

РЕКОНСТРУКЦИЯ КАЛЬЦИЕВОГО КАНАЛА Orai3 В ЛИПОСОМАХ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ФУНКЦИИ ЭТОГО БЕЛКА

© 2023 Ch. Liang¹, F. Wu^{1,2*}

¹ Hubei University of Medicine, School of Basic Medical Sciences, 442000 Shiyan, China

² Nankai University, College of Life Sciences, Department of Genetics and Cell Biology, 300071 Tianjin, China; e-mail: wufuyun@hbm.u.edu.cn

Поступила в редакцию 29.03.2023

После доработки 14.07.2023

Принята к публикации 02.08.2023

Депо-управляемый вход кальция (store-operated calcium entry, SOCE) является основным механизмом притока Ca^{2+} в невозбудимые клетки. Основными компонентами SOCE являются молекула стромального взаимодействия 1 (stromal interaction molecule 1, STIM1), локализованная в эндоплазматическом ретикулуме, и активируемый в результате высвобождения ионов кальция Ca^{2+} -канал (Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel, CRAC) Orai, локализованный на плазматической мембране. Механизм SOCE требует взаимодействия между белками STIM1 и Orai. В клетках млекопитающих были выявлены три гомолога Orai: Orai1, Orai2 и Orai3. Хотя белок Orai1 был широко изучен, и было показано, что он необходим для множества клеточных процессов, Orai3 также недавно привлёк к себе значительное внимание. Механизмы запуска и активации канала Orai3 ещё полностью не выяснены. В настоящей работе нами был экспрессирован, очищен и реконструирован в липосомах белок Orai3. В полученных протеолипосомах была изучена ориентация и олигомерное состояние этого белка. Показано, что белок STIM1 взаимодействует с Orai3-содержащими протеолипосомами и опосредует высвобождение из них ионов кальция. Это указывает на функционально активное состояние канала Orai3 и то, что рекомбинантный белок STIM1 может напрямую открывать канал Orai3 в условиях *in vitro*. Разработанная нами система высвобождения ионов кальция *in vitro* может быть использована для изучения структуры, функции и фармакологических свойств канала Orai3.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: депо-управляемый вход ионов Ca^{2+} , Orai3, STIM1, реконструкция, липосомы.

DOI: 10.31857/S0320972523090099, EDN: WUNVBK

ВВЕДЕНИЕ

Ионы Ca^{2+} являются важным вторичным мессенджером, который участвует практически во всех физиологических процессах в клетке. Нарушения внутриклеточного гомеостаза кальция зачастую связаны с различными заболеваниями [1, 2]. Депо-управляемый вход кальция (store-operated calcium entry, SOCE) является одним из основных механизмов поступления внеклеточного кальция в клетки млекопитающих и центральным механизмом регуляции кальций-зависимой передачи сигнала в невозбудимых клетках. Ключевыми элементами процесса активации SOCE являются белок STIM1 (stromal interaction molecule 1, молекула стромального взаимодействия 1) и бе-

лок Orai1 [3–6]. Известно, что белок Orai1 образует высокоселективные кальциевые каналы в плазматической мембране. Показана связь недостатка Orai1 со многими заболеваниями, такими как иммунодефицит, мышечная гипотония и ангидротическая эктодермальная дисплазия [7–9]. У млекопитающих идентифицированы три белка Orai (Orai1, Orai2 и Orai3), которые имеют высокую степень гомологии аминокислотных последовательностей, но проявляют различные функциональные свойства [10–12]. Из этих трёх белков Orai1 вносит наибольший вклад в SOCE, взаимодействуя с белком STIM1. Поэтому его структура, функции и механизм активации были подробно изучены [13–15]. Orai1 представляет собой белок с четырьмя трансмембранными доменами,

Принятые сокращения: SOCE – store-operated calcium entry, депо-управляемый вход кальция; STIM1 – stromal interaction molecule 1, молекула стромального взаимодействия 1.

* Адресат для корреспонденции.

оба конца которого расположены в цитозоле, и он функционирует как гексамерный комплекс [16]. STIM1 представляет собой однопроходной белок мембраны эндоплазматического ретикулума (ЭР) с люминальным *N*-концевым участком, содержащим два мотива EF-ручка (EF-hand) и стерильный альфа-мотив (sterile alpha motif, SAM). С-Концевой участок белка STIM1 экспонирован в цитозоль. При истощении запасов кальция в ЭР белок STIM1 посредством своего домена EF-ручка реагирует на снижение концентрации ионов Ca^{2+} в ЭР. Это выражается в кластеризации белков и их транслокации в область стыковки мембран ЭР и плазматической мембраны. SOAR-домен белка STIM1 отвечает за связывание с *N*- и *C*-концевыми фрагментами Orai1 для обеспечения открытия канала [14, 17]. Канал Orai1 играет ключевую роль во многих клеточных функциях и ассоциирован со многими заболеваниями. Мутация R91W в белке Orai1 вызывает блокировку процесса активации канала, что приводит к тяжёлому комбинированному иммунодефициту (severe combined immunodeficiency, SCID) у пациентов [8]. Мутации с усилением функции (gain-of-function mutations) в белке Orai1, вызывающие конститутивную активность канала, приводят к возникновению несиндромальной тубулярной агрегатной миопатии и синдрома тромбоцитов Йорка, а также синдрома Сторморкен [18, 19].

Белок Orai3 является уникальным каналом, экспрессия которого наблюдается только у млекопитающих. Участвующие в образовании пор трансмембранные домены всех трёх белков Orai демонстрируют высокую степень консервативности. Как и Orai1, Orai3 представляет собой белок, образованный четырьмя трансмембранными доменами, и его *N*- и *C*-концевые фрагменты экспонированы в цитоплазму [20–22]. Показано, что белок Orai3 также индуцирует SOCE, однако величина притока кальция в этом случае меньше, чем в случае Orai1. Кроме того, Orai3 связывается с Orai1 с образованием гетеромультимерных Ca^{2+} -каналов, регулируемых арахидоновой кислотой (arachidonic acid-regulated Ca^{2+} , ARC), и Ca^{2+} -каналов, регулируемых лейкотриеном C4 (leukotriene C4 (LTC4)-regulated, LRC), но эти каналы являются депо-независимыми [23–26]. Недавно была показана критическая роль белка Orai3 в прогрессировании многих видов рака, например, рака молочной железы, экспрессирующего эстрогеновые рецепторы (ER⁺), немелкоклеточного рака лёгкого и рака предстательной железы [27–29]. Было также показано, что Orai3 способствует

