

Роль белка PML в транспорте кальция в митохондриях клеток HeLa**Научный руководитель – Фонин Александр Владимирович****Ноздрачева Александра Валерьевна***Аспирант*Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург,
Россия*E-mail: shurupchi@mail.ru*

Транспорт ионов кальция играет важную роль в различных процессах метаболизма клетки, например, регулирует функциональную активность, динамику и морфологию митохондрий [2]. Транспорт кальция из ЭПР в митохондрии происходит в так называемых mitochondria associated membranes (MAMs), где одним из ключевых участников является семейство 1,4,5 трифосфат инозитол рецепторов (IP3Rs) [1]. Белок промиелоцитарного лейкоза (PML) является одним из регуляторов активности IP3R [3].

В данной работе были исследованы изменения концентрации свободных ионов кальция в цитоплазме $[Ca^{2+}]_i$ с помощью Fura-2 и в ЭПР $[Ca^{2+}]_{er}$ с помощью R-CEPIAer, а также изменения митохондриального потенциала ($\Delta\Psi_m$), регистрируемые с помощью потенциал-чувствительных зондов Rh123 и TMRM в контрольных клетках HeLa дикого типа и нокаутированных по гену *PML* при действии гистамина ($10\ \mu M$), вызывающего мобилизацию Ca^{2+} из ЭПР через IP3Rs, при действии протонофора FCCP ($2\ \mu M$ для Fura-2, R-CEPIAer и Rh123 и $0,2\ \mu M$, $0,6\ \mu M$, $2\ \mu M$, $6\ \mu M$ для TMRM), вызывающего полную деполяризацию митохондрий и при действии иономицина ($2\ \mu M$), опустошающего внутриклеточные запасы Ca^{2+} . Для флуоресцентного сигнала TMRM качестве референтного сигнала использовалась флуоресценция МитоТрекера Зеленого (MTG), который селективно связывается с митохондриями, но остается в матриксе даже после их полной деполяризации. Также с помощью сопоставления флуоресцентных сигналов Rh123 и NADH, служащего основным субстратом дыхательной цепи, было проверено, могут ли отличия сигналов Rh123 и TMRM при действии протонофора FCCP быть вызваны отличиями в свойствах дыхательной цепи в HeLa дикого типа и нокаутных по гену *PML*.

Транзиторный рост $[Ca^{2+}]_i$, вызванный иономицином в бескальциевом буфере обусловлен выходом Ca^{2+} в цитозоль не из митохондрий, а из другого внутриклеточного депо Ca^{2+} . Одновременные измерения $[Ca^{2+}]_{er}$ и $\Delta\Psi_m$ показали, что действие гистамина приводит к небольшой деполяризации митохондрий. Деполяризация митохондрий с помощью протонофора FCCP в бескальциевом буфере вызвала в HeLa дикого типа гораздо большее падение $\Delta\Psi_m$, чем гистамин, тогда как в HeLa, нокаутных по гену *PML*, примерно такую же деполяризацию, как и гистамин. Митохондрии HeLa, нокаутных по гену *PML*, менее чувствительны к деполяризации, вызванной протонофором FCCP. Нокаут белка PML приводит к морфологическим изменениям клеток HeLa и изменениям кальциевого гомеостаза.

Источники и литература

- 1) Barazzuol L., Giamogante F., Calì T. Mitochondria Associated Membranes (MAMs): Architecture and physiopathological role. *Cell Calcium*. 2021; 94
- 2) Berridge M.J. The inositol trisphosphate/calcium signaling pathway in health and disease. *Physiol. Rev.* 2016; 96 (4): 1261–1296

- 3) Giorgi C., Ito K., Lin H.K., Santangelo C., Wieckowski M.R., Lebiedzinska M., Bononi A., Bonora M., Duszynski J., Bernardi R., Rizzuto R., Tacchetti C., Pinton P., Pandolfi P.P. PML regulates apoptosis at endoplasmic reticulum by modulating calcium release. Science. 2010; 330 (6008): 1247–1251

