

*На правах рукописи*

**Шалыгин Алексей Вадимович**

**УЧАСТИЕ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА НОМЕР В РЕГУЛЯЦИИ  
ДЕПО-УПРАВЛЯЕМОГО ВХОДА КАЛЬЦИЯ В КЛЕТКИ А431**

03.03.04

Клеточная биология, цитология, гистология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

---

**Санкт-Петербург**

**2010**

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук  
Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

**Научный руководитель:** доктор биологических наук  
**Казначеева Елена Валентиновна**

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук,  
**Морачевская Елена Алексеевна**

доктор биологических наук,  
**Тихонов Денис Борисович**

**Ведущая организация:** Учреждение Российской академии наук  
Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН,  
Санкт-Петербург

Защита состоится « 28 » января 2011 года в 12 часов на заседании  
Диссертационного совета Д.002.230.01 при Институте цитологии РАН  
по адресу: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4.

Сайт Института: <http://www.cytspb.rssi.ru>

E-mail: [cellbio@mail.cytspb.rssi.ru](mailto:cellbio@mail.cytspb.rssi.ru)

Факс: +7 (812) 297-35-41

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН.

Автореферат разослан «        » декабря 2010 года.

Ученый секретарь Диссертационного совета  
кандидат биологических наук



Каминская Е.В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Все живые организмы используют кальций в качестве внутриклеточного посредника. В покое его концентрация в цитоплазме поддерживается на очень низком уровне –  $10^{-7}$  М, и поэтому может быть быстро повышена (Parekh et al., 2005). Клетка может повысить концентрацию кальция в цитоплазме за счет выброса кальция из внутриклеточных депо или за счет входа кальция из внеклеточной среды через плазматическую мембрану (ПМ). Быстрый выброс кальция из внутриклеточных хранилищ происходит через рецепторы инозитол 1,4,5-трисфосфата ( $IP_3R$ ), которые являются кальциевыми каналами эндоплазматического ретикулума (ЭР) и открываются после связывания с инозитол 1,4,5-трисфосфатом ( $IP_3$ ). В электроневозбудимых клетках основной путь входа кальция из внеклеточной среды – это депо-управляемые каналы (store-operated channels – SOC), которые активируются в ответ на опустошение внутриклеточных кальциевых депо.

В разных тканях были описаны депо-управляемые каналы с различными биофизическими характеристиками, что предполагает различный молекулярный состав таких каналов (Parekh et al., 2005). На сегодняшний день известны два семейства трансмембранных белков, составляющих депо-управляемые каналы: TRPC и Orai. Однако точный молекулярный состав большинства депо-управляемых каналов пока не определен, поскольку TRPC и Orai могут образовывать гетеро- и гомоолигомеры, а белки семейства TRPC и Orai представлены несколькими изоформами, например, у млекопитающих экспрессируется семь изоформ белков TRPC и три изоформы белков Orai (Parekh et al., 2005; Feske et al., 2006).

Механизм передачи сигнала от опустошенного депо к каналам ПМ остается малоизученным. Недавно были обнаружены белки семейства Stim, которые служат кальциевыми сенсорами ЭР (Liou et al., 2005). При опустошении депо белки Stim гомоолигомеризуются и перемещаются в puncta, выпячиваясь к ПМ, что приводит к активации депо-управляемых каналов.

Основная гипотеза передачи сигнала от опустошенного депо к каналам плазматической мембраны – это гипотеза конформационного сопряжения,

подразумевающая прямое взаимодействие белков ПМ (TRPC и Orai) с белками ЭР (IP<sub>3</sub>R и Stim) (Parekh et al., 2005; Wang et al., 2009). В недавних работах была экспериментально продемонстрирована колокализация элементов депо-управляемого входа: кальциевой АТФазы – SERCA (закачивающей кальций в депо), IP<sub>3</sub>R (через который выбрасывается кальций из депо), Stim (являющегося кальциевым сенсором ЭР) и белков ПМ, формирующих пору SOC (Wang et al., 2009; Manjarrés et al., 2010). Однако, неясно, как осуществляется такое близкое расположение белков.

В нервных клетках были описаны адаптерные белки семейства Homer, которые колокализировали метаботропный глутаматный рецептор (mGluR) ПМ и IP<sub>3</sub>R ЭР (Tu et al., 1998). Позже было показано, что Homer может также взаимодействовать с кальциевой АТФазой, рианодиновым рецептором (RyR), TRPC (Yuan et al., 2003; Kim et al., 2006) и другими белками. Более того, в нервных клетках адаптерные белки Homer и Shank образуют сетеподобную структуру, которая организует постсинаптические белки (Hayashi et al., 2009). На N-конце белков Homer расположен домен EVH1, позволяющий им узнавать свои мишени, а именно аминокислотную последовательность PPXXF – пролин, пролин, две любые аминокислоты, фенилаланин. Среди изоформ белков Homer есть две принципиально разные группы: длинные и короткие изоформы. На C-конце длинных изоформ находится домен coil-coiled, позволяющий образовывать им олигомеры. У короткой изоформы, образующейся при альтернативном сплайсинге, этот домен отсутствует (Worley et al., 2007). Длинные изоформы образуют тетрамеры с антипараллельной укладкой C-концов и четырьмя доменами EVH1, такая структура позволяет им колокализировать белки кальциевой сигнализации (Hayashi et al., 2009). Поскольку короткие изоформы не могут олигомеризоваться, они тем самым служат негативными регуляторами функции длинных Homer. Помимо колокализации (или участия в организации) элементов кальциевого входа, было показано, что Homer может модулировать активность mGluR (Ango et al., 2001), а также ионных каналов RyR (Feng et al., 2002) и TRPC (Yuan et al., 2003; Kim et al., 2006).

Было выдвинуто предположение, что адаптерные белки Homer могут

участвовать в регуляции депо-управляемых каналов. В клетках часто присутствуют несколько типов депо-управляемых каналов, например в клетках A431 ранее были описаны четыре типа депо-управляемых каналов:  $I_{\min}$ ,  $I_{\max}$ ,  $I_{CRAC}$ ,  $I_{NS}$  (Kaznacheeva et al., 2007). Предыдущие исследования, подтверждающие роль белков Nox1 в регуляции депо-управляемых каналов, проводились с использованием метода локальной фиксации потенциала в конфигурации whole-cell или флуоресцентных измерений внутриклеточной концентрации кальция (Yuan et al., 2003; Kim et al., 2006). Поскольку в этих экспериментах регистрировался суммарный вход кальция через все типы кальциевых каналов клеток, оставалось неизвестным, какие конкретно типы депо-управляемых каналов регулируются белками семейства Nox1.

**Цели и задачи исследования.** Цель настоящей работы заключалась в исследовании роли белков семейства Nox1 в регуляции депо-управляемых кальциевых каналов в клетках A431. Были поставлены следующие задачи:

1. Выяснить, может ли разобщение белков Nox1 с белками-мишенями активировать вход кальция.
2. Охарактеризовать электрофизиологические свойства одиночных каналов, активируемых диссоциацией комплекса, образованного белками Nox1 с белками-мишенями.
3. Исследовать влияние на вход кальция различных изоформ белков Nox1.
4. Изучить взаимодействие белков Nox1 с  $IP_3R$  первого типа.
5. Сравнить активацию каналов, вызванную  $IP_3$ , пептидом PPKFR и белками Nox1.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Адаптерные белки семейства Nox1 участвуют в регуляции депо-управляемых каналов в клетках A431.
2. Разные типы депо-управляемых каналов имеют разную чувствительность к белкам Nox1.
3. Разные изоформы белков семейства Nox1 оказывают неодинаковое влияние на депо-управляемые каналы.
4.  $IP_3$  нарушает взаимодействие Nox1 и  $IP_3R$  первого типа.

**Научная новизна исследования.** В настоящей работе впервые описаны Номег-чувствительные каналы в клетках А431. Впервые показано, что Номег неодинаково действует на разные типы депо-управляемых каналов ПМ, что позволяет различить механизмы активации каналов  $I_{\min}$  и  $I_{\max}$ . Впервые показано, что  $IP_3$  разрушает взаимодействие  $IP_3R1$  и Номег. Предложен новый механизм действия  $IP_3$  на депо-управляемые каналы.

