

РОЛЬ EF-HAND $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА ТЕСКАЛЦИНА В ПРОЦЕССАХ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК

К.Г. Колобынина¹, В.В. Соловьева¹, В.З. Слепак², А.А. Ризванов¹

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Россия

² Медицинская школа Миллера при Университете Майами, США

The role of EF-hand $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -binding tescalcin protein in cell proliferation and differentiation

K.G. Kolobynina¹, V.V. Solovyeva¹, V.Z. Slepak², A.A. Rizvanov¹

¹ Kazan (Volga Region) Federal University, Russia, Kazan

² University of Miami Miller School of Medicine, USA, Miami

EF-hand Ca^{2+} -связывающие белки принимают участие во многих важных процессах в организме, включая передачу сигналов, регуляцию ионных токов и дифференцировку. Идентификация и анализ EF-hand мотивов в геноме привели к открытию новых Ca^{2+} -связывающих белков, которые потенциально применимы для биомедицинских показаний. Одним из таких молекул является тескалцин, белок с молекулярной массой 24 кДа, имеющий один EF-hand мотив. Тескалцин играет важную роль в дифференцировке гемопоэтических клеток, а также взаимодействует с субъединицей 4 сигнасомы COP9, Na^+/H^+ -антипортом 1 типа и контролирует экспрессию факторов транскрипции семейства Ets через PMA-индуцированный ERK-путь. Недавно были описаны потенциальные возможности применения тескалцина для диагностики онкологических заболеваний.

Ключевые слова: тескалцин, EF-hand кальций-связывающие белки, дифференцировка клеток, COP9, CSN комплекс, онкологические заболевания.

Введение

Кальций — один из важнейших металлов в живом организме. В качестве универсального вторичного посредника он играет важнейшую роль в сигнальной системе клетки и, таким образом, вовлечен в регуляцию жизненно важных процессов: мышечное сокращение, пролиферацию и дифференцировку клеток, клеточный цикл, апоптоз и прочие физиологические процессы. В основе работы кальция в качестве вторичного посредника, или мессенджера, лежит динамика изменений концентрации свободного Ca^{2+} с субмикромольных значений ($\sim 10^{-7}$ моль) до миллимольных ($\sim 10^{-5}$ моль) в возбужденной клетке под влиянием внеклеточного импульса [1]. Изучение EF-hand Ca^{2+} -связывающих белков связано с их исключительной ролью в детекции флуктуаций внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция. Создаются и совершенствуются программы поиска и предсказания еще не открытых белков с EF-hand мотивами, которые могут стать мишенью исследований и лекарственного воздействия [2]. Одним из интересных EF-hand Ca^{2+} -связывающих белков является тескалцин, который участвует в процессах пролиферации и дифференцировки клеток. Также было предложено использовать тескалцин в качестве маркера диагностики и эффективной онкомишени (англ. oncotarget) в случае рака толстой кишки [3].

EF-hand Ca^{2+} -связывающие белки

Суперсемейство EF-hand Ca^{2+} -связывающих белков насчитывает свыше 66 подсемейств. EF-hand белки структурно похожи, но функционируют в са-

EF-hand $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -binding proteins are involved in many important processes in the body. Identification and analysis of the EF-hand motifs in the genome led to the discovery of novel Ca^{2+} -binding proteins, which are potentially useful for biomedical applications. One of such molecules is tescalcin — 24 kDa protein with one EF-hand motif. Tescalcin plays an important role in differentiation of hematopoietic cells by regulating the expression of Ets family transcription factors via PMA-induced ERK-pathway. At the molecular level, it was shown to interact with subunit 4 of signalosome COP9 and Na^+/H^+ -exchanger. Recently a potential use of tescalcin for cancer diagnostics was demonstrated.

Keywords: tescalcin, EF-hand calcium-binding proteins, cell differentiation, COP9, CSN complex, oncological diseases.

мых различных биологических процессах. Наиболее часто среди всех Ca^{2+} -связывающих мотивов встречается EF-hand [4], впервые описанный в 1973 году на примере Ca^{2+} -связывающего белка парвальбумина [5]. EF-hand состоит из 29 аминокислотных остатков (а.о), представляющих собой Ca^{2+} -связывающую петлю, фланкированную двумя спиральями — E и F [6]. Каноничная Ca^{2+} -связывающая петля занимает 12 а.о. и предоставляет 6 лигандов для связывания Ca^{2+} , которые обычно обозначают как X, Y, Z, -X, -Y, -Z, где X первый лиганд, а -Z последний. Аминокислотные остатки, участвующие в связывании ионов кальция и создании Ca^{2+} -связывающей петли, высоко консервативны [7]. Структура «белок- Ca^{2+} » дополнительно стабилизируется множеством водородных связей прочих а.о., напрямую не участвующих в качестве лигандов [8].

Разнообразии EF-hand мотивов

Помимо EF-hand мотива с каноничным типом Ca^{2+} -связывающей петли, встречаются другие типы EF-петли, которые можно разделить на четыре группы, три из которых сохраняют пентагональную бипирамидальную конфигурацию связи с Ca^{2+} [9].

