

**Белки семейства нейрональных кальциевых сенсоров как мишени окислительного стресса клеток ретинобластомы**

**Научный руководитель – Зерний Евгений Юрьевич**

***Камышева Анна Леонидовна***

*Студент (специалист)*

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

*E-mail: annakamysheva@mail.ru*

Ретинобластома - наиболее распространенная внутриглазная опухоль у детей, развивающаяся из клеток предшественников нейронов и глиальных клеток сетчатки. Ретинобластома составляет 3% от всех ювенильных онкологических заболеваний и в отсутствие лечения приводит к летальному исходу [1]. Одним из перспективных способов подавления роста раковых опухолей, включая ретинобластому, является индукция окислительного стресса и апоптоза клеток, входящих в ее состав. Считается, что окислительная (дисульфидная) димеризация рековерина и NCS1 - белков сетчатки, относящихся к семейству нейрональных кальциевых сенсоров (НКС) - инициирует сигнальный каскад, запускающий апоптоз нейронов этой ткани [2]. Поскольку указанные НКС характеризуются повышенной экспрессией в клетках ретинобластомы, индукция их окисления может рассматриваться в качестве потенциального элемента терапии в отношении этого вида рака [3].

Целью работы является определение редокс-статуса рековерина и NCS1 при окислительном стрессе клеток линии ретинобластомы Y79, а также выявление внутриклеточных условий, способствующих окислению этих белков. С применением метода иммуноблоттинга и других подходов показано, что окислительный стресс клеток Y79 сопровождается накоплением дисульфидных димеров рековерина и NCS1. Получены рекомбинантные формы рековерина и NCS1 путем экспрессии соответствующих генетических конструкций в бактериальных клетках и выделения целевых белков методами гидрофобной и ионообменной хроматографии. С использованием методов электрофореза в невозстанавливающих условиях, а также теста Элмана определены факторы, способствующие образованию дисульфидных димеров рековерина и NCS1 *in vitro*. Показано, что димеризация обоих исследуемых белков ингибируется в присутствии денатурирующего агента, что указывает на специфичность и структурную детерминированность этого процесса. Установлено, что наиболее эффективно окисляются апо- и Zn<sup>2+</sup>-связанная формы NCS1, а также Ca<sup>2+</sup>-связанная и Zn<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-связанная формы рековерина. Продемонстрировано, что восприимчивость рековерина и NCS1 к окислению определяется изменением поверхностной доступности их сульфгидрильных групп, в зависимости от внутриклеточных условий, оказывающих влияние на конформацию этих белков. Установлено, что в NCS1 SH-группа оказывается наиболее экспонированной в отсутствие физиологических катионов, а также в присутствии цинка, в то время как в рековерине - при одновременном присутствии ионов кальция и цинка. На основании полученных данных высказано предположение, что повышение внутриклеточной концентрации цинка, сопровождающее окислительный стресс, вызывает накопление дисульфидных димеров NCS1 и рековерина, а значит факторы, способствующие этому повышению, могут индуцировать апоптоз раковых клеток.

**Источники и литература**

- 1 Rao R, Honavar SG. Retinoblastoma // Indian J Pediatr. 2017 Dec;84(12):937-944.
- 2 Zernii EY, Nazipova AA, Nemashkalova EL, Kazakov AS, Gancharova OS, Serebryakova MV, Tikhomirova NK, Baksheeva VE, Vladimirov VI, Zinchenko DV, Philippov PP, Senin II, Permyakov SE. Light-Induced Thiol Oxidation of Recoverin Affects Rhodopsin Desensitization // Front Mol Neurosci. 2019 Jan 7;11:474.
- 3 Oshikawa M, Tsutsui C, Ikegami T, Fuchida Y, Matsubara M, Toyama S, Usami R, Ohtoko K, Kato S. Full-length transcriptome analysis of human retina-derived cell lines ARPE-19 and Y79 using the vector-capping method // Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011 Aug 22;52(9):6662-70.