ремоделированию гладкомышечных клеток сосудов при повреждении сосудов и аутоиммунных заболеваниях [30, 31]. Хотя в последние годы белок Orai3 привлёк значительное внимание исследователей, тем не менее механизмы его запуска и активации ещё полностью не выяснены. Реконструкция мембранных белков в липосомах оказалась мощным инструментом для изучения функции мембранных белков в упрощённой среде, которая, тем не менее, имитирует их нативную липидную среду [32, 33]. В настоящей работе нами были экспрессированы белок Orai3 и домен SOAR белка STIM1 в клетках *Escherichia coli* и получены их очищенные препараты. Солюбилизованный детергентом белок Orai3 был нами реконструирован в липосомах. В полученных протеолипосомах была изучена ориентация и олигомерное состояние этого канала. С помощью такой системы мы показали, что STIM1 может непосредственно вызывать высвобождение ионов кальция из протеолипосом, содержащих Orai3. Полученные нами результаты указывают на то, что реконструкция мембранного белка Orai3 в липосомах является эффективным инструментом для изучения функций каналов Orai3 *in vitro*. Этот метод может способствовать разработке новых стратегий для изучения молекулярных механизмов действия каналов Orai3 и разработки новых препаратов направленного действия для лечения заболеваний.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Плазмиды. Полный ген белка Orai3 человека был клонирован в вектор pGEX-6P-1 с прикреплением метки HA к *C*-концу. Фрагмент белка STIM1 человека из аминокислотных остатков 342–531 (STIM1 (a.o. 342–531)) был клонирован в вектор pET-28a с меткой Flag на *C*-конце. С полными последовательностями плазмид можно ознакомиться в Приложении.

Экспрессия и очистка белка. Чтобы вызвать экспрессию белков GST-Orai3-HA и His₆-STIM1 (342–531)-Flag, клетки *E. coli* Rosetta DE3 («Novagen», США) были трансформированы плазмидами. Клетки *E. coli* выращивали в среде LB при 37 °C до достижения значения оптической плотности среды при 600 нм (OD₆₀₀), равной 0,8. Индукцию экспрессии белка осуществляли путём добавления 0,5 мМ изопропил-β-D-тиогаляктозида на 12 ч при 24 °C. Клетки собирали и затем лизировали с помощью ультразвука в растворе 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0), содержащем 300 мМ NaCl и набор ингибиторов протеаз («Roche», Швей-

цария). Чтобы очистить белок GST-Orai3-НА, суммарные клеточные мембраны осаждали в ходе ультрацентрифугирования при 182 000 g в течение 1 ч при 4 °С. Полученный осадок гомогенизировали и солюбилизировали в 50 mM буфера Tris-HCl (pH 8,0), содержащего 300 mM NaCl и 2% (v/v) Triton X-100, в течение 2 ч. Нерастворимые остатки клеток удаляли при центрифугировании в режиме 100 000 g в течение 30 мин при 4 °С, и полученный супернатант инкубировали с гранулами глутатион-сефарозы («GE Healthcare», США). Затем гранулы промывали 50 mM буфера Tris-HCl (pH 8,0), содержащего 300 mM NaCl и 0,1% (v/v) Triton X-100. Связавшиеся с гранулами белки элюировали 10 mM восстановленного глутатиона в 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), содержащего 300 mM NaCl. Далее белок GST-Orai3-НА очищали путём гель-фильтрации с использованием 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), содержащего 300 mM NaCl и 0,1% (v/v) Triton X-100, на колонке Superdex 200 («GE Healthcare»), предварительно уравновешенной тем же буфером. Для очистки STIM1 (а.о. 342–531) клетки выращивали и затем лизировали с помощью ультразвука в 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), содержащего 300 mM NaCl, 4 mM имидазола и 2 mM β-меркаптоэтанола. Лизаты клеток осветляли путём центрифугирования при 38 900 g в течение 1 ч при 4 °С. Рекombинантный белок очищали с помощью хроматографии на колонке Ni-NTA («Qiagen», США). После нанесения раствора белка смолу промывали 20 mM имидазола в 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), содержащего 300 mM NaCl, и связавшийся белок элюировали 400 mM имидазола. Белок His-STIM1 (342–531)-Flag дополнительно очищали с помощью ионообменной хроматографии с использованием колонки HiTrap Q HP («GE Healthcare»), предварительно уравновешенной буфером А (20 mM Tris-HCl, pH 8,0). Образцы белка наносили на колонку с использованием петли объёмом 5 мл. Колонку промывали пятью объёмами буфера А. Связавшиеся белки элюировали с колонки линейным градиентом концентрации NaCl (от 0 до 1 M NaCl в пяти объёмах колонки).

Анализ белков путём совместного осаждения (pull-down assay). Меченные биотином концевые пептиды белка Orai3 были синтезированы «GL Biochem» (Шанхай, Китай). Пептиды иммобилизовывали на гранулах стрептактин сефарозы («Qiagen») и инкубировали с очищенным STIM1 (а.о. 342–531) в течение 1 ч при 4 °С. Гранулы промывали три раза и кипятили в двухкратном буфере для образцов белка, содержащем додецилсульфат натрия (SDS). Далее белки разделяли с использовани-

ем электрофореза в ПААГ в присутствии SDS (SDS-PAGE), и затем подвергали Вестерн-блоттингу с использованием антител против Flag.

Вестерн-блоттинг. Образцы белков подвергали разделению с использованием SDS-PAGE, и разделённые белки переносили на поливинилиденфторидную (PVDF) мембрану. Мембрану блокировали в течение 1 ч 5%-ным обезжиренным молоком в солевом растворе с Tris-буфером, содержащим 0,1%-ный Tween 20 (TBST), и затем инкубировали в течение ночи с первичными антителами при 4 °С. Затем мембрану промывали три раза в TBST и в течение 1 ч инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP). Белковые полосы идентифицировали с помощью реагента ECL Western blotting substrate («Pierce», США).

Получение липосом. Препараты 1,2-пальмитоил-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (POPC), 1,2-пальмитоил-олеоил-sn-глицеро-3-фосфосерина (POPS) и меченного родамином 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфоэтанол-амина, DPPE (Rho-PE), были получены от «Avanti Polar Lipids» (Алабастер, США). Липосомы приготавливали в стеклянной пробирке с помощью раствора липида (10 mM) в хлороформе (83,5% POPC, 15% POPS, 1,5% Rho-PE). Липиды высушивали под мягким потоком азота до образования тонкой плёнки и затем сушили в вакуумном эксикаторе в течение ночи. Далее плёнки липида увлажняли с использованием буфера Hepes (25 mM Hepes, 100 mM KCl), после чего 10 раз замораживали и размораживали. Для получения однослойных липосом суспензию липидов 10 раз пропустили под давлением через поликарбонатные фильтры с диаметром пор, равным 100 нм («Whatman», Великобритания), с использованием аппарата Mini-Extruder («Avanti Polar Lipids»).