Первая группа с неканоничным строением EF-hand петли представлена белками, Ca^{2+} -связывающая петля которых имеет каноничную длину в 12 а.о., однако либо короче и компактнее обычных (в случае если последним лигандом в позиции 12 является аспартат), либо имеет увеличенное количество карбонильных групп полипептидной цепи (например, у белка *Arabidopsis thaliana*, схожего с кальцинейрином B) [10].

Вторая группа неканоничных EF-hand петель представлена так называемыми псевдо-EF-hand «ψ-hand» петлями, у которых есть 14 а.о. вместо обычных 12 (позиции лигандов 1, 4, 6, 9). Псевдо-EF-hand-петля связывает кальций в основном за счет лигандов полипептидной цепи, а не боковых цепей и предоставляет для связывания Ca^{2+} необычные лиганды +X, +Y, +Z [7].

К третьей группе относят EF-hand последовательности, которые короче канонической (11 а.о.). Эти петли связывают Ca^{2+} благодаря альтернативной конформации, возможной за счет участия в качестве лигандов атомов кислорода основной полипептидной цепи и образованию дополнительной водородной связи через молекулу воды [11].

Существует еще один способ связывания Ca^{2+} неканоническими EF-hand петлями. Этот способ заключается в смене координационной геометрии комплекса «белок- Ca^{2+} »: вместо пентагональной бипирамидальной образуется октаэдрическая конформация. Обычно в этом случае в связывании кальция участвует только N-конец EF-петли [12]. N- и C-концы EF-hand Ca^{2+} -связывающей петли различны. N-конец петли более вариабелен среди белков подсемейств, в то время как C-конец всегда высокоструктурирован и связан с Ca^{2+} -связывающей петлей парного мотива [13].

Функционирование EF-hand мотивов

Белки с одиночным EF-hand мотивом встречаются очень редко: такой одиночный мотив был обнаружен среди белков *A. thaliana*, а также в белке тескалцине, которому посвящен этот обзор. Структурной единицей одиночных EF-hand мотивов остается мотив, а не домен из пары. Это было доказано в ходе эксперимента по созданию химерного белка: отдельный EF-hand мотив был перенесен в структуру белка-хозяина, в норме не содержащего EF-hand мотива. После переноса Ca^{2+} -связывающая способность мотива сохранилась [7, 10].

подавляющее большинство EF-hand мотивов объединено в пары, и только в парах они взаимодействуют наиболее эффективно, связывая ионы кальция. Пара представляет собой продолжительную полипептидную цепь, связанную короткой линкерной последовательностью, формируя пучок из 4 амфипатических спиралей, скрывающих в центральной части гидрофобное ядро [14]. Сообща пара мотивов связывает два иона кальция, располагающихся на расстоянии 11 Å друг от друга [15]. Самым маленьким белком, содержащим всего одну пару EF-hand мотивов, является кальбиндин D9K [16]. Подавляющее большинство белков содержит 2 пары EF-hand (кальмодулин), 4 пары, 6 пар и т.д. Существуют белки с нечетным числом EF-hand мотивов: три-EF-hand (парвальбумин, онкомодулин), пента-EF-hand белки (кальпаин, гранкальцин). Все они имеют одну неспаренную EF-hand. Интересно, что этот одиночный мотив участвует в образовании димеров: неспаренные EF-hand мотивы каждой частицы образуют пару. Склонность к образованию пары у EF-hand мотива настолько высока, что в искусственно созданной смеси субъединиц димеризация спонтанна, причем гетеродимеры образуются чаще гомодимеров [16]. Для тескалцина также описана способность к димеризации [1].

Пара EF-hand мотивов связана между собой функционально и структурно. Две Ca^{2+} -связывающих петли соединяются коротким антипараллельным β-листом, а два EF-hand мотива связываются обширным гидрофобным соединением между спиральями [13]. Спаривание EF-hand мотивов увеличивает сродство каждой EF-hand к кальцию и помогает кооперации двух мотивов в связывании Ca^{2+} . Кооперативный эффект является положительным, если связывание первого Ca^{2+} белком увеличивает сродство ко второму иону Ca^{2+} . Для большинства EF-hand белков характерен положительный кооперативный эффект. Это особенно важно для Ca^{2+} -сенсоров, EF-hand белков, связывающих растущие концентрации кальция в клетке. Положительный кооперативный эффект Ca^{2+} -связывающего домена способствует быстрой смене состояний: белок остается неактивным до тех пор, пока концентрация Ca^{2+} в цитоплазме не достигнет порогового значения [17]. Интересно, что псевдо-EF-hand мотивы всегда составляют пару только с каноническим EF-hand мотивом, в то время как каноничные могут объединяться как с псевдо-, так и с себе подобными структурами [7].