Иллюстрации

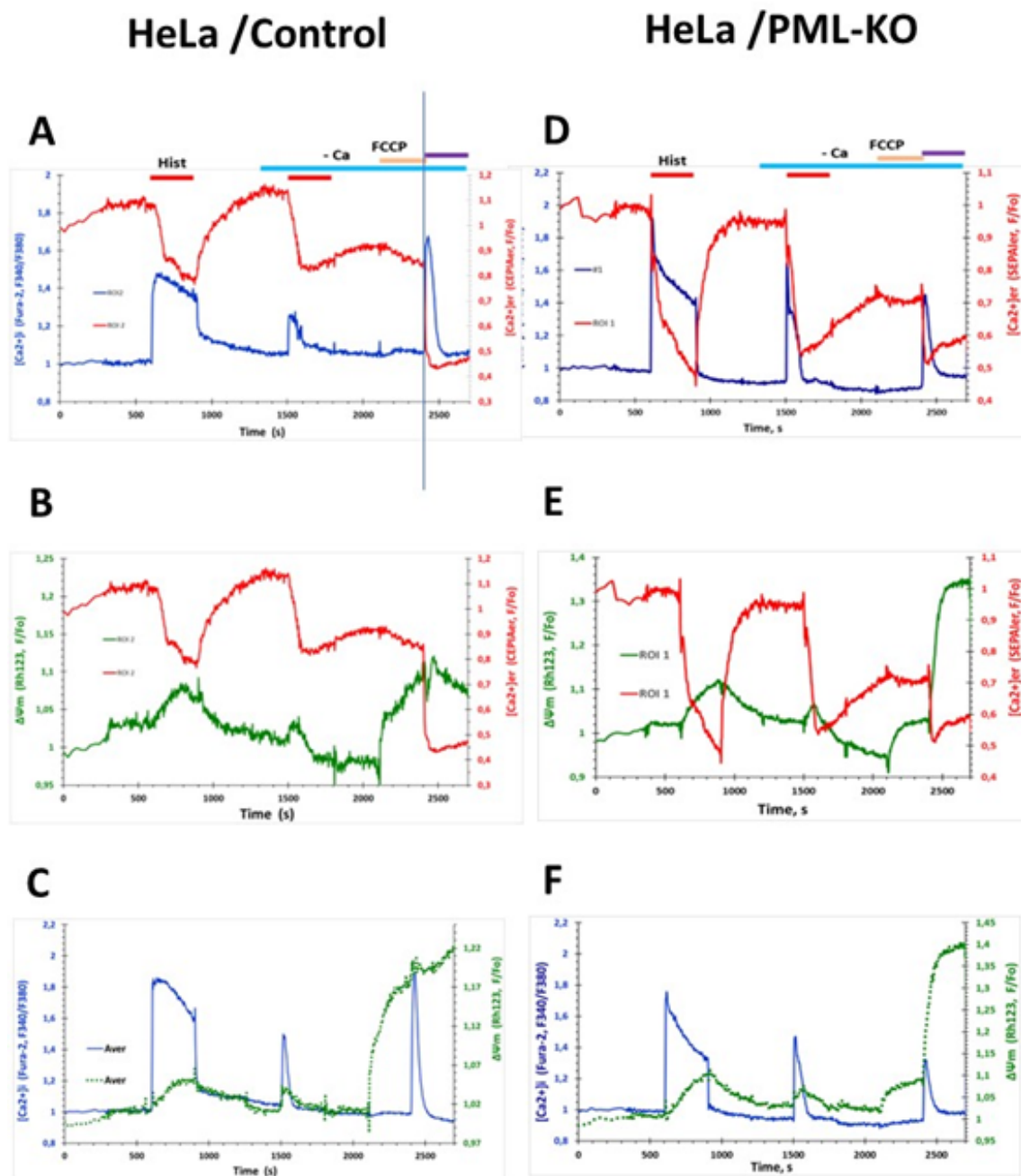


Рис. : Изменения концентрации свободного кальция в цитоплазме и в ЭПР, и изменения митохондриального потенциала в клетках HeLa дикого типа (Control) и нокаутных по гену PML (PML-KO)