Реконструкция белка в липосомах. Очищенный белок GST-Orai3-НА смешивали с липосомами в молярном соотношении 1 : 1000 (белок : общий липид). Конечная концентрация белка составляла 2 мкМ, а липидов – 2 mM. Для загрузки ионов Ca²⁺ в протеолипосомы в реконструкционную смесь добавляли Ca²⁺ до конечной концентрации, равной 200 мкМ. Эту смесь инкубировали при комнатной температуре при мягком встряхивании в течение 5 мин. Чтобы удалить детергент (Triton X-100), липосомы инкубировали при 4 °С с тремя сменами гранул Bio-Beads SM2 («Bio-Rad», США) – 20 мг гранул на 1 мл суспензии липосом. Реконструкционную смесь затем подвергали ультрацентрифугированию при 55 000 об./мин в течение 1 ч при 4 °С.

Полученный осадок промывали буфером Нерес и снова подвергали ультрацентрифугированию для удаления остатков ионов кальция. Ca^{2+} -содержащие протеолипосомы Orai3 ресуспендировали в буфере Нерес.

Флотационный анализ. Эффективность реконструкции белка определяли с помощью анализа флотации в градиенте сахарозы. Протеолипосомы (30 мкл) смешивали с 1,9 М сахарозы (100 мкл) и далее последовательно наслаивали 1,25 М (100 мкл) и 0,25 М (20 мкл) сахарозы. Образцы центрифугировали в течение 1 ч на роторе Beckman TLS 55 в режиме 55 000 об./мин при 4 °С. Градиент сахарозы собирали в виде пяти фракций, которые далее анализировали с помощью Вестерн-блоттинга.

Определение ориентации белка в липосомах. Протеолипосомы с белком GST-Orai3-НА инкубировали с протеазой 3С («Takara», Япония) или без неё в течение 3 ч при 4 °С. Реакцию останавливали путём добавления SDS-содержащего буфера для нанесения образцов, и образцы анализировали с помощью Вестерн-блоттинга с использованием антител против НА.

Определение олигомеров белков в липосомах. Протеолипосомы, содержащие GST-Orai3-НА, инкубировали с 1%-ным SDS или 1%-ным дигитонином при 4 °С в течение 1 ч и затем аккуратно наслаивали на верхний слой 5–25%-ного (w/v) градиента сахарозы. Образцы центрифугировали при 174 000 g и 4 °С в течение 2 ч. Градиент собирали в виде 14 фракций, которые затем анализировали с помощью Вестерн-блоттинга.

Определение потока кальция. После реконструкции белка GST-Orai3-НА в липосомах и их загрузки ионами Ca^{2+} функционирование Orai3 в качестве ионного канала оценивали с помощью метода определения потока ионов Ca^{2+} , основанного на измерении флуо-

ресценции с использованием пентанатриевой соли Fura-2 и ридера микропланшет. Контрольные липосомы и протеолипосомы, содержащие белок Orai3 (100 мкл), вносили в ячейки чёрной 96-ячеечной микропланшеты. В каждую ячейку добавляли краситель Fura-2 (конечная концентрация 50 мкМ), и микропланшеты инкубировали в течение 2 мин на ридере микропланшет SpectraMax i3x (установленный на режим прочтения конечной точки) до начала измерения в каждой ячейке сигнала флуоресценции при 510 нм (возбуждение при 340 нм и 380 нм) без добавления или после добавления STIM1 (а.о. 342–531) (2 мкМ) или детергента Triton X-100 (5 мкл). Соотношение интенсивности флуоресценции, $F_{340 \text{ нм}} / F_{380 \text{ нм}}$, для красителя Fura-2 было прямо пропорционально концентрации ионов Ca^{2+} .

Статистическая обработка результатов. Анализ полученных данных проводили с использованием программы GraphPad Prism 5. Полученные результаты представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка отклонения (SD). Различия между двумя группами определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Экспрессия и очистка белка Orai3 и фрагмента белка STIM1. Белки Orai1 и STIM1 являются ключевыми молекулами процесса активации SOCE, который зависит от взаимодействия между доменом SOAR (а.о. 344–442) белка STIM1 и *N*- и *C*-концевыми фрагментами белка Orai1 (рис. 1, а). Хотя Orai3 является гомологом белка Orai1, его уникальные функции остаются невыясненными. Чтобы определить функции белка Orai3 и создать эффективную

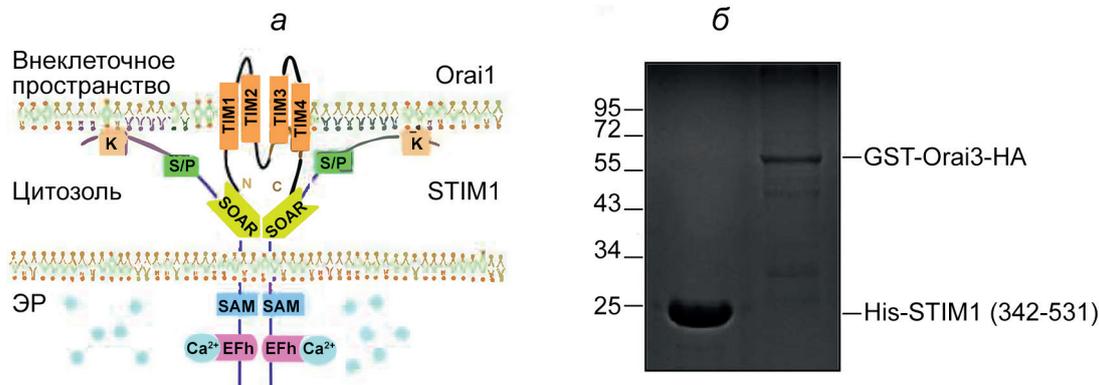


Рис. 1. Экспрессия и очистка Orai3 и STIM1 (а.о. 342–531). а – Схематичное изображение активации канала CRAC (Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel, активируемый в результате высвобождения ионов кальция Ca^{2+} -канал). Связывание SOAR-домена STIM1 с *N*- и *C*-концевыми фрагментами белка Orai1 приводит к открытию канала и проникновению ионов кальция. б – Окрашивание Кумасси бриллиантовым голубым очищенного Orai3 и STIM1 (а.о. 342–531)