Кальций-связывающая способность EF-hand белков

Семейство EF-hand белков на основании Ca^{2+} -связывающей способности подразделяется на две группы: белки с низкой Ca^{2+} -связывающей способностью, так называемые Ca^{2+} -буферы (структурные; например, парвальбумин), которые связывают кальций со сродством менее 100 нМ и не подвергаются каким-либо серьезным конформационным изменениям, в то время как Ca^{2+} -сенсоры, EF-hand белки с высокой Ca^{2+} -связывающей способностью (регуляторные; например, кальмодулин), обладают способностью связывать растущие концентрации кальция в пределах 10^{-5} – 10^{-6} М и претерпевают Ca^{2+} -индуцированные конформационные изменения, что позволяет им взаимодействовать с целевыми белками и передавать сигнал дальше по цепи [1]. Ca^{2+} -сенсоры вовлечены в большое количество процессов, где выполняют различные функции: регуляция ионных каналов, моделирование ферментативной активности, сокращение мышц. Ca^{2+} -буферы модулируют Ca^{2+} -сигнал во времени и пространстве, связывают свободный кальций, чтобы провести его через клетку или удалить потенциально опасный катион из цитоплазмы, поддерживают гомеостаз этого иона. К тому же основное сродство к Ca^{2+} выше у буферов, чем у сенсоров [18]. Функционирование белка в качестве буфера или сенсора зависит от характеристик его EF-hand Ca^{2+} -связывающих доменов, а те, в свою очередь, от типа и особенностей составляющих их EF-hand мотивов [19]. Стоит отметить, что тескалцин является, скорее всего, сенсором.

Также на связывание Ca^{2+} влияют следующие факторы: собственная связывающая способность EF-hand мотива, кооперативный эффект пары EF-hand мотивов, избирательность к Mg^{2+} и другим двухвалентным ионам, взаимодействие с целевым белком [9]. Рентгеноструктурный анализ белка в свободном состоянии и в соединении с Ca^{2+} показывает, что после связывания Ca^{2+} конформация белка меняется: EF-hand домен обнажает обширную гидрофоб-

ную поверхность; через которую и идет соединение. Специфичность к целевому белку этой гидрофобной площадки достигается набором аминокислотных остатков на ее поверхности. Такие процессы как конформационные изменения в ответ на связывание ионов, взаимодействие с целевым белком и сродство к Ca^{2+} энергетически взаимосвязаны. Энергетический баланс соединения играет важнейшую роль и определяет механизм взаимодействия [20].

Некоторые EF-hand домены могут также связывать и другие двухвалентные катионы помимо кальция, такие как Mg^{2+} и Zn^{2+} . Это определяется их свойством избирательности к связыванию ионов. Условно разделяют смешанные Ca^{2+} -связывающие петли и Ca^{2+} -специфичные. Смешанные петли связывают Mg^{2+} в физиологических условиях субмикромольных концентраций. Ион магния похож на ион кальция, но гораздо меньше его размером. Поэтому Mg^{2+} обычно связывается шестью лигандами в конфигурации октаэдра, и последний бидентатный лиганд глутамата или аспартата, ключевой для связывания Ca^{2+} , не принимает участия в связывании Mg^{2+} . Для смешанных петель концентрации Mg^{2+} оказывают влияние на связывание Ca^{2+} . Например, в кальмодулине физиологические концентрации Mg^{2+} ослабляют связывание кальция EF-hand доменом N-конца в отсутствие целевого белка [21]. В соответствии с результатами измерений аффинности рекомбинантного тескалцина с Ca^{2+} было выдвинуто предположение, что тескалцин имеет сродство к иону магния и находится в клетке в Mg^{2+} -связанной форме [1]. Белки подсемейства S100 связывают, в отличие от других EF-hand белков, ионы Zn^{2+} и Cu^{2+} . Кроме того, они могут составлять олигомеры более высокого порядка, связанные дисульфидными мостиками [22].

Ген тескалцина и структура белка, гомологи

Тескалцин, также известный как гомологичный кальцинейрину В белок 3 (англ. Calcineurin B homologous protein 3, CNP3), в организме человека кодируется геном *TESC* и представляет собой белок с молекулярной массой 24 кДа. Он принадлежит к семейству EF-hand Ca^{2+} - и Mg^{2+} -связывающих белков, подсемейству кальцинейрина В. Ген *TESC* содержит 8 экзонов и локализуется на 12 хромосоме человека. Впервые тескалцин был открыт в эмбриональном яичке мыши на 11,5 день после оплодотворения. Открытая рамка считывания гена *TESC* мыши включает 642 пар нуклеотидов (п.н.), кодирующих белок из 214 а.о. [18]. Возможны, по меньшей мере, три изоформы тескалцина, моделируемые с помощью альтернативного сплайсинга матричной РНК (мРНК) этого гена [23]. Кроме EF-hand Ca^{2+} -связывающего домена структура тескалцина мыши также содержит N-концевой меристоиловый мотив и несколько сайтов фосфорилирования [18]. Наличие сайтов меристоилирования показано с использованием рекомбинантного тескалцина, несущего на конце гексагистидиновую метку. Экспрессия этого рекомбинанта в клетках *Escherichia coli* вместе с дрожжевой N-меристоилтрансферазой 1 приводила к специфичному присоединению [^3H]меристиновой кислоты [1]. N-меристоилирование тескалцина может запускать Ca^{2+} -индуцированный меристоиловый переключатель, что облегчает взаимодействие с эффекторами или мембранными компартментами.

Ca^{2+} -индуцированный меристоиловый переключатель описан также в других Ca^{2+} -связывающих белках, например у рековерина [24].