**Теоретическое и практическое значение работы.** Множество клеточных процессов регулируются изменениями внутриклеточной концентрации кальция (Parekh et al., 2005). Несмотря на то, что основные белки, вовлеченные в этот процесс, уже известны, непонятным остается механизм колоколизации этих белков. Данное исследование вносит существенный вклад в понимание организации и функционирования депо-управляемых кальциевых каналов.

Список заболеваний, вызванных нарушениями в кальциевой сигнализации, неуклонно расширяется. На сегодняшний день установлена роль кальция в нейродегенеративных (Bezprozvanny, 2009), иммунных (McCarl et al., 2009; Oh-Hora et al., 2008) и других заболеваниях. Проведенные исследования позволяют лучше понять причины этих болезней и предложить новые пути их лечения.

**Апробация работы.** Основные положения работы доложены и обсуждены на всероссийской межвузовской научно-технической конференции студентов и аспирантов "XXXIV неделя науки СПбГПУ" (Петербург, 2006); международной конференции "Рецепция и внутриклеточная сигнализация" (Пушино, 2007); всероссийском форуме студентов, аспирантов и молодых ученых «Наука и инновации в технических университетах» (Петербург, 2007); IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008); II Конференции молодых ученых ИНЦ РАН (Петербург, 2010); семинарах кафедры биофизики СПбГПУ и лаборатории ионных каналов клеточных мембран Института цитологии РАН.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация включает введение, обзор литературы, постановку задачи, описание материалов и методов исследования, изложение экспериментальных данных, обсуждение результатов, выводы, список публикаций по теме диссертации и список цитируемой литературы. Работа

изложена на 106 страницах текста, иллюстрирована 15 рисунками и содержит 1 таблицу. Список литературы включает 148 наименований.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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

**Материалы.** Для культивирования клеток использовали среду DMEM, сыворотку крови эмбрионов крупного рогатого скота, генетицин G-418. В работе также применяли глутатион-сефарозу; 1,5-изопропилтио-β-D-галактозид; (1,4,5)IP<sub>3</sub>; уридинтрифосфат; NEMES, тритон X-100, EGTA; антитела к GST (Sigma, США), вторые антитела (кроличьи и мышьиные) (Sigma, США); антитела к Номер 1bc (Santa Cruz, США). Поликлональные антитела (pAb) к IP<sub>3</sub>R первого типа T443 были описаны ранее (Kaznacheeva et al., 1998). Синтез пептидов PPKKFR и PPKKRR был заказан в фирме Диафарм (Россия).

**Метод локальной фиксации потенциала (patch clamp).** В работе использовали метод локальной фиксации потенциала (patch-clamp) в конфигурации inside-out и в конфигурации whole –cell. В первом случае фрагмент мембраны, ограниченный плотным контактом с микропипеткой, изолируется от клеточной поверхности, что открывает доступ к внутриклеточной поверхности плазматической мембраны. Во втором случае разрушается кусок мембраны, ограниченный пипеткой, что позволяет записывать суммарный ток через все каналы плазматической мембраны.

Подачу свежеприготовленных растворов производили путем перфузии камеры 3–5-кратным объемом, что обеспечивало полную смену раствора менее чем за 1 с.

Во всех экспериментах потенциал внеклеточного раствора принимали за нулевой.

В конфигурации inside-out внутриклеточный раствор (камера) содержал (в мМ): 140 К-глутамат, 5 NaCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES-K, pH 7.4, 2 EGTA-K и 1.13 CaCl<sub>2</sub> (pCa 7). Раствор пипетки содержал (в мМ): 105 BaCl<sub>2</sub>, 10 Tris-Cl (pH 7.3). Присутствие ионов Ba<sup>2+</sup> способствовало предотвращению активации кальций-зависимых и блокированию потенциал-зависимых калиевых каналов. Электрическое сопротивление заполненных раствором пипеток составляло 8–20 МОм.

В конфигурации whole-cell внутривнутриклеточный раствор содержал (в мМ) 145 NMDG аспартата, 10 Cs-EGTA, 10 Cs-HEPES pH 7.3, 1.5 MgCl<sub>2</sub> и 4.5 CaCl<sub>2</sub> (pCa 7.0). Внеклеточный раствор содержал (в мМ): 140 NMDG аспартата, 10 BaCl<sub>2</sub>, 10 Cs-HEPES, pH 7.3. Для конфигурации whole-cell вытягивались пипетки, сопротивление которых после оплавления составляло 3–5 МОм. Во всех опытах whole-cell на мембране поддерживался потенциал, равный 0 мВ. С периодом в 5 с командный (управляющий) потенциал менялся по следующему алгоритму. Сначала подавался потенциал -100 мВ в течение 60 мс, затем следовало пилообразное изменение потенциала (voltage ramp) от -100 до +100 мВ в течение 600 мс, после чего потенциал возвращался к 0 мВ. Токи whole-cell нормировались на емкость клетки, которая отражает размер клетки. Среднее значение клеточной емкости составляло  $21 \pm 4$  пФ (общее число опытов  $n = 25$ ).

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

Для оцифровки и анализа записей было использовано программное



обеспечение, написанное В.А. Алексеенко, а также пакеты программ pClamp 6.0.4, Microcal Origin 6.0, Microsoft Excel.

**Электрофорез и иммуноблоттинг (ИБ).** Белковые пробы разделялись с помощью электрофореза в 6, 8, 10%-ом полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. Гель либо окрашивали Кумасси, либо переносили белки из него на мембрану. Перенос белков на мембрану осуществляли полусухим методом. Далее места неспецифической сорбции на мембране забивали 5%-ым молоком и инкубировали с антителами против интересующих нас белков. Затем к мембране добавляли подходящие вторые антитела и проявляли ECL реагентами. Положение белков было определено с помощью фотопленки.

**Экспрессия и очистка рекомбинантных белков GST-Nomer 1c и GST-Nomer 1a.** Клетки *Escherichia coli* BL-21 DE3 трансформировали плазмидами pGEX-2T-Nomer1A и pGEX-2T-Nomer1C. Экспрессию рекомбинантных белков индуцировали 1 mM IPTG в течение 2-3 ч для Nomer 1a при +37 °C и 0.1 mM IPTG в течение 20 ч для Nomer 1c при + 25 °C. Клеточную суспензию охлаждали на льду, центрифугировали 10 мин с ускорением 5000 g, осадок ресуспендировали в 5 мл PBS с добавлением лизоцима 1 мг/мл, 1% Triton X-100 и ингибиторов протеаз. Бактерии, находящиеся в суспензии, разрушали ультразвуком: 2-3 раза по 15 с на льду с перерывами. Полученный лизат центрифугировали 12000 g 15 мин при +4 °C. Химерные белки GST-Nomer очищали на глутатион-сефарозе следующим образом. Супернатант инкубировали с 500 мкл глутатион-сефарозы 2–3 ч при +4 °C. Агарозные гранулы осаждали в центрифуге 300g 5 мин и промывали в 10 мл PBS с 1% Triton X-100, такую операцию повторяли три раза. Белок элюировали инкубацией с 500 мкл буфера для элюции (50 mM Tris, 100 мкМ глутатиона, pH 8.0) в течение 10 мин, этот шаг повторяли три раза, полученные пробы затем объединяли. Полученные белки хранили при +4 °C. Степень очистки белка проверяли с помощью электрофореза и иммуноблоттинга с использованием поликлональных антител к GST и Nomer или просто окраской геля кумасси.

**Клеточный лизат.** Клетки A431 в чашке диаметром 10 см лизировали в течение 10 мин при 4°C в 1 мл раствора, содержащего 150 mM NaCl, 20 mM Tris-

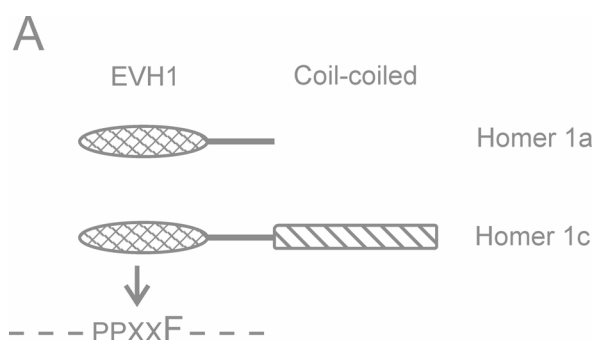
HCl (pH 7.6), 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% тритон X-100, 0.5% NP40, 10% глицерин, 0.5 mM PMSF, с добавлением коктейля ингибиторов протеаз. Лизат трижды пропускали через шприц, затем центрифугировали с ускорением 22000 g при 4 °C в течение 30 мин и отбирали супернатант, который впоследствии использовали в опытах.