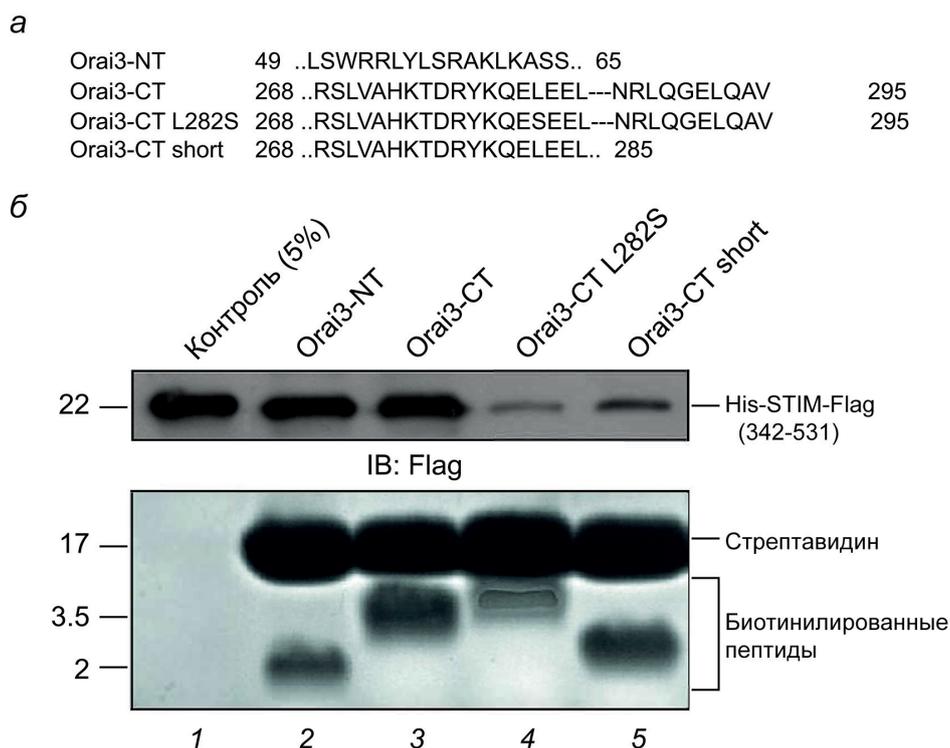


Рис. 2. Взаимодействия между STIM1 (а.о. 342–531) и *N*- и *C*-концевыми пептидами белка Orai3 (NT и CT соответственно). *a* – Аминокислотные последовательности синтетических пептидов белка Orai3. *б* – Анализ совместного осаждения (Pull-down assay) для определения связывания STIM1 (а.о. 342–531) и концевых пептидов белка Orai3. IB: Flag – антитела против Flag

и простую исследовательскую модель *in vitro*, полноразмерный белок Orai3 и фрагмент белка STIM1 (а.о. 342–531) были экспрессированы в клетках *E. coli* и далее очищены. Поскольку домен SOAR белка STIM1, как известно, трудно очистить, нами были протестированы несколько несущих домен SOAR конструкций, включая фрагменты STIM1 (а.о. 233–531), STIM1 (а.о. 310–531) и STIM1 (а.о. 342–531). Фрагмент оказалось легко выделить, и он демонстрировал более сильное связывание с Orai3. Реконбинантный белок Orai3 был помечен метками GST и HA, а STIM1 (а.о. 342–531) – метками His и Flag (рис. 1, б). Экспрессию и очистку белка GST-Orai3-HA (молекулярная масса ~ 58 кДа) подтверждали с помощью Вестерн-блоттинга с использованием антител против HA.

Взаимодействия между STIM1 (а.о. 342–531) и концевыми пептидами Orai3. В предыдущей работе мы показали, что STIM1 (а.о. 342–531) взаимодействует с каналом Orai [21]. В настоящей работе мы подтвердили с помощью метода совместного осаждения (pull-down assay) связывание STIM1 (а.о. 342–531) как с *N*-, так с *C*-концевыми фрагментами белка Orai3. С этой целью были синтезированы меченные биотином пептиды на основе последо-

вательностей белка Orai3 человека (рис. 2, *a*), которые связывали с гранулами, конъюгированными со стрептавидином. STIM1 (а.о. 342–531) инкубировали с гранулами при 4 °C в течение 1 ч. Гранулы осаждали, и связавшиеся с ними белки сначала разделяли с помощью SDS-PAGE, а затем визуализировали с помощью Вестерн-блоттинга с использованием антител против метки Flag. Очищенный STIM1 (а.о. 342–531) был способен физически взаимодействовать с *N*- и *C*-концевыми пептидами белка Orai3 (рис. 2, б, дорожки 2, 3). В то же время мутантный белок с аминокислотной заменой L282S (остаток L282 в белке Orai3 эквивалентен остатку L273 в белке Orai1) и укороченные *C*-концевые пептиды продемонстрировали пониженную способность взаимодействовать со STIM1 (рис. 2, б, дорожки 4, 5). Связывание биотинилированных пептидов со стрептавидином было подтверждено окрашиванием Кумасси бриллиантовым голубым (рис. 2, б, нижняя панель).

Реконструкция Orai3 в липосомах. Чтобы создать простую и эффективную исследовательскую модель для изучения функций Orai3 *in vitro*, очищенный белок GST-Orai3-HA был реконструирован в липосомах. Для контроля высвобождения кальция через канал Orai3,