Значительная степень гомологии тескалцина была обнаружена к трем Ca^{2+} -связывающим белкам: гомологичный кальцинейрину белок 1 (CNP1), гомологичный кальцинейрину белок 2 (CNP2) и кальцинейрин В (CnB). Все три вышеперечисленных белка ацилированы N-меристиоловым остатком и предполагается, что благодаря этому они могут выполнять функции, связываясь с мембраной [1, 25]. Кроме того, тескалцин человека имеет 96,7% идентичности с тескалцином мыши [25] и, по-видимому, является прямым ортологом. Было показано, что тескалцин высококонсервативен среди многих позвоночных организмов [23]. Тескалцин отличается от CNP1 и CNP2, поскольку в его последовательности отсутствует сигнал ядерной локализации. Он имеет только один функциональный EF-hand мотив, в то время как CNP1 имеет два мотива. Все три белка отличаются по своему расположению в организме, в отличие от CNP1, CNP2 был обнаружен и в опухолевых тканях. Последовательность CNP1 высоко консервативна, этот белок широко экспрессируется в тканях. Он участвует в транспорте везикул во время экзоцитоза, а также их слиянии с мембраной. CNP2 был впервые найден в тканях пациентов с раком печени. Сверхэкспрессия CNP2 изменяет опухолеродную способность клеток HEK293 *in vivo*. Клетки, экспрессирующие CNP2, были более агрессивны, осуществляя инвазию в печень, селезенку и почки, что не наблюдалось в контроле. CNP2 и CNP3 обнаружены только у позвоночных, в отличие от CNP1 [26].

Связывание металлов, конформация

На первый взгляд тескалцин имеет только один EF-hand домен, но при более детальном рассмотрении было выявлено, что его структура содержит дополнительные три спираль-петля-спираль участки, имеющие умеренную гомологию к EF-hand домену. Предполагается, что они стабилизируют структуру основного Ca^{2+} -связывающего участка. EF-hand домен находится ближе к C-концу белка (110–145 а.о.) и имеет вторичную структуру вида спираль-петля-спираль длиной в 29 а.о., координирующую всего один катион Ca^{2+} шестью консервативными аминокислотными остатками «петли» (1, 3, 5, 6, 8 и 12) в пентагональной бипирамидальной конфигурации. «Спирали» представлены α -спиралями по 9 а.о. каждая [1, 25].

С. Gutierrez-Ford с соавт. (2003) доказали наличие в структуре тескалцина Ca^{2+} -связывающего EF-hand домена, заменив ключевой аминокислотный остаток аспарагиновой кислоты в позиции X предполагаемого EF-hand домена на аланин (D123A). Тескалцин дикого типа показал Ca^{2+} -индуцированный сдвиг флуоресценции триптофана, а мутант D123A не дал таких результатов. Эти исследования показали, что за Ca^{2+} -связывающую способность тескалцина ответственен именно EF-hand домен. Кроме того, экспрессия мутанта D123A в клетках яичника китайского хомячка CHO-K1, трансфицированных им, была на значительно более низком уровне, чем экспрессия тескалцина дикого типа. Авторы исследования предположили, что связывание кальция стабилизирует структуру тескалцина, что мутантному

белку по причине отсутствия функции недоступно [1]. Впоследствии те же авторы показали, что мутация D123A ингибирует взаимодействие тескалцина с его партнером — субъединицей 4 сигнасомы COP9 (CSN) [27].

Конформационные изменения в структуре тескалцина дикого типа также подтверждены результатами спектроскопии циркулярного дихроизма. Анализ результатов показал, что мутация D123A существенно не изменяет вторичную структуру тескалцина, и подтвердил отсутствие функции связывания кальция у мутантного белка: изменения спектра по причине связывания иона кальция тескалцином дикого типа отсутствовали в аналогичных спектрах мутанта D123A [1]. Сродство тескалцина к ионам кальция находится в микромолярном диапазоне EC50. Таким образом, тескалцин, скорее всего, сенсор кальция. Также была показана афинность тескалцина к ионам магния. Авторы предположили, что в покоящейся клетке тескалцин находится в Mg^{2+} -связанной форме, что может представлять собой неактивную конфигурацию. По-видимому, во время резкого повышения концентрации ионов кальция в клетке ионы магния в Mg^{2+} -связывающем сайте могут заменяться ионами кальция [1].

В экспериментах с рекомбинантным белком было показано, что тескалцин человека может существовать как в мономерной, так и в гомодимерной форме, причем связь субъединиц в димере осуществляется за счет дисульфидного мостика. Обе формы показали свою стабильность, и мономеры могут спонтанно димеризоваться. В отличие от других EF-hand Ca^{2+} -связывающих белков, электрофоретическая подвижность тескалцина не изменяется в присутствии Ca^{2+} . Кроме того, способность тескалцина связывать кальций не изменяется в присутствии дитиотреола [1].

Субклеточная и тканевая локализация тескалцина

Тескалцин является преимущественно растворимым белком цитозольной фракции. Было показано, что трансфицированный тескалцин в наибольшей степени сосредоточен вокруг ядра, в перинуклеарном пространстве и в непосредственной близости от эндоплазматического ретикула. Особенно богаты тескалцином мембранные области ламеллоподий, складок и выростов мембраны (англ. Membrane ruffles) в присутствии сыворотки и активного Rac-1 (англ. Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) белка. На субклеточную локализацию тескалцина в трансфицированных клетках не оказали влияния мутации EF-hand или N-меристиолового мотива [1]. Интересно, что в клетках линии K562 со сверхэкспрессией тескалцина, основной пул рекомбинантного тескалцина находился в ядре. Это позволяет предположить, что тескалцин может быть вовлечен в такие ядерные процессы как транскрипция и реконструкция хроматина [28].