**Получение микросом, обогащенных IP<sub>3</sub>R первого типа (IP<sub>3</sub>R1).** Выделение и очистку белка проводили по методике, описанной в (Kaznacheeva et al., 1998). 12 крыс в возрасте 4-5 недель были декапитированы. Крысиный мозжечок был измельчен и гомогенизирован с помощью тefлон-стеклянного гомогенизатора в 15 мл гомогенизирующего буфера (5 mM NaN<sub>3</sub>, 1 mM EDTA, 20 mM HEPES, pH 7.4) в присутствии коктейля ингибиторов протеаз и 0.1 мг/мл PMSF. Затем еще 15 мл гомогенизирующего буфера добавляли к гомогенату, и полученную суспензию центрифугировали 15 мин с ускорением 4000g. Надосадочную жидкость фильтровали, и фильтрат центрифугировали 30 мин с ускорением 90000g. Получившийся осадок ресуспендировали в 30 мл буфера высокой соли (0.6 M KCl, 5 mM NaN<sub>3</sub>, 20 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 1 mM EDTA, 10 mM HEPES, pH 7.2) с помощью тefлон-стеклянного гомогенизатора и центрифугировали 15 мин при ускорении 4000g. Супернатант центрифугировали 30 мин с ускорением 90000g. Полученный осадок растворяли в 0.5 мл буфера для хранения (10% sucrose, 10 mM MOPS, pH 7.0), аликвотировали и моментально замораживали в жидком азоте, хранили при температуре -80 °C. Общая концентрация белка (измеренная по Бредфорд) в микросомах, полученных из крысиного мозжечка, составляла около 5–8 мг/мл.

**Эксперименты pull-down (PD).** К 25 мкл глутатион-сефарозы со связанными на ней химерными белками GST-Номег добавляли лизаты клеток A431 или микросомы, обогащенные IP<sub>3</sub>R1, и инкубировали на переверотном шейкере при 4°C в течение 12–24 ч. Реакцию проводили в буфере PBS с 1% тритона X-100. В ряде экспериментов инкубацию проводили в присутствии IP<sub>3</sub>. После этого сефарозу промывали три раза в 1 мл PBS с 1% тритона X-100 (на сефарозе оставался белок GST-Номег и связавшиеся с ним белки). Наличие IP<sub>3</sub>R1 в пробах проверяли методом иммуноблоттинга с использованием поликлональных антител к IP<sub>3</sub>R1.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**(1) Разобщение белков Homer с белками-мишенями, вызванное пептидом PPKKFR, активирует вход кальция в клетках A431.** С помощью метода иммуноблоттинга показано, что в клетках A431 экспрессируются длинные изоформы белков Homer (рис. 1Б). Домен EVH1 белков Homer узнает в белках-мишенях аминокислотную последовательность PPXXFR, где X – любая аминокислота (рис. 1А) (Tu et al., 1998). Чтобы определить роль адаптерных белков семейства Homer в регуляции кальциевых рецептор-/депо-управляемых каналов, мы использовали синтетический пептид PPKKFR. Ранее было показано, что аналогичный пептид вызывает диссоциацию комплекса, образованного белком Homer с метаботропным глутаматным рецептором или с рианодиновым рецептором (Tu et al., 1998). В контрольных экспериментах мы использовали пептид PPKKRR, поскольку замена фенилаланина на аргинин делает пептид неузнаваемым для домена EVH1 белков Homer.



**Рис. 1.**  
**В клетках A431 экспрессируются длинные изоформы белков семейства Homer.**

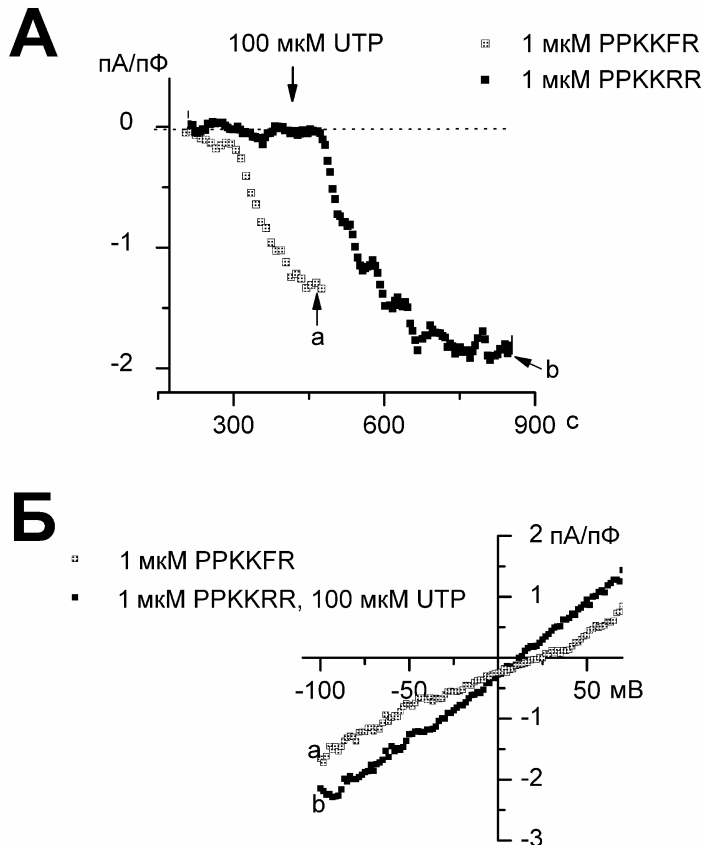
А. Схема структуры белков семейства Homer.



Б. Представлен иммуноблоттинг лизата клеток A431, проявленный моноклональными антителами на Homer 1c. Справа отмечены положения молекулярных маркеров.

В экспериментах whole-cell на клетках A431 в раствор регистрирующей пипетки добавлялся пептид PPKKFR или PPKKRR. После получения

конфигурации whole-cell пептид из пипетки диффундировал в цитозоль клетки. Интегральный вход  $\text{Ca}^{2+}$ , регистрируемый при таком внутриклеточном диализе РРККFR- или РРККRR-содержащими растворами, сравнивали с интегральным депо-управляемым входом кальция, активированным приложением уридинтрифосфата к наружной стороне мембраны (UTP).



**Рис. 2.**  
**Записи токов, индуцированных пептидами РРККFR или РРККRR в экспериментах whole-cell.**

А. Развитие во времени токов при потенциале  $-80$  мВ, когда в регистрирующей пипетке находился пептид РРККFR (серые квадраты) или РРККRR (черные квадраты). Момент добавления UTP во внеклеточный раствор отмечен стрелкой сверху. Стрелками а и б отмечены максимальные значения токов.

Б. Усредненные вольт-амперные характеристики для токов, индуцированных пептидом РРККFR или UTP. Усреднение проводилось для максимального значения токов whole-cell, которые отмечены стрелками а и б на панели А.

Внутриклеточный диализ раствором, содержащим  $1$  мкМ РРККFR, приводил к активации селективного кальциевого тока, максимальная амплитуда которого при потенциале  $-80$  мВ в среднем составляла  $1.3 \pm 0.1$  пА/пФ (рис. 2А). Если вместо РРККFR раствор в пипетке содержал контрольный пептид РРККRR, ток не развивался, но последующее добавление к наружной стороне плазматической мембраны таких клеток  $100$  мкМ UTP приводило к развитию тока (рис. 2А). Максимальные амплитуды токов, вызванных UTP, составляли в среднем  $1.8 \pm 0.3$  пА/пФ при потенциале  $-80$  мВ, то есть были больше, чем амплитуды токов, активированных пептидом РРККFR (рис. 2Б). Потенциал реверсии токов,

активированных пептидом РРККFR, был выше, чем у токов в ответ на UTP. Таким образом, ток, активированный пептидом РРККFR, был селективнее для ионов  $Ca^{2+}$ , чем ток, активированный UTP (рис. 2Б).