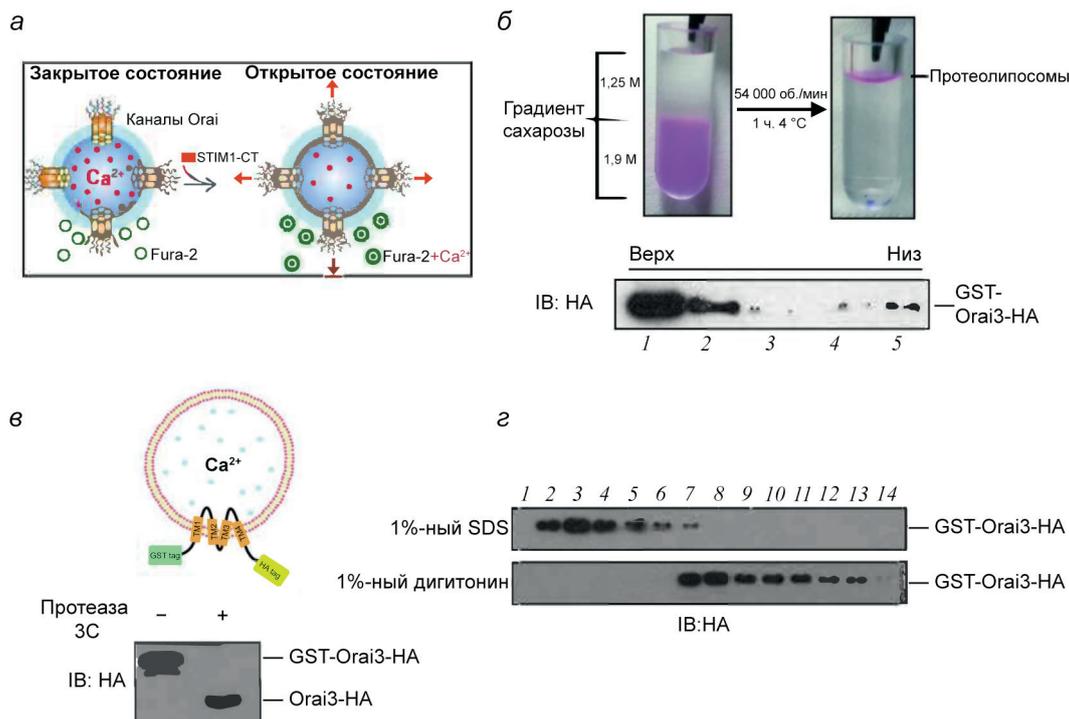


Рис. 3. Реконструированный в липосомах белок GST-Orai3-HA. *a* – Модель активации канала Orai3 *in vitro*. Активация канала Orai3, реконструированного в нагруженных ионами Ca²⁺ липосомах, путём добавления белка STIM1 приводила к высвобождению ионов Ca²⁺ из липосом. Количество выделившегося Ca²⁺ контролировали с помощью красителя Fura-2. *б* – Анализ эффективности реконструкции белка с помощью флотационного анализа. Пять фракций были проанализированы с помощью Вестерн-блоттинга с использованием антител против HA (IB: HA). *в* – Анализ ориентации GST-Orai3-HA в липосомах с использованием протеаз. Протеолипосомы, содержащие белок GST-Orai3-HA, обрабатывали протеазой 3C и анализировали с помощью Вестерн-блоттинга с использованием антител против HA (IB: HA). *г* – Анализ олигомерного состояния белка GST-Orai3-HA в липосомах с помощью центрифугирования в градиенте плотности сахарозы. Реконструированный белок GST-Orai3-HA обрабатывали указанными детергентами и наносили на градиент сахарозы. После центрифугирования 14 фракций были проанализированы с помощью Вестерн-блоттинга с использованием антител против HA (IB: HA)

активированный в результате взаимодействия с белком STIM1, использовали флуоресцентный индикатор Fura-2 (рис. 3, *a*). Белок GST-Orai3-HA со связанным детергентом (Triton X-100) смешивали с липосомами и инкубировали при 4 °C в течение 1 ч, после чего детергент медленно удаляли с помощью биогранул, что приводило к образованию протеолипосом. Эффективность реконструкции белка оценивали методом флотации в градиенте сахарозы. При центрифугировании белок GST-Orai3-HA, реконструированный в липосомах, всплывал на вершину градиента сахарозы. Как и ожидалось, Вестерн-блоттинг подтвердил высокую эффективность реконструкции. Так, почти все содержащие Orai3 протеолипосомы обнаруживались в верхней фракции (рис. 3, *б*). Поскольку ориентация канала Orai3 определяет направление потока кальция и экспозицию сайта связывания STIM1, мы также определили ориентацию встроенного в липосому белка GST-Orai3-HA с помощью анализа продуктов его расщепления протеазами. Ожидалось, что очищенный Orai3 будет представ-

лять собой белок с четырьмя трансмембранными доменами, помеченный метками GST и HA на N- и C-концах соответственно, причём оба конца будут экспонированы наружу из протеолипосом. Вестерн-блоттинг с использованием антител против метки HA показал, что метка GST реконструированного белка Orai3 была удалена протеазой 3C (рис. 3, *в*). Такая ориентация канала Orai3 достигалась после предварительной загрузки протеолипосом ионами Ca²⁺.

Анализ кристаллической структуры белка Orai у *Drosophila* выявил гексамерную структуру этого белка [34]. Чтобы изучить олигомеризацию белка GST-Orai3-HA в липосомах, нами был использован метод центрифугирования в градиенте плотности сахарозы. Реконструированный GST-Orai3-HA, солибилизованный дигитонином (относительно мягкий детергент) или SDS (сильный ионный детергент), наносили на поверхность градиента сахарозы и подвергали центрифугированию. С помощью метода Вестерн-блоттинга было показано, что после обработки дигитонином белок

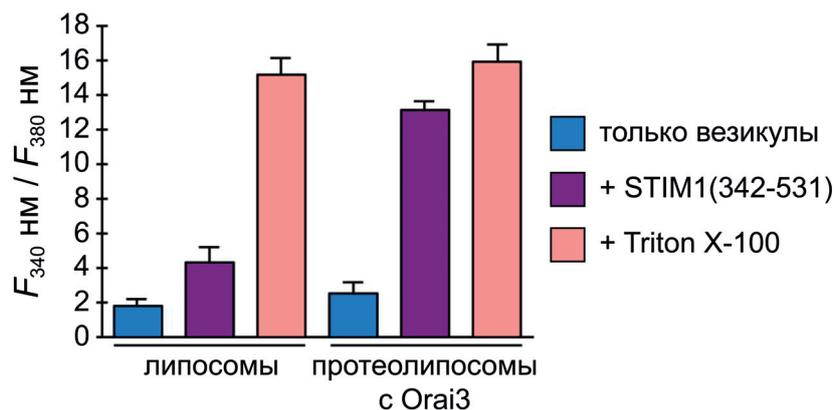


Рис. 4. Вызванное STIM1 высвобождение кальция из протеолипосом, содержащих Orai3, измеренное с помощью индикатора кальция Fura-2. Последовательно проводили возбуждение красителя Fura-2 на длинах волн 340 и 380 нм и определяли соотношение сигналов эмиссии для каждой длины волны возбуждения. Для определения концентрации ионов Ca^{2+} использовали соотношение $F_{340 \text{ нм}} / F_{380 \text{ нм}}$. Синий – концентрация Ca^{2+} вне липосом; фиолетовый – высвобождение Ca^{2+} , вызванное STIM1 (а.о. 342–531), розовый – общий Ca^{2+} , высвобождаемый из липосом детергентом Triton X-100

GST-Orai3-НА мигрировал в градиенте как белок со значительно большим молекулярным весом, что указывало на образование в липосомах олигомеров белка Orai3. При обработке SDS происходило разрушение олигомеров, в результате чего этот белок обнаруживался в верхних фракциях градиента (рис. 3, д). В целом, эти результаты свидетельствуют об успешной реконструкции в липосомах очищенного белка GST-Orai3-НА.