Тканевая локализация тескалцина довольно разнообразна. Было показано, что в эмбрионе мыши наибольшая концентрация тескалцина наблюдается в яичке, тогда как в организме взрослых животных — в тканях сердца, желудка, и мозга. Тескалцин экспрессируется исключительно в эмбриональных половых органах самца и никогда — самки [18]. Тескалцин человека имеет сходную преимущественную локализацию: наибольшая концентрация тескалцина в

организме взрослого человека наблюдается в тканях сердца, меньшая — в слюнных железах, наименьшая — в половых железах, хотя тескалцин был также обнаружен в поджелудочной железе, костном мозге и надпочечных железах, а также в некоторых опухолевых культурах клеток (HeLa, HL-60) и плаценте [25, 27, 29].

Взаимодействие тескалцина с Na^+/H^+ -антипортом 1 типа (NHE1)

NHE1 представляет собой интегральный белок, состоящий из двух доменов: цитоплазматического C-домена, в виде α -спирали взаимодействующего с сигнальными молекулами, и мембранного N-домена, создающего ионообменный канал. Взаимодействие с тескалцином было открыто с использованием дву-гибридной дрожжевой системы, где C-концевой домен NHE1 использовался в качестве «наживки». Тескалцин, как и гомологичные ему CNP1 и CNP2, взаимодействует с тем же юкстамембранным доменом цитоплазматического C-конца NHE1 [25, 30].

Взаимодействуя с NHE1, тескалцин влияет на важнейшие физиологические функции: стабилизацию pH внутри клетки, активацию NHE1 в ответ на злокачественное перерождение клетки, обеспечение необходимого количества H^+ в тканях сердца [31]. Тескалцин оказывает положительное действие на NHE1, увеличивая его активность, интенсивность перемещения ионов, полупериод его существования в клеточной мембране, тем самым обеспечивая регуляцию таких процессов, как клеточная пролиферация, дифференцировка и опухолевая трансформация [32]. Однако некоторые исследования подчеркивают эффект ингибирования активности NHE1 тескалцином в неактивной клетке [30]. Также было показано, что NHE1 вовлечен в адаптацию к внутриклеточному ацидозу в случае ишемии. Тескалцин в связи с NHE1 оказывает такое же действие, что делает его возможной мишенью для предотвращения таких неблагоприятных последствий, как некроз и аритмия [25].

Совсем недавно появились результаты исследования участия тескалцина в развитии головного мозга человека. Было выяснено, что тескалцин взаимодействует с геном *RELN* (rs2299403; рилин) и, хотя молекулярные основы взаимодействия еще не известны, было показано, что в периоды раннего развития мозга наблюдается значительный уровень экспрессии генов тескалцина и рилина. Рилин — протеаза, экспрессирующаяся в тканях мозга, ответственная за направление нейронной миграции и сигнализации в период развития; впоследствии было обнаружено, что рилин играет роль в развитии таких психических заболеваний как шизофрения, биполярное расстройство на ранних стадиях возникновения, а также оказывает влияние на высшие когнитивные процессы [33]. Хотя до сих пор неясно, как тескалцин влияет на структуру серого вещества гиппокампа взрослых людей, была высказана мысль, что тескалцин играет важную роль в клеточной дифференцировке и пролиферации для создания объема гиппокампа и развития мозга. В период развития тескалцин экспрессируется во всех частях мозга, но особенно большой уровень продукции наблюдается в развивающемся конечном мозге, среднем мозге и желудочках мозга [33]. Авторы исследования использовали технику мультимодальной визуализации. Одним из

исследуемых параметров стал объем гиппокампа. Уменьшение объема гиппокампа оказалось одним из самых явных визуализированных маркеров глубокой депрессии и посттравматического стресса по сравнению со всеми остальными нервно-психическими расстройствами. Поскольку тескалцин напрямую взаимодействует с NHE1, который вовлечен в клеточную пролиферацию, дифференцировку, миграцию, а также влияет на объем клетки и организацию цитоскелета, авторы предположили, что влияние тескалцина на NHE1 и есть тот самый путь, через который тескалцин осуществляет воздействие на изменение объема гиппокампа [33]. В настоящее время нет достаточно данных, чтобы объяснить молекулярный механизм воздействия тескалцина на дифференцировку. Это может быть связано и с его эффектом на транскрипционные факторы, и взаимодействием с NHE1.