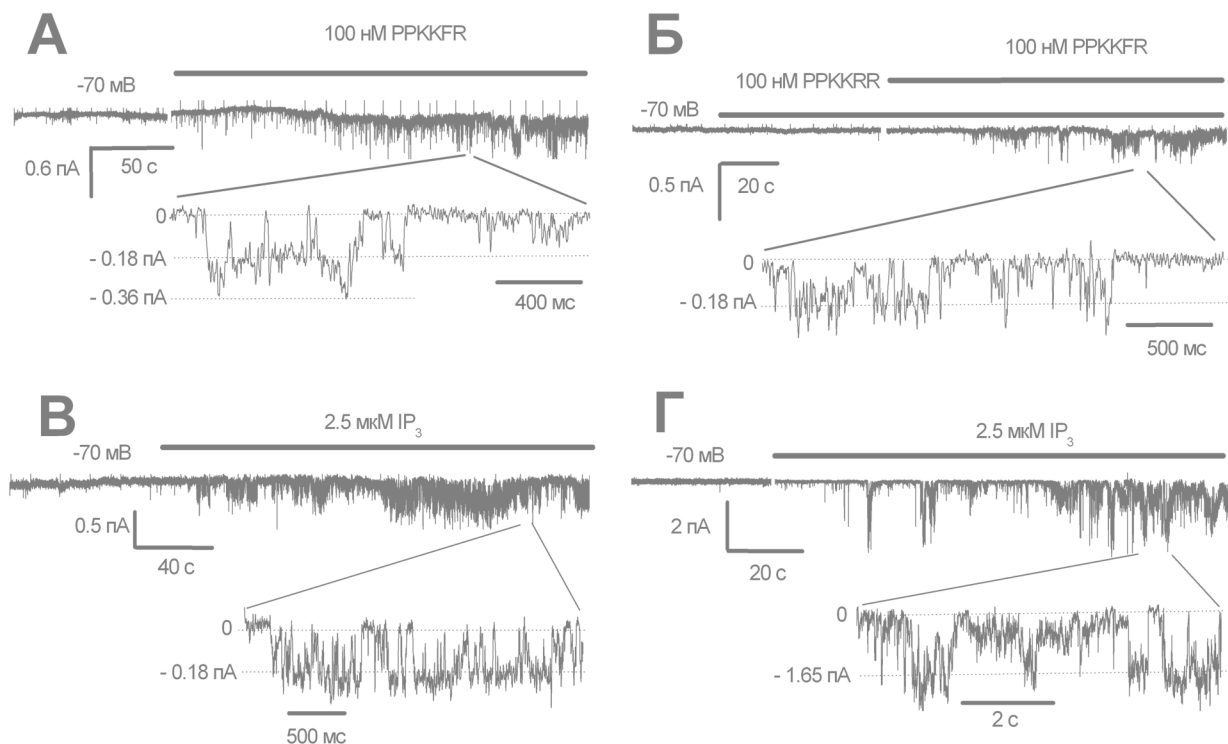
Полученные нами данные согласуются с опубликованными ранее работами других авторов, предположивших взаимосвязь между белками Homer и депо-управляемым входом  $Ca^{2+}$  в электроневоозбудимые клетки (Yuan et al., 2003; Kim et al., 2006).

Ранее в клетках A431 было описано несколько типов чувствительных к UTP кальциевых каналов, токи через которые имели разный потенциал реверсии (Kaznacheeva et al., 2007). Мы предположили, что различия в амплитуде токов и селективности каналов в ответ на пептид РРККFR и на UTP связаны с тем, что стимуляция клеток UTP активирует несколько типов кальциевых каналов, тогда как пептид РРККFR активирует не все типы каналов.

**(2) К разобщению белков Homer с их белками-мишенями, вызванному пептидом РРККFR, чувствительны каналы  $I_{min}$ , но не каналы  $I_{max}$ .** Чтобы исследовать, какие кальциевые каналы, экспрессируемые в клетках A431, ответственны за токи, активируемые диссоциацией комплекса, образованного Homer с белками-мишенями, мы поставили эксперименты в конфигурации inside-out. В экспериментах inside-out на клетках A431 встречаются два типа депо-управляемых каналов:  $I_{min}$  и  $I_{max}$ . Электрофизиологические характеристики этих каналов различны, что позволяет легко идентифицировать их по экспериментальным записям токов. Каналы  $I_{min}$  обладают малой проводимостью (1.2 пСм) и высокой селективностью для двухвалентных катионов. Каналы  $I_{max}$  обладают большей, чем  $I_{min}$ , проводимостью (18 пСм), но при этом их селективность меньше. Оба канала активируются как пассивным опустошением депо, так и внеклеточным UTP или внутриклеточным  $IP_3$ .

В конфигурации inside-out добавление 100 нМ пептида РРККFR с цитоплазматической стороны мембранного фрагмента приводило к активации входящего тока (рис. 3А). Оказалось, что основные электрофизиологические свойства активируемых каналов (кинетические характеристики, проводимость и

потенциал реверсии) совпадают с параметрами каналов  $I_{\min}$ , описанными ранее (Kiselyov et al., 1997, 1999; Zubov et al., 1999; Gusev et al., 2003; Kaznacheeva et al., 2001, 2007). Этот факт позволяет сделать вывод о том, что диссоциация комплексов *Номег*/белки-мишени, вызванная пептидом РРККFR, приводит к активации каналов  $I_{\min}$  в клетках А431, что согласуется с полученными ранее данными на клетках НЕК293 (Николаев и др., 2004). Каналы  $I_{\min}$  активировались пептидом РРККFR в 43% случаев (рис. 3А). Контрольный пептид РРККRR (не приводящий к разделению молекул *Номег* с их мишенями) не активировал каналы ни в одном из опытов, причем последующее добавление РРККFR в том же эксперименте активировало каналы  $I_{\min}$  в 42% опытов (рис. 3Б). Пептид РРККFR не вызывал активацию каналов  $I_{\max}$  – другого типа депо-управляемых каналов в клетках А431.



**Рис. 3. Пептид РРККFR активует каналы  $I_{\min}$ , но не  $I_{\max}$ .**

А. Добавление 100 нМ РРККFR с цитоплазматической стороны мембранного фрагмента (конфигурация *inside-out*, потенциал на мембране -70 мВ) приводило к активации каналов  $I_{\min}$ . Снизу показан фрагмент записи тока в развернутом временном масштабе.

Б. Добавление 100 нМ контрольного пептида РРККRR не активировало токи, тогда как последующее добавление 100 нМ пептида РРККFR активировало каналы  $I_{\min}$ .

В, Г. Добавление 2.5 мкМ  $IP_3$  активировало каналы  $I_{\min}$  (В) и каналы  $I_{\max}$  (Г). Примеры записей токов через одиночные каналы на изолированном фрагменте мембраны при потенциале, равном -70 мВ.