STIM1 индуцировал высвобождение ионов кальция из протеолипосом, содержащих Orai3. Чтобы дополнительно подтвердить, что канал Orai3 может быть активирован белком STIM1 *in vitro*, мы проанализировали высвобождение Ca^{2+} из липосом с использованием индикатора кальция Fura-2 с максимумом возбуждения при 380 нм (при низких концентрациях ионов кальция). Концентрация Ca^{2+} вне протеолипосом в начале эксперимента была очень низкой. Добавление STIM1 (а.о. 342–531) приводило к индукции флуоресценции Fura-2 с пиком эмиссии при 510 нм и сдвигу максимальной длины волны возбуждения от 340 до 380 нм в ответ на связывание кальция. Это свидетельствовало о том, что STIM1 (а.о. 342–531) вызывал значительное высвобождение Ca^{2+} из протеолипосом, содержащих Orai3. Небольшое увеличение соотношения интенсивностей флуоресценции Fura-2 ($F_{340 \text{ нм}} / F_{380 \text{ нм}}$) в ответ на добавление фрагмента белка STIM1 также наблюдалось в липосомах, не содержащих Orai3, что может быть связано с очень высокой чувствительностью Fura-2. Поэтому добавление раствора белка STIM1, содержащего некоторое количество ионов, могло вызвать небольшое увеличение сигнала флуоресценции. Также возможно, что добавление белка

STIM1 могло вызвать разрыв некоторых липосом, что привело к утечке ионов кальция и небольшому увеличению флуоресцентного сигнала. Обработка протеолипосом Triton X-100 приводила к практически полному высвобождению Ca^{2+} . Соотношение $F_{340 \text{ нм}} / F_{380 \text{ нм}}$ было одинаковым для Orai3-содержащих протеолипосом и контрольных липосом. Эти результаты свидетельствуют о том, что белок GST-Orai3-НА, реконструированный в липосомах, образует активные Ca^{2+} -каналы, и что взаимодействие между STIM1 и Orai3 было достаточным для открытия канала *in vitro* (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Реконструкция мембранных белков в искусственной липидной среде является мощным инструментом, широко используемым при изучении структуры и функций ионных каналов, транспортёров, рецепторов и т.д. [35–37]. SOCE является основным механизмом проникновения кальция в невозбудимые клетки, который используется в ряде физиологических и патологических процессов. Он опосредован взаимодействием между Orai1 и STIM1. Структура, функция и механизм активации белка Orai1 как ключевого компонента SOCE были широко изучены *in vitro*. Zhou et al. экспрессировали белок Orai1 человека в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* и выделили из аппарата Гольджи запечатанные мембранные везикулы, переносящие Orai1 к плазматической мембране. Авторы показали, что рекомбинантный STIM1, экспрессируемый в бактериях, может напрямую открывать канал Orai1 *in vitro* [38]. Liu et al. получили моноклональные антитела

против белка Orai1, используя в качестве антигена комплекс липосом и очищенного белка Orai1, синтезированного в бесклеточной системе [39]. Hou et al. определили кристаллическую структуру Orai из *Drosophila melanogaster* и изучили функцию канала Orai путём реконструкции очищенного белка Orai в липосомах с использованием флуоресценции для мониторинга потока ионов [34].

Белок Orai3, который является гомологом Orai1, встречается исключительно у млекопитающих. Для него характерны существенные отличия аминокислотной последовательности от других изоформ белка Orai. Этот белок обладает уникальными особенностями механизмов регуляции и модуляции. Идентичность последовательностей белков Orai3 и Orai1 в экспонированных в цитозоль N- и C-концевых участках составляет 34 и 46% соответственно [40], что может объяснить гораздо более сильное связывание Orai3 с белком STIM1. Индуцированные Orai3 депо-управляемые потоки протекают значительно медленнее, чем в случае Orai1 [41]. Биофизические и фармакологические свойства этих двух белков также различаются [10, 42, 43]. Было показано, что Orai3 является важным компонентом депо-независимых каналов ARC и LRC, ассоциированных с развитием рака и ремоделированием сердечно-сосудистой системы. Следовательно, канал Orai3 может играть критическую роль в специфических клетках или в специфических условиях у млекопитающих. В настоящей работе нами была разработана система *in vitro*, которую можно использовать для изучения структуры, функции и фармакологических свойств канала Orai3. Кроме того, мы разработали эффективный протокол очистки белка Orai3 из клеток *E. coli* и его реконструкции в протеолипосомах. Мы подтвердили ориентацию белка Orai3 в липосомах с помощью анализа продуктов его расщепления и показали, что оба концевых участка Orai3 обращены во

внешнюю среду и доступны для взаимодействия с рекомбинантным STIM1. Добавление рекомбинантного фрагмента STIM1 (а.о. 342–531) вызывало отток Ca^{2+} из липосом.

Можно заключить, что белок Orai3 привлекает значительное внимание исследователей и все чаще признается как терапевтическая мишень при различных заболеваниях. Однако уникальный механизм активации Orai3 остаётся плохо изученным. В настоящей работе мы реконструировали очищенный белок Orai3 в протеолипосомах в отсутствие загрязняющих факторов, что позволило преодолеть некоторые ограничения традиционных методов. Это может послужить основой для будущих исследований структуры и функции канала Orai3 и облегчить открытие его высокоселективных ингибиторов.

Вклад авторов. F. Wu разработал план работы и руководил исследованием. Ch. Liang и F. Wu подготовили и провели эксперименты, а также собрали и проанализировали данные; F. Wu написал текст статьи. Оба автора прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Финансирование. Работа была поддержана Национальным фондом естественных наук Китая (проект № 81702639) и Программой инновационных исследований для выпускников Медицинского университета провинции Хубэй (грант № JC2022010).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Данная статья не содержит описания проведённых кем-либо из авторов исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте издательства Springer (www.springer.com/journal/10541), том 88, вып. 9, 2023.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Putney, J. W., Jr. (1986) A model for receptor-regulated calcium entry, *Cell Calcium*, **7**, 1-12, doi: 10.1016/0143-4160(86)90026-6.
2. Putney, J. W., Jr., Broad, L. M., Braun, F. J., Lievreumont, J. P., and Bird, G. S. (2001) Mechanisms of capacitative calcium entry, *J. Cell Sci.*, **114**, 2223-2229, doi: 10.1242/jcs.114.12.2223.
3. Luik, R. M., Wu, M. M., Buchanan, J., and Lewis, R. S. (2006) The elementary unit of store-operated Ca^{2+} entry: local activation of CRAC channels by STIM1 at ER-plasma membrane junctions, *J. Cell Biol.*, **174**, 815-825, doi: 10.1083/jcb.200604015.
4. Baba, Y., Hayashi, K., Fujii, Y., Mizushima, A., Watarai, H., Wakamori, M., Numaga, T., Mori, Y., Iino, M., Hikida, M., and Kurosaki, T. (2006) Coupling of STIM1 to store-operated Ca^{2+} entry through its constitutive and inducible movement in the endoplasmic reticulum, *Proc. Natl. Acad.*