Участие тескалцина в процессах дифференцировки и пролиферации клеток

В ходе исследований тескалцина в клеточных линиях HL60 и K562 было замечено изменение его уровня в процессе дифференцировки. В последствии было показано, что тескалцин является необходимым фактором дифференцировки первичных мегакариоцитов и клеток линии K562. Сверхэкспрессия тескалцина в опухолевой культуре клеток K562 приводит к спонтанной дифференцировке по мегакариотическому пути, индуцируя такие события, как полиплоидизацию, синтез характерных антигенов на поверхности клетки и пролиферацию. В то же время нокдаун тескалцина путем РНК-интерференции значительно замедляет дифференцировку [28]. Более поздние исследования на мышах с нокаутом тескалцина не показали аналогичных изменений в системе кроветворения, и вообще не нашли фенотипических изменений. Авторы предположили, что гомологи тескалцина SHP1 и SHP2 могут компенсировать нокаут тескалцина [34]. Существует другое объяснение, почему физиологический эффект нокаута не проявился в фенотипе мышей: в генотипе мышей нокдаун был неполный и приводил к транскрипции мРНК, содержащей комбинацию экзонов 1, 2, 7 и 8, так что в клетках образовывался белок, содержащий уникальный С-конец тескалцина [27]. Для понимания роли тескалцина в дифференцировке клеток необходимы дополнительные исследования, включающие более детальный анализ фенотипа нокаутных мышей. Например, необходимо сравнить динамику восстановления популяции мегакариоцитов после потери крови, или в эмбриональном развитии. Не исключено, что она будет замедлена. Действительно, нокдаун тескалцина в клетках не приводил к полной остановке дифференцировки, а только к существенному замедлению процесса.

Тескалцин контролирует экспрессию факторов транскрипции семейства Ets через РМА-индуцированный сигнальный ERK-путь (англ. Extracellular signal-regulated kinase). Например, в эритролейкемических линиях клеток K562 и HEL, испытывающих недостаток тескалцина, блокирован синтез таких факторов транскрипции как Fli-1, Ets-1, и Ets-2. Эти транскрипционные факторы участвуют не только в гемопоэзе, но и в развитии нервной и сердечнососудистой систем [27–28]. Следова-

тельно, в процессе мегакариотической дифференцировки тескалцин необходим для координированного взаимодействия активации ERK-каскада и экспрессии Ets генов. Кроме того, тескалцин вовлечен в процесс дифференцировки и созревания полиморфно-ядерных гранулоцитов под контролем сигнального ERK-пути. Интересно, что регуляция экспрессии тескалцина может происходить как на транскрипционном, так и на пост-транскрипционном уровне; клеточная дифференцировка может протекать и с увеличением, и с уменьшением активного тескалцина в клетке, что в некоторой степени связано с типом вещества-индуктора сигнального ERK-пути [29].

Тескалцин является одним из факторов, позволяющих из одного типа клеток-предшественников в процессе дифференцировки получить различные специализированные типы клеток. Это определяет интерес к его возможному использованию в клеточной терапии.

Взаимодействие тескалцина с субъединицей 4 сигнасомы COP9

Действительно, совсем недавно был обнаружен еще один белок, с которым взаимодействует тескалцин — это субъединица 4 сигнасомы COP9 (CSN). COP9 сигнасома — эволюционно консервативный мультибелковый комплекс, состоящий из 8 субъединиц, обозначаемых CSN1–8 (с номерами от одного до восьми), и имеющий чрезвычайную гомологию по отношению к регуляторной частице 26S протеасомы. CSN первоначально была определена как репрессор фотоморфогенеза у арабидопсиса. В настоящее время показано участие CSN во многих клеточных процессах и этапах развития различных эукариотических организмов [35].

Большая часть субъединиц комплекса содержат уникальный PCI (Proteasome-Cop9-eIF3) домен. Исследования COP9 комплекса у разных организмов охарактеризовали сигнасому в качестве модулятора широкого спектра жизненно необходимых процессов: эмбриогенез, клеточный цикл, репарация ДНК, сигнальный путь MAPK (митоген-активируемая протеинкиназа, англ. Mitogen-activated protein kinase) и сигнальная система стероидных гормонов, аксональный транспорт, дифференцировка. Регулируя эти процессы, CSN влияет на транскрипцию, фосфорилирование и стабильность белков [36].

COP9 комплекс также регулирует деградацию белка, так как может влиять на активность cullin-RING-E3 убиквитиновой лигазы. С CSN взаимодействует свыше 50 белков, но только два с субъединицей CSN4: торсин А и тескалцин [27]. Тескалцин специфично взаимодействует с CSN4 через ее PCI домен по кальций-зависимому механизму. Белок-белковое взаимодействие было показано при использовании рекомбинантных очищенных белков с помощью двугибридной дрожжевой системы и культур эукариотических клеток. Нокдаун тескалцина стимулирует активность CSN. Гомологи тескалцина SHP1 и SHP2 не взаимодействуют с COP9 комплексом. В исследовании также показано, что тескалцин может взаимодействовать с CSN5, но взаимодействие слабее по сравнению с CSN4. Нокдаун тескалцина вызывал изменение в уровне экспрессии факторов транскрипции p53 и c-Jun в эритролейкемических линиях клеток K562 и HEL [27].

Ассоциация тескальцина с онкологическими заболеваниями

Потенциальное использование тескальцина в качестве маркера для диагностики и как эффективной онкомаркеры в случае рака толстой кишки (колоректальный рак, англ. Colorectal cancer, CRC) получило недавно экспериментальное подтверждение. Ген *TESC* имеет высокий уровень экспрессии в тканях рака толстой кишки по сравнению с нормальными тканями человека. В тканях и сыворотках, пораженных CRC, тескальцин сверхэкспрессируется, в то же время нокдаун *TESC* ингибирует Akt-зависимый NF- κ B путь, предотвращая фосфорилирование основных белков пути, что не наблюдается в случае с контрольной киПК. Akt-фосфорилирование и активация NF- κ B и p65 снижены. Нокдаун тескальцина уменьшает выживаемость раковых клеток *in vitro*. Применение киПК, вызывающей нокдаун гена *TESC*, на 80% снижает развитие опухоли в случае рака толстой кишки [3]. Уровень экспрессии тескальцина в раковых тканях значительно коррелирует с клинико-патологическими повреждениями тканей раковых больных: поражение лимфатических узлов, стадия Дюкса, глубина инвазии, степень дифференцировки опухоли. В образцах сыворотки концентрация тескальцина в раковых тканях была больше, чем в нормальных, но между образцами разных стадий рака не было разницы в концентрациях тескальцина [3].