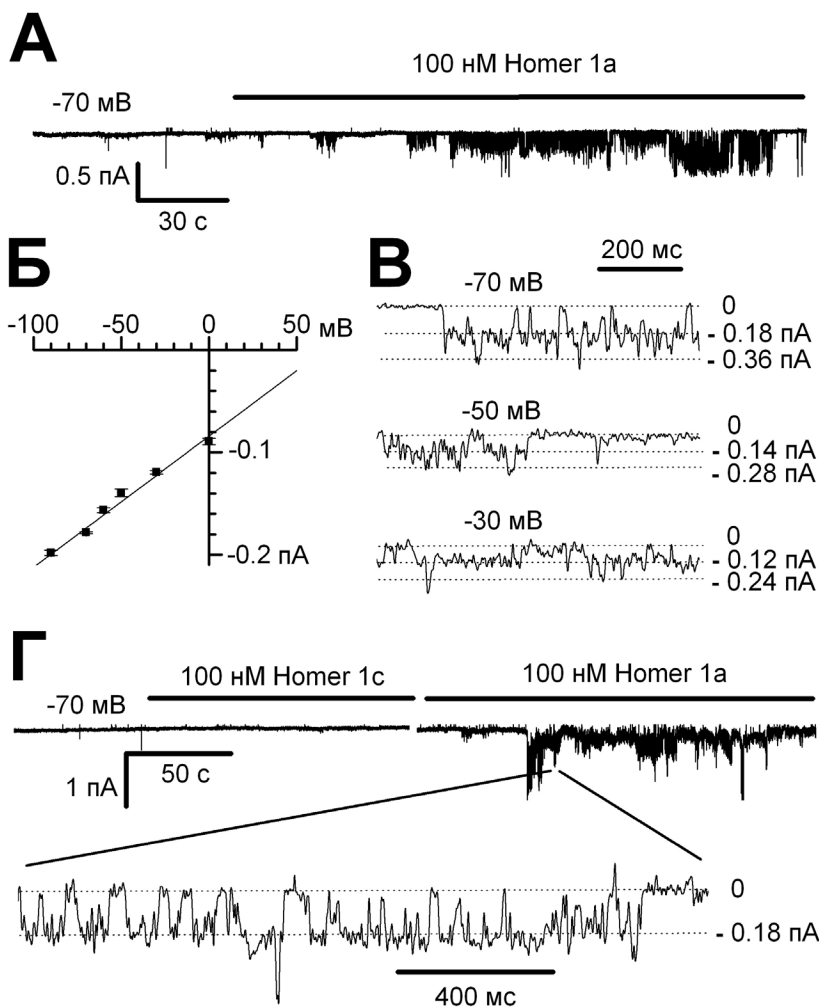
В аналогичных экспериментах, добавление 2.5 мкМ инозитол-1,4,5-трифосфата ( $IP_3$ ) с цитоплазматической стороны мембраны в экспериментах inside-out активировало каналы  $I_{min}$  в 32% и каналы  $I_{max}$  в 8% опытов (рис. 3 В, Г), что согласуется с нашими предыдущими результатами (Kaznacheeva et al., 2007). При потенциале -70 мВ амплитуды токов через каналы  $I_{min}$  составляли 0.18 пА, тогда как амплитуды токов через каналы  $I_{max}$  составляли 1.7 пА (рис. 3 А–Г).

Таким образом, нарушение связи белков Homer с белками-мишенями, вызванное пептидом РРККFR, приводит к активации каналов  $I_{min}$ , тогда как каналы  $I_{max}$  в клетках А431 не чувствительны к этому пептиду. Мы не знаем, регулируются ли белками Homer два других типа депо-управляемых каналов клеток А431 –  $I_{NS}$  и  $I_{CRAC}$ , поскольку эти каналы не встречаются (или не разрешимы) в конфигурации inside-out.

Данные по регистрации активности одиночных каналов хорошо согласуются с результатами экспериментов whole-cell. УТР активировывает все типы депо-управляемых каналов у клеток А431, а пептид РРККFR не активировывает, по крайней мере, каналы  $I_{max}$ , что объясняет разницу в величинах зарегистрированных интегральных токов (рис. 2А, Б). Поскольку каналы  $I_{max}$  менее селективны, чем каналы  $I_{min}$ , то УТР-вызванный интегральный ток проявляет меньшую селективность (рис. 2Б).

**(3) Каналы  $I_{min}$  активировываются изоформой Homer 1a, но не Homer 1c.** Среди белков Homer есть две принципиально разные группы (рис. 1А) (Worley, 2007). У длинных изоформ белка (таких, как Homer 1c) на С-конце находится домен coil-coiled, который позволяет им образовывать гомоолигомеры. Отсутствие домена coil-coiled у коротких изоформ (таких, как Homer 1a) не позволяет им формировать олигомерные комплексы (рис. 1А). Чтобы исследовать действие коротких и длинных изоформ на активность депо-управляемых каналов в А431, мы использовали рекомбинантные белки Homer, очищенные из бактерий *E. coli*, трансформированных плазмидой GST-Homer. Функциональную активность выделенных белков Homer 1a и Homer 1c мы проверяли по их способности связывать  $IP_3R$  первого типа ( $IP_3R1$ ) в экспериментах pull-down.

Мономерная изоформа белков Homer 1a в концентрации 100 нМ активировала кальциевые каналы в 30% экспериментов inside-out (рис. 4А, В). Вольт-амперная характеристика каналов, активированных белком Homer 1a (рис. 4Б, В), совпадала с вольт-амперной характеристикой каналов  $I_{\min}$ , активированных UTP, опустошением депо или  $IP_3$  в клетках A431 или НЕК 293 (Kiselyov et al., 1997, 1999; Zubov et al., 1999; Gusev et al., 2003; Bugai et al., 2005; Kaznacheyeva et al., 2001, 2007). Проводимость каналов, активированных белком Homer 1a, составила 1.3 пСм. Экстраполированный потенциал реверсии этих каналов оказался больше 50 мВ, что соответствует  $P_{Ba/K} > 20$  для условий этих экспериментов (рис. 4Б, В). Длинная изоформа Homer 1c в концентрации 100 нМ не активировала каналы, в то время как последующее добавление Homer 1a приводило к активации каналов  $I_{\min}$  в 27% экспериментов (рис. 4Г). Ни Homer 1a, ни Homer 1c не активировали каналы  $I_{\max}$ .



**Рис 4. Белок Homer 1a активировал каналы  $I_{\min}$ .**

А. Добавление 100 нМ белка Homer 1a с цитоплазматической стороны мембранного фрагмента (конфигурация inside-out, потенциал на мембране -70 мВ), приводит к активации каналов  $I_{\min}$ .

Б. Вольтамперная характеристика токов, активированных рекомбинантным белком Homer 1a в опытах inside-out.

В. Записи токов активированных Homer 1a при разных потенциалах на мембране.

Г. 100 нМ Homer 1c не активировал каналы  $I_{\min}$ , тогда как последующее добавление 100 нМ Homer 1a активировал эти каналы. Внизу представлена запись тока в расширенном масштабе времени.



Из полученных данных можно сделать вывод о том, что разные изоформы Homer неодинаково действуют на каналы  $I_{\min}$  в A431: мономерные белки Homer 1a активируют, а длинные изоформы Homer 1c не активируют каналы. Аналогичное действие различные изоформы белков Homer оказывают на mGluR (Ango et al., 2001) и каналы TRPC (Yuan et al., 2003; Kim et al., 2006), но не на каналы RyR (Feng et al., 2008; Pouliquin et al., 2009), которые активируются как длинными, так и короткими изоформами Homer, причем длинные изоформы активируют RyR первого типа даже сильнее, чем короткие изоформы.

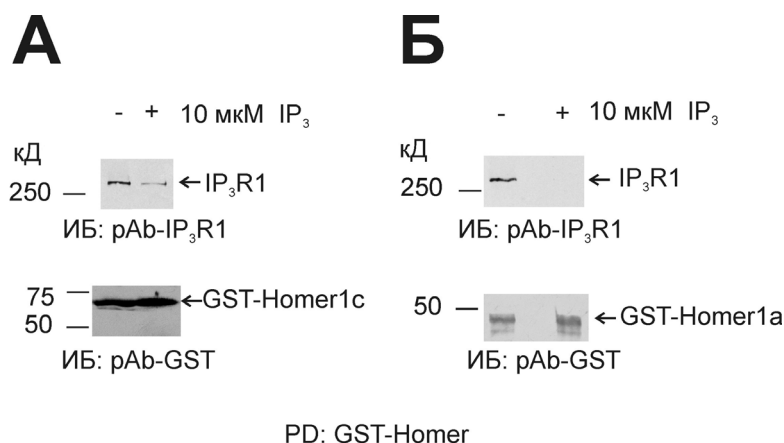
Было предложено следующее объяснение действия белков семейства Homer на каналы TRPC. Поскольку белки Homer 1c могут формировать олигомеры, а короткие изоформы Homer 1a, у которых нет coil-coiled домена, не могут, было выдвинуто предположение, что олигомерные комплексы блокируют активность каналов, в то время как разобщение с олигомерами Homer активирует каналы (Yuan et al., 2003; Kim et al., 2006). По-видимому, аналогичным образом белки Homer регулируют и каналы  $I_{\min}$ . Из наших электрофизиологических экспериментов с пептидами и рекомбинантными белками следует, что для активации каналов  $I_{\min}$  необходим не белок Homer 1a сам по себе, а вызываемое им нарушение взаимодействия олигомерных комплексов Homer с белками-мишенями.