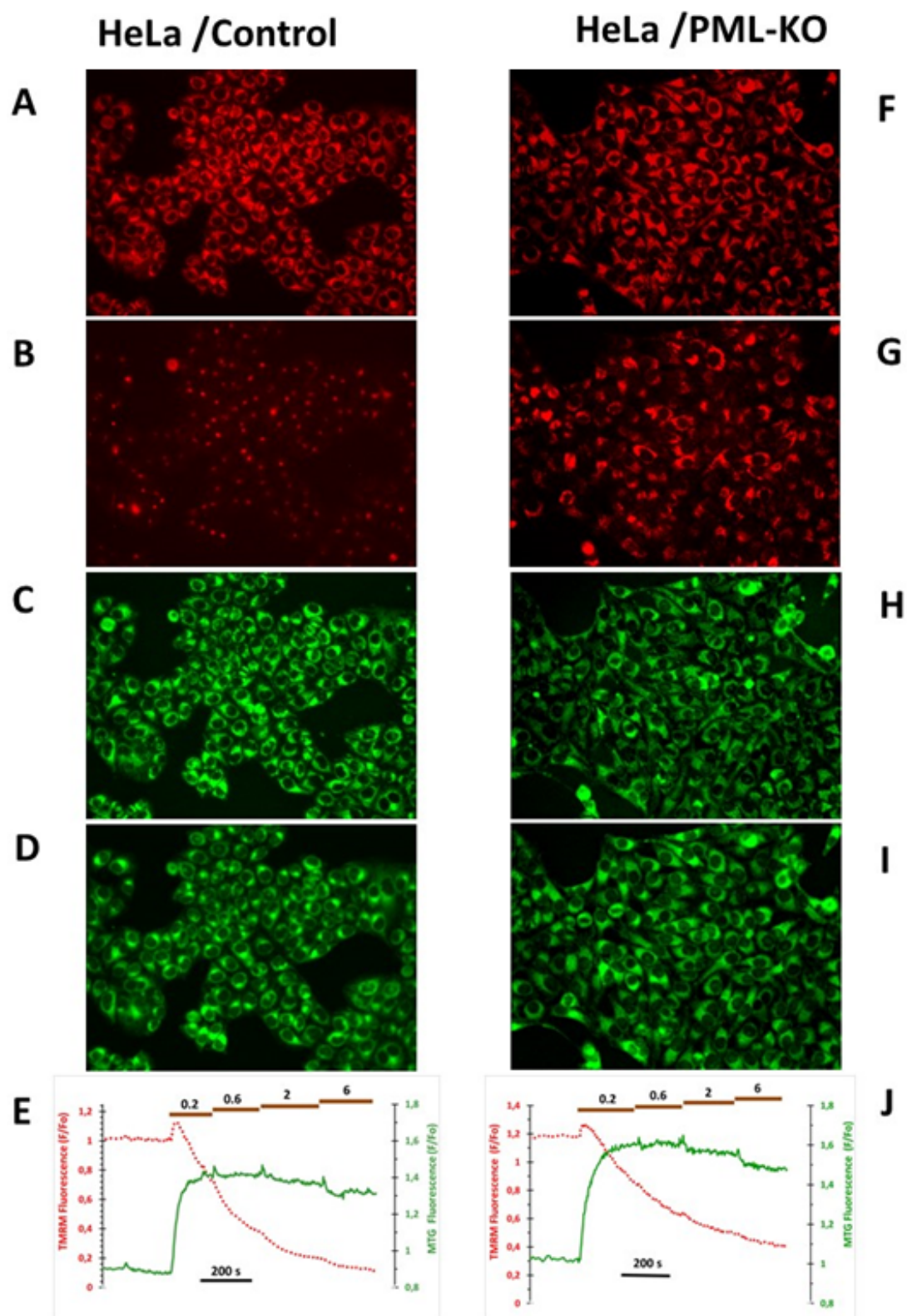


Рис. : Флуоресцентные изображения клеток HeLa дикого типа (Control) и нокаутных по гену PML (PML-KO), нагруженных потенциал-чувствительным флуоресцентным зондом TMRM и MTG и динамика зависимости их флуоресценции от концентрации протонофора FCCP