Тескальцин каким-то пока неясным образом влияет на экспрессию PTEN, супрессора большинства опухолей. В то же время он влияет на клеточную пролиферацию, клеточный рост и онкогенность опухоли CRC. Авторы выдвигают гипотезу, что тескальцин может регулировать пролиферативную активность клеток рака толстой кишки через Akt-зависимый NF- κ B сигнальный путь. Это позволяет предположить будущее использование тескальцина в качестве белка-онкомаркера [3].

На данный момент отсутствует должная степень прогнозирования рака толстой кишки, и использование уровня экспрессии тескальцина в качестве маркера диагностики могло бы послужить увеличению эффективности прогнозирования CRC. Так, общая средняя выживаемость больных раком толстой киш-

ки с высоким уровнем экспрессии тескальцина ниже выживаемости больных с низким уровнем экспрессии этого белка [3].

Взаимодействие тескальцина с NHE1 вовлечено в патогенез острого миелоидного лейкоза (FLT3-ITD⁺ AML). Было показано, что в клеточных линиях острого миелоидного лейкоза MOLM-13 и MV4-11 тескальцин сверхэкспрессируется, а его нокдаун с помощью киПК вызывает ацидоз и апоптоз раковых клеток. Кроме того, *TESC* — один из генов, экспрессия которого наблюдается в период формирования устойчивости раковых клеток к противоопухолевому препарату сорафенибу (Sorafenib). Ингибирование NHE1 также вызывает подавление устойчивости и более продолжительный эффект от лечения сорафенибом [37].

Заключение

Таким образом, показана ассоциация тескальцина с онкологическими заболеваниями и возможность его применения в качестве диагностического онкомаркера. Исследования показали его участие в развитии головного мозга человека и, на клеточном уровне, в процессе дифференцировки определенных клеток. Описано взаимодействие тескальцина с субъединицей 4 сигналысомы COP9, NHE1 и его участие в сигнальных путях митоген-активируемой протеинкиназы и регулируемой транскрипции генов. Для более глубокого понимания возможных молекулярных механизмов регуляции клеточных функций тескальцина необходимы дальнейшие исследования.

Благодарности

Работа финансировалась за счет гранта Российского фонда фундаментальных исследований 15-44-02509 р_поволжье_а. Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров и субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Gutierrez-Ford C., Levay K., Gomes A.V. et al. Characterization of tescalcin, a novel EF-hand protein with a single Ca²⁺-binding site: metal-binding properties, localization in tissues and cells, and effect on calcineurin. *Biochemistry* 2003; 42(49): 14553-65.
2. Zhou Y., Yang W., Kirberger M. et al. Prediction of EF-hand calcium-binding proteins and analysis of bacterial EF-hand proteins. *Proteins* 2006; 65(3): 643-55.
3. Kang Y.H., Han S.R., Kim J.T. et al. The EF-hand calcium-binding protein tescalcin is a potential oncotarget in colorectal cancer. *Oncotarget* 2014; 5(8): 2149-60.
4. Henikoff S., Greene E.A., Pietrokovski S. et al. Gene families: the taxonomy of protein paralogs and chimeras. *Science* 1997; 278(5338): 609-14.
5. Kretsinger R.H., Nockolds C.E. Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description. *J. Biol. Chem.* 1973; 248(9): 3313-26.
6. Lewit-Bentley A., Rety S. EF-hand calcium-binding proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2000; 10(6): 637-43.
7. Kawasaki H., Nakayama S., Kretsinger R.H. Classification and evolution of EF-hand proteins. *Biometals* 1998; 11(4): 277-95.
8. Falke J.J., Drake S.K., Hazard A.L. et al. Molecular tuning of ion binding to calcium signaling proteins. *Q. Rev. Biophys.* 1994; 27(3): 219-90.
9. Gifford, J.L., Walsh M.P., Vogel H.J. Structures and metal-ion-binding properties of the Ca²⁺-binding helix-loop-helix EF-hand motifs. *Biochemical J.* 2007; 405(2): 199-221.