Поскольку олигомеры белков Homer организуют белки кальциевой сигнализации, можно предположить, что отделение олигомерных комплексов Homer приводит к изменению характера взаимодействия между белками-мишенями, а именно между кальциевым каналом и другими белками, в том числе и  $IP_3R$ , что и активирует кальциевые каналы  $I_{\min}$ . Такое разобщение белков-мишеней с нативными олигомерами Homer может вызываться пептидом РРККFR, короткой изоформой Homer 1a или  $IP_3$  (см. ниже). Известно, что белки Homer 1 не влияют на метаболизм фосфоинозитидов, в частности не приводят к увеличению концентрации  $IP_3$  и не изменяют выброса из  $IP_3$ -чувствительных кальциевых депо (Shin et al., 2003). Таким образом, можно предположить, что белки Homer регулируют депо-управляемые каналы не косвенно, за счет влияния на выброс из кальциевых депо, а напрямую, за счет непосредственного воздействия на организацию как сигнального комплекса, связанного с каналом, так и самого канала

плазматической мембраны. Следовательно, несмотря на то, что каналы  $I_{\min}$  являются депо-управляемыми в клетках A431, они, по-видимому, могут функционировать и по депо-нечувствительному механизму – в случае, когда они активируются при диссоциации комплекса, образованного белками Homer с белками-мишенями.

**(4)  $IP_3$  нарушает взаимодействие белков Homer с  $IP_3R1$ .** В клетках A431 в основном экспрессируется  $IP_3R$  первого типа (Глушанкова Л.Н., неопубликованные данные). Как сообщалось ранее, в этих клетках депо-управляемые каналы плазматической мембраны  $I_{\min}$ , по-видимому, регулируются конформационным сопряжением с  $IP_3R1$  – белком эндоплазматического ретикулума (Zubov et al., 1999; Gusev et al., 2003).

В диссертационной работе показано, что белки Homer участвуют в регуляции  $I_{\min}$ . Данные рентгеноструктурного анализа белка  $IP_3R$  указывают на близкое пространственное расположение мотива, узнаваемого белками Homer, и домена, связывающего  $IP_3$  (Bosanac et al., 2005). Известно, что  $IP_3$  может вызывать диссоциацию комплекса Homer с  $IP_3R$  третьего типа (Kim et al., 2006). В связи с этим представляется интересным выяснить, влияет ли  $IP_3$  на взаимодействие  $IP_3R$  первого типа с белками Homer.



**Рис. 5.**  
 **$IP_3$  ослабляет взаимодействие белков Homer с  $IP_3R1$ .**

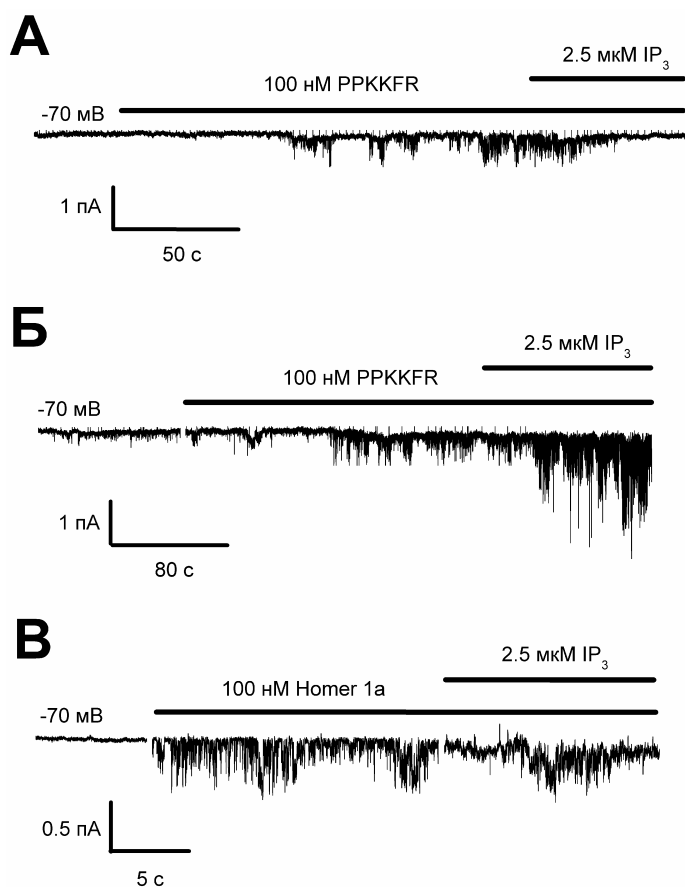
А, Б. Результаты pull-down экспериментов.  $IP_3R1$  инкубировался с GST-Homer 1c (А) или GST-Homer 1a (Б) в отсутствие или в присутствии 10 мкМ  $IP_3$ .

В экспериментах pull-down инкубация как микросом, обогащенных белком  $IP_3R1$ , так и лизата клеток A431 с белками GST-Homer 1 показала, что  $IP_3R1$  специфично взаимодействует с рекомбинантными белками GST-Homer 1a и GST-

Номер 1с. Если же инкубация проводилась в присутствии  $IP_3$ , то взаимодействие  $IP_3R1$  с белками Номер 1а или Номер 1с нарушалось (рис. 5А, Б).

Стимуляция рецепторов, связанных с PLC, увеличивает концентрацию  $IP_3$ , который связывается с  $IP_3R1$  и активирует его, в результате чего происходит выброс кальция из депо. Кроме того,  $IP_3$  может разобщать взаимодействие Номер 1с с  $IP_3R1$ . Как опустошение депо, так и нарушение взаимодействия белков Номер с их мишенями индуцирует активность каналов  $I_{min}$ . Следовательно,  $IP_3$  может приводить к активации каналов  $I_{min}$  не только опустошая депо, но и непосредственно вызывая диссоциацию комплекса  $IP_3R1$ /Номер 1с, то есть, изменяя характер взаимодействия канала  $I_{min}$  с  $IP_3R1$ .

**(5) Воздействие  $IP_3$  и разобщение взаимодействия нативных белков Номер с белками-мишенями влияют на работу каналов  $I_{min}$  не аддитивно.** Поскольку каналы  $I_{min}$  регулируются как  $IP_3$ , так и белками Номер, возникает вопрос, аддитивно ли их действие на эти каналы.



**Рис. 6. Отщепление нативных белков Номер и действие  $IP_3$  не аддитивны при активации каналов  $I_{min}$ .**

А. Активность каналов  $I_{min}$ , вызванная 100 нМ РРККФР, не увеличивается при последующем добавлении 2.5 мкМ  $IP_3$ .

Б. 100 нМ РРККФР с цитоплазматической стороны мембраны активирует каналы  $I_{min}$ . Последующее добавление 2.5 мкМ  $IP_3$  вызывает активность каналов  $I_{max}$ .

В. Активность каналов  $I_{min}$ , вызванная 100 нМ Номер 1а, не меняется при добавлении 2.5 мкМ  $IP_3$ .

Добавление 2.5 мкМ  $IP_3$  к мембранным фрагментам с РРККFR-индуцированной активностью в подавляющем большинстве опытов не приводило к дальнейшему увеличению активности каналов (рис. 6А). В аналогичных экспериментах с рекомбинантным белком Homer 1a, аппликация  $IP_3$  также не изменяла активность каналов  $I_{min}$  (рис. 6В). В нескольких опытах приложение  $IP_3$  после пептида РРККFR активировало каналы  $I_{max}$  (рис. 6Б). В экспериментах, где пептид РРККFR или рекомбинантный белок Homer 1a не вызывали активность каналов  $I_{min}$ ,  $IP_3$  также не активировал каналы.