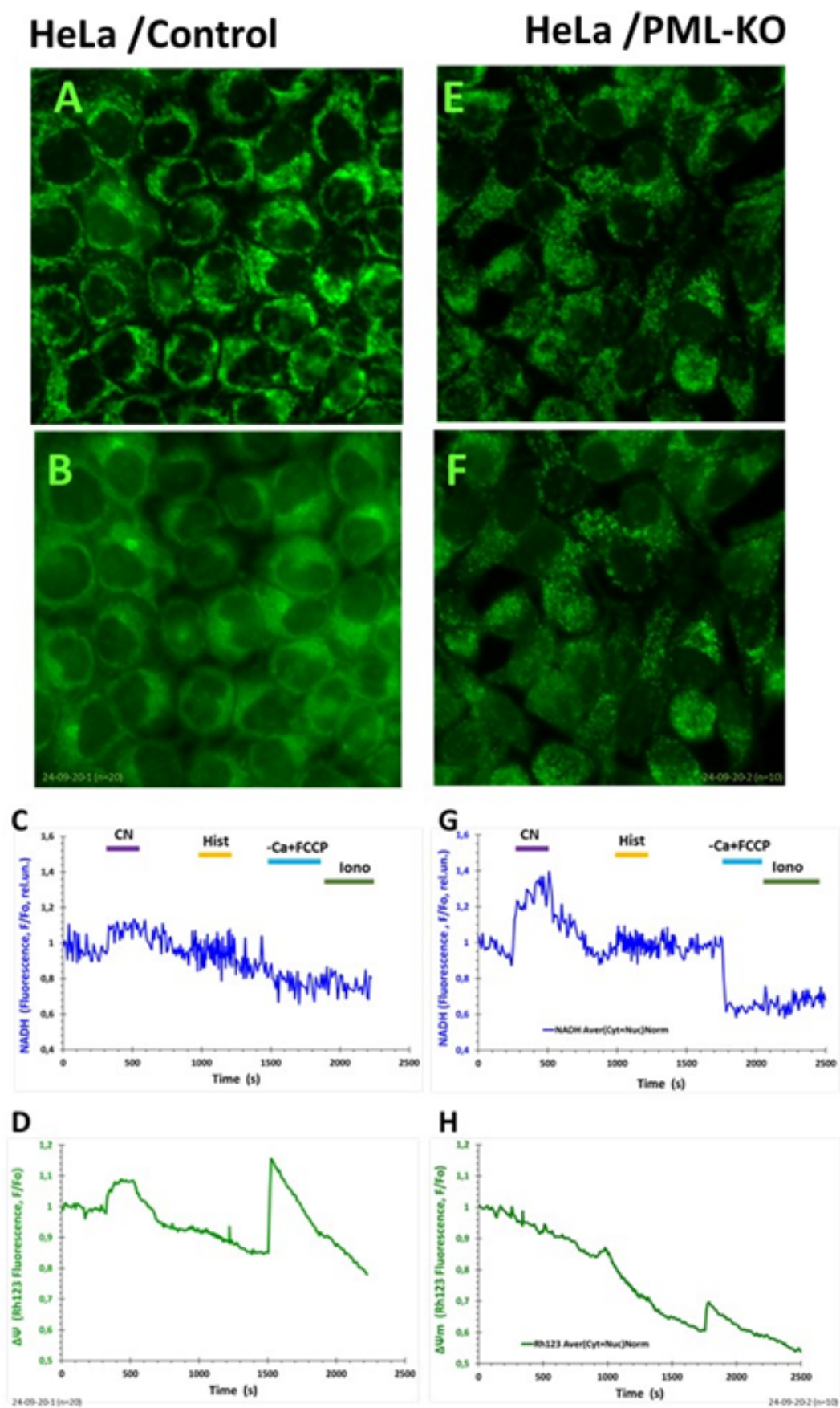


Рис. : Влияние блокады дыхательной цепи и полной деполяризации митохондрий на потребление NADH и изменения митохондриального потенциала