. Y., Malesinski S., Golovin A. V., Lebrun R., Ninkina N. N., Tsvetkov P. O. Zinc binding to RNA recognition motif of TDP-43 induces the formation of amyloid-like aggregates // Sci Rep. – 2017. – T. 7, № 1. – C. 6812.

400. Sheline C. T., Cai A. L., Zhu J., Shi C. Serum or target deprivation-induced neuronal death causes oxidative neuronal accumulation of Zn^{2+} and loss of NAD^+ // Eur J Neurosci. – 2010. – T. 32, No 6. – C. 894-904.

401. Suh S. W., Hamby A. M., Gum E. T., Shin B. S., Won S. J., Sheline C. T., Chan P. H., Swanson R. A. Sequential release of nitric oxide, zinc, and superoxide in hypoglycemic neuronal death // J Cereb Blood Flow Metab. – 2008. – T. 28, № 10. – C. 1697-706.

402. Yoo M. H., Lee J. Y., Lee S. E., Koh J. Y., Yoon Y. H. Protection by pyruvate of rat retinal cells against zinc toxicity in vitro, and pressure-induced ischemia in vivo // Invest Ophthalmol Vis Sci. – 2004. – T. 45, N_{0} 5. – C. 1523-30.

403. Bossy-Wetzel E., Talantova M. V., Lee W. D., Scholzke M. N., Harrop A., Mathews E., Gotz T., Han J., Ellisman M. H., Perkins G. A., Lipton S. A. Crosstalk between nitric oxide and zinc pathways to neuronal cell death involving mitochondrial dysfunction and p38-activated K⁺ channels // Neuron. – 2004. – T. 41, No 3. – C. 351-65.

404. Cuajungco M. P., Faget K. Y. Zinc takes the center stage: its paradoxical role in Alzheimer's disease // Brain Res Brain Res Rev. – 2003. – T. 41, № 1. – C. 44-56.

405. Manev H., Kharlamov E., Uz T., Mason R. P., Cagnoli C. M. Characterization of zinc-induced neuronal death in primary cultures of rat cerebellar granule cells // Exp Neurol. – 1997. – T. 146, No 1. – C. 171-8.

406. Lyubartseva G., Lovell M. A. A potential role for zinc alterations in the pathogenesis of Alzheimer's disease // Biofactors. – 2012. – T. 38, № 2. – C. 98-106.

407. Frederickson C. J., Bush A. I. Synaptically released zinc: physiological functions and pathological effects // Biometals. – 2001. – T. 14, № 3-4. – C. 353-66.

408. Wu S. M., Qiao X., Noebels J. L., Yang X. L. Localization and modulatory actions of zinc in vertebrate retina // Vision Res. – 1993. – T. 33, № 18. – C. 2611-6.

409. Kiedrowski L. Cytosolic acidification and intracellular zinc release in hippocampal neurons // J Neurochem. – 2012. – T. 121, № 3. – C. 438-50.

410. Organisciak D. T., Vaughan D. K. Retinal light damage: mechanisms and protection // Prog Retin Eye Res. – 2010. – T. 29, № 2. – C. 113-34.

411. Stojanovic A., Stitham J., Hwa J. Critical role of transmembrane segment zinc binding in the structure and function of rhodopsin // J Biol Chem. – 2004. – T. 279, № 34. – C. 35932-41.

412. Hamm H. E., Bownds M. D. Protein complement of rod outer segments of frog retina // Biochemistry. – 1986. – T. 25, № 16. – C. 4512-23.

413. Miao X., Sun W., Miao L., Fu Y., Wang Y., Su G., Liu Q. Zinc and diabetic retinopathy // J Diabetes Res. – 2013. – T. 2013. – C. 425854.