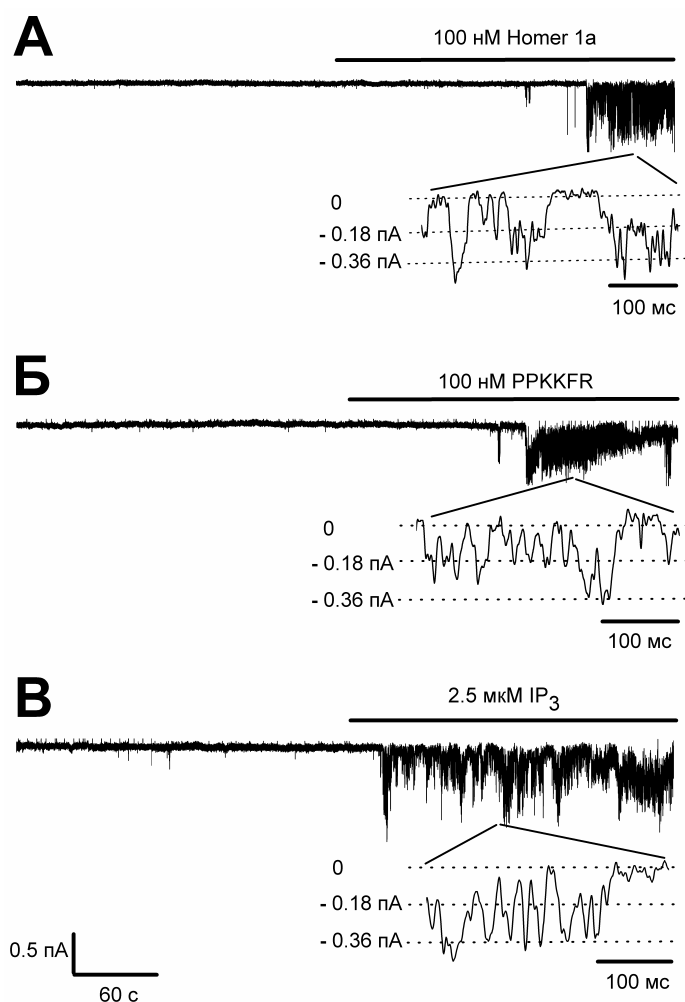
Таким образом, мы показали, что разобщение нативных белков Homer с их мишенями и действие  $IP_3$  не аддитивны. Эти результаты хорошо согласуются с данными экспериментов pull-down, показывающими, что  $IP_3$  нарушает взаимодействие белков Homer с  $IP_3R1$ . В совокупности эти данные позволяют предположить, что каналы  $I_{min}$  регулируются  $IP_3$  и белками Homer по одному сигнальному пути.

**(6) Скорость развития активности каналов  $I_{min}$ , вызванной белком Homer 1a или пептидом РРККFR, в клетках А431.** Следующей задачей являлось сравнение параметров активации каналов  $I_{min}$  пептидом РРККFR или Homer 1a с активацией  $IP_3$  в клетках А431. В конфигурации inside-out добавление к цитозольной стороне плазматической мембраны 100 нМ рекомбинантного белка Homer 1a активировало каналы  $I_{min}$  в среднем через  $168 \pm 18$  с (рис. 7А). При потенциале на мембране -70 мВ величина  $NP_0$ , отражающая уровень активности каналов, в среднем составила  $1.17 \pm 0.16$ . В аналогичных экспериментах со 100 нМ пептида РРККFR каналы открывались в среднем с задержкой в  $133 \pm 20$  с (рис. 7Б), а средняя величина  $NP_0$  была равна  $1.32 \pm 0.21$ .

Добавление 2.5 мкМ  $IP_3$  вызывало активность каналов через  $20 \pm 4$  с (рис. 7В). В среднем  $NP_0$  составляло  $0.89 \pm 0.23$ , что согласуется с характеристиками каналов  $I_{min}$ , полученными ранее (Kiselyov et al., 1997, 1999; Zubov et al., 1999; Gusev et al., 2003; Kaznacheyeva et al., 2001, 2007). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что активация каналов  $I_{min}$ , вызванная белком Homer 1a или пептидом РРККFR, развивается в среднем в 7.5 раз медленнее, чем

активация, индуцируемая  $IP_3$ .

В экспериментах по измерению интегральных токов (whole-cell) на клетках A431 пептид PPKKFR в концентрации 1 мкМ добавляли в раствор регистрирующей пипетки. Ток достигал своего максимального значения в среднем через  $570 \pm 81$  с после прорыва мембраны. Если в пипетке вместо пептида PPKKFR находился контрольный пептид PPKKRR, то развитие тока не наблюдалось. Для сравнения интегральный ток, вызванный добавлением в пипеточный раствор 2.5 мкМ  $IP_3$ , достигал своего максимального значения в среднем за 200 с, что было продемонстрировано ранее в экспериментах whole-cell на клетках A431 (Gusev et al., 2003).



**Рис. 7. Активация каналов  $I_{min}$  в клетках A431.**

Результаты опытов inside-out при потенциале на мембране -70 мВ. Одиночная амплитуда канала  $I_{min}$  составляла 0.18 пА. Масштаб указан в левом нижнем углу рисунка.

А. Рекombинантный белок Homer 1a в концентрации 100 нМ активирует кальциевые каналы  $I_{min}$ . Активность каналов в среднем развивается спустя 168 с после добавления белка. Справа внизу показан фрагмент записи тока в расширенном временном масштабе.

Б. Приложение к цитозольной стороне плазматической мембраны 100 нМ пептида PPKKFR вызывало активность каналов  $I_{min}$  в среднем с задержкой в 133 с.

В. Активность кальциевых каналов  $I_{min}$  развивалась в среднем через 20 с после добавления 2.5 мкМ  $IP_3$ .

На N-конце белков семейства Homer находится домен EVH1, который узнает последовательность PPXXFR в белковых мишенях (Worley et al., 2007). Поскольку

в наших экспериментах параметры активации каналов  $I_{\min}$  белком Homer 1a и пептидом PPKKFR имели близкие значения, можно заключить, что влияние белков Homer на каналы  $I_{\min}$  опосредовано именно доменом EVH1.

Результаты экспериментов inside-out показывают, что степень активности каналов  $I_{\min}$ , вызванных  $IP_3$  и отделением нативных белков Homer от белков-мишеней, статистически неразличима. Однако приложение  $IP_3$  активировало каналы  $I_{\min}$  значительно быстрее, чем добавление пептида PPKKFR или белка Homer 1a. Известно, что скорость диффузии зависит от молекулярной массы вещества, поэтому временная задержка в активации каналов  $I_{\min}$  может быть связана с различной молекулярной массой активирующих агентов. Но поскольку и рекомбинантный белок Homer 1a, и пептид PPKKFR активировали каналы через сравнимый промежуток времени, несмотря на явно разный размер, то в нашем случае предположение о разной скорости диффузии неверно.

Результаты регистрации одиночных каналов хорошо согласуются с данными экспериментов whole-cell. Интегральный ток, вызванный пептидом PPKKFR, достигал своего максимального значения с гораздо большей задержкой, чем ток, вызываемый  $IP_3$ .

Наши данные коррелируют с результатами, полученными на панкреатических клетках, выделенных из мышцы с нокаутом по белку Homer 1 (Kim et al., 2006). Отсутствие в таких клетках длинной изоформы Homer 1c приводило к замедленному развитию кальциевого тока в ответ на  $IP_3$  в экспериментах whole-cell (Kim et al., 2006).

Известно, что в клетках A431 каналы  $I_{\min}$  регулируются конформационным сопряжением с  $IP_3R1$  (Zubov et al., 1999; Gusev et al., 2003), а также белками семейства Homer, что продемонстрировано в данной работе. Более того,  $IP_3$  нарушает взаимодействие  $IP_3R$  и белков Homer (Kim et al., 2006). Однако, в отличие от  $IP_3$ , рекомбинантный белок Homer 1a или пептид PPKKFR вызывают разобщение нативных белков Homer не только с  $IP_3R$ , но и с другими белками-мишенями. Возможно, в этом и заключается причина различий во времени активации каналов.

## ВЫВОДЫ

1. Разобщение взаимодействия белков Homer с их белками-мишенями, вызванное пептидом РРККFR, приводит к активации кальциевого входа в экспериментах whole-cell на клетках A431.

2. Из четырех типов депо-управляемых каналов клеток A431 в экспериментах inside-out только каналы  $I_{\min}$  активировались разъединением нативных белков Homer с их белками-мишенями.