10. Nagae M., Nozawa A., Koizumi N. et al. The crystal structure of the novel calcium-binding protein AtCBL2 from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(43): 42240-6.
11. Blanchard H., Grochulski P., Li Y. et al. Structure of a calpain Ca(2+)-binding domain reveals a novel EF-hand and Ca(2+)-induced conformational changes. *Nat. Struct. Biol.* 1997; 4(7): 532-8.
12. Jia J., Tarabykina S., Hansen C. et al. Structure of apoptosis-linked protein ALG-2: insights into Ca²⁺-induced changes in penta-EF-hand proteins. *Structure* 2001; 9(4): 267-75.
13. Grabarek Z. Structural basis for diversity of the EF-hand calcium-binding proteins. *J. Mol. Biol.* 2006; 359(3): 509-25.
14. Malmendal A., Evenäs J., Forsén S. et al. Structural dynamics in the C-terminal domain of calmodulin at low calcium levels. *J. Mol. Biol.* 1999; 293(4): 883-99.
15. Biekofsky R.R., Feeney J. Cooperative cyclic interactions involved in metal binding to pairs of sites in EF-hand proteins. *FEBS Lett.* 1998; 439(1-2): 101-6.
16. Finn B.E., Kördel J., Thulin E. et al. Dissection of calbindin D9k into two Ca(2+)-binding subdomains by a combination of mutagenesis and chemical cleavage. *FEBS Lett.* 1992; 298(2-3): 211-4.
17. Linse S., Forsen S. Determinants that govern high-affinity calcium binding. *Adv. Second Mess. Phosph. Res.* 1995; 30: 89-151.
18. Perera E.M., Martin H., Seehunvong T. et al. Tescalcin, a novel gene encoding a putative EF-hand Ca(2+)-binding protein, Col9a3, and renin are expressed in the mouse testis during the early stages of gonadal differentiation. *Endocrinology* 2001; 142(1): 455-63.

19. Potter J.D., Gergely J. The calcium and magnesium binding sites on troponin and their role in the regulation of myofibrillar adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 1975; 250(12): 4628-33.
20. Bhattacharya S., Bunick C.G., Chazin W.J. Target selectivity in EF-hand calcium binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 2004; 1742(1-3): 69-79.
21. Malmendal A., Linse S., Evenäs J. et al. Battle for the EF-hands: magnesium-calcium interference in calmodulin. *Biochemistry* 1999; 38(36): 11844-50.
22. Brodersen D.E., Nyborg J., Kjeldgaard M. Zinc-binding site of an S100 protein revealed. Two crystal structures of Ca²⁺-bound human psoriasin (S100A7) in the Zn²⁺-loaded and Zn²⁺-free states. *Biochemistry* 1999; 38(6): 1695-704.
23. Perera E.M., Bao Y., Kos L. et al. Structural and functional characterization of the mouse tescalcin promoter. *Gene* 2010; 464(1-2): 50-62.
24. Zozulya S., Stryer L. Calcium-myristoyl protein switch. *PNAS USA* 1992; 89(23): 11569-73.
25. Mailander J., Muller-Esterl W., Dedio J. Human homolog of mouse tescalcin associates with Na(+)/H(+) exchanger type-1. *FEBS Lett.* 2001; 507(3): 331-5.
26. Li G.D., Zhang X., Li R. et al., CHP2 activates the calcineurin/nuclear factor of activated T cells signaling pathway and enhances the oncogenic potential of HEK293 cells. *J. Biol. Chem.* 2008; 283(47): 32660-8.
27. Levay K., Slepak V.Z. Regulation of Cop9 signalosome activity by the EF-hand Ca²⁺-binding protein tescalcin. *J. Cell. Sci.* 2014; 127(Pt 11): 2448-59.
28. Levay K., Slepak V.Z. Tescalcin is an essential factor in megakaryocytic differentiation associated with Ets family gene expression. *J. Clin. Invest.* 2007; 117(9): 2672-83.
29. Levay K., Slepak V.Z. Up- or downregulation of tescalcin in HL-60 cells is associated with their differentiation to either granulocytic or macrophage-like lineage. *Exp. Cell. Res.* 2010; 316(7): 1254-62.
30. Li X., Liu Y., Kay C.M. et al., The Na⁺/H⁺ exchanger cytoplasmic tail: structure, function, and interactions with tescalcin. *Biochemistry* 2003; 42(24): 7448-56.
31. Malo M.E., Fliegel L. Physiological role and regulation of the Na⁺/H⁺ exchanger. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2006; 84(11): 1081-95.
32. Zaun H.C., Shrier A., Orłowski J. Calcineurin B homologous protein 3 promotes the biosynthetic maturation, cell surface stability, and optimal transport of the Na⁺/H⁺ exchanger NHE1 isoform. *J. Biol. Chem.* 2008; 283(18): 12456-67.
33. Dannlowski U., Grabe H.J., Wittfeld K. et al. Multimodal imaging of a tescalcin (TESC)-regulating polymorphism (rs7294919)-specific effects on hippocampal gray matter structure. *Mol. Psychiatry.* 2015; 20(3): 398-404.
34. Ukarapong S., Bao Y., Perera E.M. et al. Megakaryocyte development is normal in mice with targeted disruption of Tescalcin. *Exp. Cell. Res.* 2012; 318(5): 662-9.
35. Wei N., Deng X.W. The COP9 signalosome. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2003; 19: 261-86.
36. Kato J.Y., Yoneda-Kato N. Mammalian COP9 signalosome. *Genes Cells.* 2009; 14(11): 1209-25.
37. Man C.H., Lam S.S., Sun M.K. et al. A novel tescalcin-sodium/hydrogen exchange axis underlying sorafenib resistance in FLT3-ITD+ AML. *Blood.* 2014; 123(16): 2530-9.

Поступила: 06.12.2014