- Sci. USA*, **103**, 16704-16709, doi: 10.1073/pnas.0608358103.
5. Hogan, P. G., and Rao, A. (2015) Store-operated calcium entry: MECHANISMS and modulation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **460**, 40-49, doi: 10.1016/j.bbrc.2015.02.110.
 6. Lunz, V., Romanin, C., and Frischauf, I. (2019) STIM1 activation of Orai1, *Cell Calcium*, **77**, 29-38, doi: 10.1016/j.ceca.2018.11.009.
 7. Lacruz, R. S., and Feske, S. (2015) Diseases caused by mutations in ORAI1 and STIM1, *Ann. NY Acad. Sci.*, **1356**, 45-79, doi: 10.1111/nyas.12938.
 8. Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S. H., Tanasa, B., Hogan, P. G., Lewis, R. S., Daly, M., and Rao, A. (2006) A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function, *Nature*, **441**, 179-185, doi: 10.1038/nature04702.
 9. Lian, J., Cuk, M., Kahlfuss, S., Kozhaya, L., Vaeth, M., Rieux-Laucat, F., Picard, C., Benson, M. J., Jakovcevic, A., Bilic, K., Martinac, I., Stathopoulos, P., Kacsiovics, I., Vraetz, T., Speckmann, C., Ehl, S., Issekutz, T., Unutmaz, D., and Feske, S. (2018) ORAI1 mutations abolishing store-operated Ca²⁺ entry cause anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **142**, 1297-1310.e1211, doi: 10.1016/j.jaci.2017.10.031.
 10. Hoth, M., and Niemeyer, B. A. (2013) The neglected CRAC proteins: Orai2, Orai3, and STIM2, *Curr. Top. Membr.*, **71**, 237-271, doi: 10.1016/b978-0-12-407870-3.00010-x.
 11. Zhang, X., Xin, P., Yeast, R. E., Emrich, S. M., Johnson, M. T., Pathak, T., Benson, J. C., Azimi, I., Gill, D. L., Monteith, G. R., and Trebak, M. (2020) Distinct pharmacological profiles of ORAI1, ORAI2, and ORAI3 channels, *Cell Calcium*, **91**, 102281, doi: 10.1016/j.ceca.2020.102281.
 12. Shuba, Y. M. (2019) Ca²⁺ channel-forming ORAI proteins: cancer foes or cancer allies? *Exp. Oncol.*, **41**, 200-206, doi: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-41-no-3.13473.
 13. Hou, X., Outhwaite, I. R., Pedi, L., and Long, S. B. (2020) Cryo-EM structure of the calcium release-activated calcium channel Orai in an open conformation, *eLife*, **9**, e62772, doi: 10.7554/eLife.62772.
 14. Stathopoulos, P. B., Schindl, R., Fahrner, M., Zheng, L., Gasmi-Seabrook, G. M., Muik, M., Romanin, C., and Ikura, M. (2013) STIM1/Orai1 coiled-coil interplay in the regulation of store-operated calcium entry, *Nat. Commun.*, **4**, 2963, doi: 10.1038/ncomms3963.
 15. Yeung, P. S., Yamashita, M., and Prakriya, M. (2020) Molecular basis of allosteric Orai1 channel activation by STIM1, *J. Physiol.*, **598**, 1707-1723, doi: 10.1113/jp276550.
 16. Yen, M., Lokteva, L. A., and Lewis, R. S. (2016) Functional analysis of Orai1 concatemers supports a hexameric stoichiometry for the CRAC channel, *Biophys. J.*, **111**, 1897-1907, doi: 10.1016/j.bpj.2016.09.020.
 17. Lewis, R. S. (2011) Store-operated calcium channels: new perspectives on mechanism and function, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **3**, a003970, doi: 10.1101/cshperspect.a003970.
 18. Riva, B., Pessolano, E., Quaglia, E., Cordero-Sanchez, C., Bhela, I. P., Topf, A., Serafini, M., Cox, D., Harris, E., Garibaldi, M., Barresi, R., Perali, T., and Genazzani, A. A. (2022) STIM1 and ORAI1 mutations leading to tubular aggregate myopathies are sensitive to the Store-operated Ca²⁺-entry modulators CIC-37 and CIC-39, *Cell Calcium*, **105**, 102605, doi: 10.1016/j.ceca.2022.102605.
 19. Berna-Erro, A., Jardín, I., Smani, T., and Rosado, J. A. (2016) Regulation of platelet function by Orai, STIM and TRP, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **898**, 157-181, doi: 10.1007/978-3-319-26974-0_8.
 20. Prakriya, M., Feske, S., Gwack, Y., Srikanth, S., Rao, A., and Hogan, P. G. (2006) Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel, *Nature*, **443**, 230-233, doi: 10.1038/nature05122.
 21. Niu, L., Wu, F., Li, K., Li, J., Zhang, S. L., Hu, J., and Wang, Q. (2020) STIM1 interacts with termini of Orai channels in a sequential manner, *J. Cell Sci.*, **133**, jcs239491, doi: 10.1242/jcs.239491.
 22. Bergsmann, J., Derler, I., Muik, M., Frischauf, I., Fahrner, M., Pollheimer, P., Schwarzinger, C., Gruber, H. J., Groschner, K., and Romanin, C. (2011) Molecular determinants within N terminus of Orai3 protein that control channel activation and gating, *J. Biol. Chem.*, **286**, 31565-31575, doi: 10.1074/jbc.M111.227546.
 23. Shuttleworth, T. J. (2012) Orai3 – the “exceptional” Orai? *J. Physiol.*, **590**, 241-257, doi: 10.1113/jphysiol.2011.220574.
 24. Thompson, J., Mignen, O., and Shuttleworth, T. J. (2010) The N-terminal domain of Orai3 determines selectivity for activation of the store-independent ARC channel by arachidonic acid, *Channels*, **4**, 398-410, doi: 10.4161/chan.4.5.13226.
 25. Zhang, S. L., Kozak, J. A., Jiang, W., Yeromin, A. V., Chen, J., Yu, Y., Penna, A., Shen, W., Chi, V., and Cahalan, M. D. (2008) Store-dependent and -independent modes regulating Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel activity of human Orai1 and Orai3, *J. Biol. Chem.*, **283**, 17662-17671, doi: 10.1074/jbc.M801536200.
 26. Zhang, X., González-Cobos, J. C., Schindl, R., Muik, M., Ruhle, B., Motiani, R. K., Bisailon, J. M., Zhang, W., Fahrner, M., Barroso, M., Matrougui, K., Romanin, C., and Trebak, M. (2013) Mechanisms of STIM1 activation of store-independent leukotriene C4-regulated Ca²⁺ channels, *Mol. Cell. Biol.*, **33**, 3715-3723, doi: 10.1128/mcb.00554-13.
 27. Motiani, R. K., Abdullaev, I. F., and Trebak, M. (2010) A novel native store-operated calcium channel encoded