3. Мономерная изоформа Homer 1a активирует каналы  $I_{\min}$ , тогда как олигомеры Homer 1c не вызывают активации. Следовательно, различные изоформы белков Homer по-разному воздействуют на кальциевые каналы клеток A431.

4.  $IP_3$  приводит к нарушению взаимодействия белков Homer с белками  $IP_3R1$ . Следовательно,  $IP_3$  может активировать депо-управляемые каналы, не только опустошая депо, но и за счет разобщения взаимодействия олигомерных комплексов Homer с  $IP_3R1$ .

5. Действие пептида РРККFR или белка Homer 1a и действие  $IP_3$  на каналы  $I_{\min}$  не аддитивны. Развитие активности каналов  $I_{\min}$ , индуцированное пептидом РРККFR или белком Homer 1a, происходит гораздо медленнее, чем активация каналов  $I_{\min}$  в ответ на  $IP_3$ .

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Шалыгин А.В.**, Рязанцева М.А., Глушанкова Л.Н., Безпрозванный И.Б., Можаяева Г.Н., Казначеева Е.В. Регуляция депо-управляемых кальциевых каналов белками семейства Homer в клетках A431 // Acta naturae, 2010, Т. 2, № 3, С. 109-115.

2. **Shalygin A.**, Ryazantseva M., Glushankova L., Mozhayeva G.N., Bezprozvanny I., Kaznacheeva E. Homer regulation of native plasma membrane calcium channels in A431 cells // Cell Calcium, 2010, V.48, № 4, P. 209-214.

3. Рязанцева М.А., **Шалыгин А.В.** Вход кальция в клетку в результате диссоциации комплексов адаптерных белков семейства Homer в клетках линии A431 и линии SK-N-SH // Материалы II конференции молодых ученых Института цитологии РАН, Санкт-Петербург, 15-16 февраля 2010, Цитология, 2010, Т. 52, № 6, с. 504-505.

4. **Шалыгин А.В.**, Рязанцева М.А., Казначеева Е.В. Регулирование депо-управляемых каналов клеток А431 адаптерными белками Nomer // Материалы II конференции молодых ученых Института цитологии РАН, Санкт-Петербург, 15-16 февраля 2010, Цитология, 2010, Т. 52, № 6, с. 511-512.
5. Рязанцева М.А., **Шалыгин А.В.** Участие белков Nomer 1a и Nomer 1c в регуляции активности депо-управляемых кальциевых каналов в клетках А431 // Двенадцатая Всероссийская медико-биологическая конференция «Фундаментальная наука и клиническая медицина», Санкт-Петербург, 18 апреля 2009, СПб.: Изд-во СПбГУ, 2009, с. 322-323.
6. Рязанцева М.А., **Шалыгин А.В.**, Казначеева Е.В. Роль адаптерных белков семейства Nomer в регуляции депо-управляемого входа кальция в клетках А431 // Материалы научной конференции "Ионные каналы: структура и функции", Санкт-Петербург, 17-18 марта 2009, Биологические мембраны, 2009, Т. 26, №. 3, с. 328.
7. **Шалыгин А.В.**, Казначеева Е.В. Роль белков Nomer в регуляции депо-управляемых каналов клеток А431 // VI съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов, Новосибирск, 11-15 мая 2008, Новосибирск: Изд-во «Арта», 2008, с. 174.
8. **Шалыгин А.В.**, Казначеева Е.В. Белок Nomer как регулятор депо-управляемого входа кальция в клетках А431 // Всероссийский форум студентов, аспирантов и молодых ученых "Наука и инновации в технических университетах", Санкт-Петербург, октябрь 2007, СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2007, с. 169.
9. **Шалыгин А.В.**, Казначеева Е.В. Участие белков Nomer в регуляции депо-управляемого входа кальция в клетки А431 // Материалы международной конференции "Рецепция и внутриклеточная сигнализация", Пушкино, 5-7 июня 2007, с. 75.
10. **Шалыгин А.В.**, Казначеева Е.В. Депо-управляемые кальциевые каналы в плазматической мембране клеток линии эмбрионального эпителия почки человека // Материалы конференций политехнического симпозиума "Молодые ученые промышленности Северо-Западного региона", Санкт-Петербург, 8 декабря 2006, СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2006, с. 205-206.
11. **Шалыгин А.В.**, Казначеева Е.В. Роль адаптерных белков семейства Nomer в регуляции кальциевых каналов в клетках эпидермоидной карциномы человека // Материалы всероссийской межвузовской научно-технической конференции студентов и аспирантов "XXXIV неделя науки СПбГПУ", Санкт-Петербург, 1-2 декабря 2005, СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2006, Ч.IV, с. 17-18.



## СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Ango F., Prézeau L., Muller T., et al. // *Nature*. 2001. V. 411. № 6840. P. 962-965.
- Bezprozvanny I. // *Trends Mol. Med.* 2009. V. 15. № 3. P. 89-100.
- Bosanac I., Yamazaki H., Matsu-Ura T., et al. // *Mol. Cell*. 2005. V. 17. P. 193–203.
- Bugaj V., Alexeenko V., Zubov A., et al. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 16790–16797.
- Feng W., Tu J., Yang T., et al. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 47. P. 44722-44730.
- Feng W., Tu J., Pouliquin P., et al. // *Cell Calcium*. 2008. V. 43. № 3. P. 307-314.
- Feske S., Gwack Y., Prakriya M., et al. // *Nature*. 2006. V. 441. № 7090. P. 179-185.
- Gusev K., Glouchankova L., Zubov A., et al. // *J. Gen. Physiol.* 2003. V. 122. P. 81–94.
- Hayashi M.K., Tang C., Verpelli C., et al. // *Cell*. 2009. V. 137. № 1. P. 159-171.
- Kaznacheeva E., Lupu V.D., Bezprozvanny I. // *J. Gen. Physiol.* 1998. V. 111. P. 847-856.
- Kaznacheeva E., Zubov A., Gusev K., Bezprozvanny I., Mozhayeva G. N. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001. V. 98. P. 148–153.
- Kaznacheeva E., Glushankova L., Bugaj V., et al. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. № 32. P. 23655-23662.
- Kim J.Y., Zeng W., Kiselyov K., et al. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 43. P. 32540-32549.
- Kiselyov K. I., Mamin A. G., Semyonova S. B., Mozhayeva G. N. // *FEBS Lett.* 1997. V. 407. P. 309–312.
- Kiselyov K. I., Semyonova S. B., Mamin A. G., Mozhayeva G. N. // *Pflügers Arch.* 1999. V. 437. P. 305–314.
- Liou J., Kim M.L., Heo W.D., et al. // *Curr. Biol.* 2005. V. 15. № 13. P. 1235-1241.
- Manjarrés I.M., Rodríguez-García A., Alonso M.T., García-Sancho J. // *Cell Calcium*. 2010 V. 47. № 5. P. 412-418.
- McCarl C.A., Picard C., Khalil S., et al. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009. V. 124. № 6. P. 1311-1318.
- Oh-Hora M., Yamashita M., Hogan P.G., et al. // *Nat. Immunol.* 2008. V. 9. № 4. P. 432-443.
- Parekh A.B., Putney J.W. Jr. // *Physiol. Rev.* 2005. V. 85. № 2. P. 757-810.
- Pouliquin P., Pace S.M., Dulhunty A.F. // *Pflügers Arch.* 2009. V. 458. P. 723-732.
- Shin D.M., Dehoff M.D., Luo X., et al. // *J. Cell Biol.* 2003. V. 162. P. 293–303.
- Tu J.C., Xiao B., Yuan J. P., et al. // *Neuron*. 1998. V. 21. P. 717-726.
- Wang Y., Deng X., Zhou Y., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2009. V. 106. № 18. P. 7391-7396.
- Worley P.F., Zeng W., Huang G., et al. // *Cell Calcium*. 2007. V. 42. № 4-5. P. 363–371.
- Yuan J.P., Kiselyov K., Shin D. M., et al. // *Cell*. 2003. V. 114. P. 777-789.
- Zubov A. I., Kaznacheeva E. V., Nikolaev A. V., et al. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 25983–25985.
- Николаев А.В., Скопин А.Ю., Казначеева Е.В. // *Биологические мембраны*. 2004. Т. 21. № 6. С. 451-457.