414. Kaminska A., Romano G. L., Rejdak R., Zweifel S., Fiedorowicz M., Rejdak M., Bajka A., Amato R., Bucolo C., Avitabile T., Drago F., Toro M. D. Influence of Trace Elements on Neurodegenerative Diseases of The Eye-The Glaucoma Model // Int J Mol Sci. – 2021. – T. 22, № 9.

415. Maret W., Li Y. Coordination dynamics of zinc in proteins // Chem Rev. – 2009. – T. 109, No 10. – C. 4682-707.

416. Maret W. Zinc coordination environments in proteins as redox sensors and signal transducers // Antioxid Redox Signal. – 2006. – T. 8, № 9-10. – C. 1419-41.

417. Wang C. K., Simon A., Jessen C. M., Oliveira C. L., Mack L., Braunewell K. H., Ames J. B., Pedersen J. S., Hofmann A. Divalent cations and redox conditions regulate the molecular structure and function of visinin-like protein-1 // PLoS One. – 2011. – T. 6, N_{2} 11. – C. e26793.

418. Zernii E. Y., Baksheeva V. E., Iomdina E. N., Averina O. A., Permyakov S. E., Philippov P. P., Zamyatnin A. A., Senin, II. Rabbit Models of Ocular Diseases: New Relevance for Classical Approaches // CNS Neurol Disord Drug Targets. – 2016. – T. 15, № 3. – C. 267-91.

419. Saenz-de-Viteri M., Heras-Mulero H., Fernandez-Robredo P., Recalde S., Hernandez M., Reiter N., Moreno-Orduna M., Garcia-Layana A. Oxidative stress and histological changes in a model of retinal phototoxicity in rabbits // Oxid Med Cell Longev. – 2014. – T. 2014. – C. 637137.

420. Xie Z., Wu X., Gong Y., Song Y., Qiu Q., Li C. Intraperitoneal injection of Ginkgo biloba extract enhances antioxidation ability of retina and protects photoreceptors after light-induced retinal damage in rats // Curr Eye Res. -2007. - T. 32, No 5. - C. 471-9.

421. Davies M. J. Protein oxidation and peroxidation // Biochem J. -2016. -T. 473, N_{2} 7. -C. 805-25. 422. Paulsen C. E., Carroll K. S. Cysteine-mediated redox signaling: chemistry, biology, and tools for discovery // Chem Rev. -2013. -T. 113, N_{2} 7. -C. 4633-79.

423. Donovan M., Carmody R. J., Cotter T. G. Light-induced photoreceptor apoptosis in vivo requires neuronal nitric-oxide synthase and guanylate cyclase activity and is caspase-3-independent // J Biol Chem. -2001. - T. 276, No 25. - C. 23000-8.

424. Di Polo A., Farber D. B. Rod photoreceptor-specific gene expression in human retinoblastoma cells // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1995. – T. 92, № 9. – C. 4016-20.

425. Chen Y., McMillan-Ward E., Kong J., Israels S. J., Gibson S. B. Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells // Cell Death Differ. – 2008. – T. 15, N 1. – C. 171-82.

426. Olzmann J. A., Li L., Chin L. S. Aggresome formation and neurodegenerative diseases: therapeutic implications // Curr Med Chem. – 2008. – T. 15, № 1. – C. 47-60.

427. Saliba R. S., Munro P. M., Luthert P. J., Cheetham M. E. The cellular fate of mutant rhodopsin: quality control, degradation and aggresome formation // J Cell Sci. – 2002. – T. 115, № Pt 14. – C. 2907-18.

428. Wang T., Chen J. Induction of the unfolded protein response by constitutive G-protein signaling in rod photoreceptor cells // J Biol Chem. – 2014. – T. 289, № 42. – C. 29310-21.

429. Wang A. L., Lukas T. J., Yuan M., Du N., Tso M. O., Neufeld A. H. Autophagy and exosomes in the aged retinal pigment epithelium: possible relevance to drusen formation and age-related macular degeneration // PLoS One. -2009. - T. 4, No 1. - C. e4160.