- by Orai3: selective requirement of Orai3 versus Orail1 in estrogen receptor-positive versus estrogen receptor-negative breast cancer cells, *J. Biol. Chem.*, **285**, 19173-19183, doi: 10.1074/jbc.M110.102582.
28. Ay, A. S., Benzerdjeb, N., Sevestre, H., Ahidouch, A., and Ouadid-Ahidouch, H. (2013) Orai3 constitutes a native store-operated calcium entry that regulates non small cell lung adenocarcinoma cell proliferation, *PLoS One*, **8**, e72889, doi: 10.1371/journal.pone.0072889.
 29. Holzmann, C., Kilch, T., Kappel, S., Armbrüster, A., Jung, V., Stöckle, M., Bogeski, I., Schwarz, E. C., and Peinelt, C. (2013) ICRAAC controls the rapid androgen response in human primary prostate epithelial cells and is altered in prostate cancer, *Oncotarget*, **4**, 2096-2107, doi: 10.18632/oncotarget.1483.
 30. González-Cobos, J. C., Zhang, X., Zhang, W., Ruhle, B., Motiani, R. K., Schindl, R., Muik, M., Spinelli, A. M., Bisailon, J. M., Shinde, A. V., Fahrner, M., Singer, H. A., Matrougui, K., Barroso, M., Romanin, C., and Trebak, M. (2013) Store-independent Orai1/3 channels activated by intracrine leukotriene C4: role in neointimal hyperplasia, *Circ. Res.*, **112**, 1013-1025, doi: 10.1161/circresaha.111.300220.
 31. Motiani, R. K., Stolwijk, J. A., Newton, R. L., Zhang, X., and Trebak, M. (2013) Emerging roles of Orai3 in pathophysiology, *Channels*, **7**, 392-401, doi: 10.4161/chan.24960.
 32. Rigaud, J. L. (2002) Membrane proteins: functional and structural studies using reconstituted proteoliposomes and 2-D crystals, *Brazil. J. Med. Biol. Res.*, **35**, 753-766, doi: 10.1590/s0100-879x2002000700001.
 33. Rigaud, J. L., and Lévy, D. (2003) Reconstitution of membrane proteins into liposomes, *Methods Enzymol.*, **372**, 65-86, doi: 10.1016/s0076-6879(03)72004-7.
 34. Hou, X., Pedi, L., Diver, M. M., and Long, S. B. (2012) Crystal structure of the calcium release-activated calcium channel Orai, *Science*, **338**, 1308-1313, doi: 10.1126/science.1228757.
 35. Lee, H. B., Xu, L., and Meissner, G. (1994) Reconstitution of the skeletal muscle ryanodine receptor-Ca²⁺ release channel protein complex into proteoliposomes, *J. Biol. Chem.*, **269**, 13305-13312, doi: 10.1016/S0021-9258(17)36833-3.
 36. Lu, P., Liu, R., and Sharom, F. J. (2001) Drug transport by reconstituted P-glycoprotein in proteoliposomes. Effect of substrates and modulators, and dependence on bilayer phase state, *Eur. J. Biochem.*, **268**, 1687-1697, doi: 10.1046/j.1432-1033.2001.02041.x.
 37. Klein, U., and Fahrenholz, F. (1994) Reconstitution of the myometrial oxytocin receptor into proteoliposomes. Dependence of oxytocin binding on cholesterol, *Eur. J. Biochem.*, **220**, 559-567, doi: 10.1111/j.1432-1033.1994.tb18656.x.
 38. Zhou, Y., Meraner, P., Kwon, H. T., Machnes, D., Oh-hora, M., Zimmer, J., Huang, Y., Stura, A., Rao, A., and Hogan, P. G. (2010) STIM1 gates the store-operated calcium channel ORAI1 *in vitro*, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **17**, 112-116, doi: 10.1038/nsmb.1724.
 39. Liu, S., Hasegawa, H., Takemasa, E., Suzuki, Y., Oka, K., Kiyoi, T., Takeda, H., Ogasawara, T., Sawasaki, T., Yasukawa, M., and Maeyama, K. (2017) Efficiency and safety of CRAC inhibitors in human rheumatoid arthritis xenograft models, *J. Immunol.*, **199**, 1584-1595, doi: 10.4049/jimmunol.1700192.
 40. Shuttleworth, T. J. (2012) Orai channels – new insights, new ideas, *J. Physiol.*, **590**, 4155-4156, doi: 10.1113/jphysiol.2012.237552.
 41. Lis, A., Peinelt, C., Beck, A., Parvez, S., Monteilh-Zoller, M., Fleig, A., and Penner, R. (2007) CRACM1, CRACM2, and CRACM3 are store-operated Ca²⁺ channels with distinct functional properties, *Curr. Biol.*, **17**, 794-800, doi: 10.1016/j.cub.2007.03.065.
 42. Azimi, I., Milevskiy, M. J. G., Chalmers, S. B., Yapa, K., Robitaille, M., Henry, C., Baillie, G. J., Thompson, E. W., Roberts-Thomson, S. J., and Monteith, G. R. (2019) ORAI1 and ORAI3 in breast cancer molecular subtypes and the identification of ORAI3 as a hypoxia sensitive gene and a regulator of hypoxia responses, *Cancers*, **11**, 208, doi: 10.3390/cancers11020208.
 43. Stauderman, K. A. (2018) CRAC channels as targets for drug discovery and development, *Cell Calcium*, **74**, 147-159, doi: 10.1016/j.ceca.2018.07.005.

RECONSTITUTION OF CALCIUM CHANNEL PROTEIN Orai3 INTO LIPOSOMES FOR FUNCTIONAL STUDIES

Ch. Liang¹ and F. Wu^{1,2*}

¹ Hubei University of Medicine, School of Basic Medical Sciences, 442000 Shiyan, China

² Nankai University, College of Life Sciences, Department of Genetics and Cell Biology, 300071 Tianjin, China; e-mail: wufuyun@hbm.u.edu.cn

Store-operated calcium entry (SOCE) is the main mechanism for the Ca²⁺ influx in non-excitabile cells. The two major components of SOCE are stromal interaction molecule 1 (STIM1) in the endoplasmic

reticulum and Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel (CRAC) Orai on the plasma membrane. SOCE requires interaction between STIM1 and Orai. Mammals have three Orai homologs: Orai1, Orai2, and Orai3. Although Orai1 has been widely studied and proven to be essential for numerous cellular processes, Orai3 has also attracted a significant attention recently. The gating and activation mechanisms of Orai3 have yet to be fully elucidated. Here, we expressed, purified, and reconstituted Orai3 protein into liposomes and investigated its orientation and oligomeric state in the resulting proteoliposomes. STIM1 interacted with the Orai3-containing proteoliposomes and mediated calcium release from them, suggesting that the Orai3 channel was functional and that recombinant STIM1 could directly open the Orai3 channel *in vitro*. The developed *in vitro* calcium release system could be used to study the structure, function, and pharmacology of Orai3 channel.

Keywords: store-operated Ca^{2+} entry, Orai3, STIM1, reconstitution, liposomes