

Секция «Биоинженерия и биоинформатика»

Исследование регуляторной специфичности нейронального кальциевого сенсора 1 (NCS1) фоторецепторной клетки.

Бакшеева В.Е.¹, Зерный Е.Ю.²

*1 - Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики, 2 - МГУ - Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия
E-mail: vibaksheeva@gmail.com*

Множество процессов, связанных с жизнедеятельностью нейронов и их функциональной активностью, регулируются сигналами ионов кальция. Разнообразие ответов на эти сигналы обеспечивается за счет действия нейрональных кальциевых сенсоров (НКС) – семейства внутриклеточных Ca^{2+} -связывающих белков, высокоспецифичных для нервной ткани. Белки семейства НКС обладают сходством структурной организации и нередко колокализуются в нейронах одного и того же типа. При этом регуляторное действие каждого из НКС характеризуется специфичностью в отношении определенных сигнальных партнеров, среди которых различные рецепторы, эффекторные ферменты, а также ряд других белков [1]. Примером сигнальной системы, Ca^{2+} -зависимая регуляция которой осуществляется белками НКС, является передача светового сигнала в фоторецепторных клетках сетчатки глаза. Так, внутренние сегменты и синаптические окончания палочек сетчатки содержат НКС рековерин и белки активаторы гуанилатциклазы, которые являются специфичными для данного типа клеток и обладают способностью регулировать строго определенные мишени в рамках каскада фототрансдукции. В то же время, в фоторецепторах обнаружен еще один НКС, NCS1, являющийся родоначальником семейства и широко распространенный в клетках центральной нервной системы [2]. Функция NCS1 в фоторецепторных клетках сетчатки до недавнего времени оставалась неустановленной. С учетом этих обстоятельств основной целью настоящей работы является поиск мишеней NCS1 в фоторецепторной клетке, а также исследование механизма регуляторной активности фоторецепторного NCS1 с учетом его совместной локализации с другими белками семейства. В результате проведенных исследований получены следующие результаты. На основе тотальной РНК из препарата мозга *Bos taurus* получена кДНК, соответствующая ранее охарактеризованному гену NCS1. Впервые обнаружена дополнительная природная мРНК, соответствующая мутантной форме NCS1, которая содержит замену остатка лизина-9 на остаток глутаминовой кислоты. Проведено клонирование обоих вариантов гена NCS1 в экспрессионный вектор для получения суперпродуктов белка в клетках *Escherichia coli*. С помощью совместной экспрессии полученных генов с геном N-миристоилтрансферазы 1 *Saccharomyces cerevisiae* и последующей хроматографической очистки получены гомогенные препараты NCS1 дикого типа и его мутанта К9Е. Методом аналитической высокоэффективной жидкостной хроматографии показано, что полученные препараты содержат преимущественно миристоилированную форму NCS1, т.е. соответствуют природному аналогу. Охарактеризованы термостабильность, а также спектр собственной флуоресценции полученных белков. Показано, что исследуемые формы NCS1 способны взаимодействовать с мембранами фоторецепторной клетки, причем мутация К9Е усиливает Ca^{2+} -зависимость этого взаимодействия. На основании

структурного анализа высказано предположение, что одной из мишеней NCS1 в фоторецепторной клетке может являться родопсинкиназа – эффекторный фермент, отвечающий за десенситизацию зрительного рецептора родопсина. Методом аффинного осаждения NCS1 дикого типа с фрагментами, соответствующими различным участкам родопсинкиназы, показано, что NCS1 способен взаимодействовать с последовательностью ¹MDFGSLETVVANSAFIAARGSF²⁵DAS фермента. Установлено, что NCS1 обладает несколько меньшим сродством к указанному участку родопсинкиназы по сравнению с НКС реCOVERINOM, являющимся доказанным природным модулятором фермента.

Работа поддержана за счёт средств гранта РФФИ №12-04-01045-а (рук. Зерний Е.Ю.).

Литература

1. Burgoyne, R.D. Neuronal calcium sensor proteins: generating diversity in neuronal Ca²⁺ signaling // Nat. Rev. Neurosci. 8(3), 2007, С. 182-193.
2. De Raad, S., Comte, M. et al. Distribution pattern of three neural calcium-binding proteins (NCS-1, VILIP and recoverin) in chicken, bovine and rat retina // Histochem J. 27(7), 1995, С. 524-535.