

## РОЛЬ РЕДОКС-ЗАВИСИМЫХ БЕЛКОВ В РЕАЛИЗАЦИИ РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОК

УДК 577.1

### ИДЕНТИФИКАЦИЯ МЕЛИТТИНПОДОБНЫХ БЕЛКОВ С МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССОЙ 67 кДа, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИХ С $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазой

© 2023 г. Л. А. Варфоломеева<sup>а</sup>, Е. А. Климанова<sup>б, \*</sup>, С. В. Сидоренко<sup>б</sup>,  
Д. А. Федоров<sup>б</sup>, О. Д. Лопина<sup>б</sup>

<sup>а</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр биотехнологии  
Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

<sup>б</sup>Биологический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

\*e-mail: klimanova.ea@yandex.ru

Поступила в редакцию 19.04.2023 г.

После доработки 25.05.2023 г.

Принята к публикации 30.05.2023 г.

Установлено, что мелиттин, пептид из яда пчелы, взаимодействует со многими белками, включая белки-мишени кальмодулина и ионтранспортирующие АТФазы Р-типа. Предполагается, что мелиттин имитирует белковый модуль, участвующий в белок-белковых взаимодействиях внутри клетки. Ранее методом перекрестной иммунопреципитации установлено, что натрий-калиевая АТФаза ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза), содержащая  $\alpha 1$ -изоформу каталитической субъединицы, соосаждается с белком с молекулярной массой около 70 кДа, взаимодействующим с антителами против мелиттина. В присутствии специфического ингибитора  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы (уабаина) количество белка с молекулярной массой 70 кДа, взаимодействующего с  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазой, возрастает. Для идентификации мелиттинподобного белка в почках мыши использовали метод аффинной хроматографии с иммобилизованными антителами, специфичными к мелиттину. В результате получена фракция мелиттинподобных белков с молекулярной массой около 70 кДа. Методом масс-спектрометрического анализа установлено, что в полученной белковой фракции содержится три молекулярных шаперона из суперсемейства Hsp70: митохондриальный mtHsp70 (морталин), Hsp73, Grp78 эндоплазматического ретикулума. Эти данные позволяют предполагать, что шапероны из суперсемейства Hsp70 содержат мелиттинподобный модуль.

**Ключевые слова:** мелиттин,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза, Hsp70, мелиттинподобные белки

**DOI:** 10.31857/S0026898423060216, **EDN:** QLKRWL

Мелиттин — основной компонент яда европейской медовой пчелы *Apis mellifera*. По химической структуре это линейный пептид, состоящий из 26 аминокислотных остатков. N-концевая часть молекулы гидрофобна, в то время как C-концевой участок пептида гидрофилен и заряжен положительно. При физиологическом значении pH молекула мелиттина имеет заряд +6, причем четыре заряда расположены на C-конце молекулы (остатки лизина и аргинина), а два — на N-концевой ее части.

Структурно мелиттин представляет амфипатическую  $\alpha$ -спираль, которая способна взаимодействовать с цитоплазматической мембраной [1]. При встраивании в мембрану эритроцитов мелиттин вызывает их гемолиз, причем сначала повы-

шается проводимость для ионов натрия и калия и только после этого происходит высвобождение гемоглобина [2]. Первая быстрая фаза этого процесса соответствует связыванию положительно заряженной C-концевой части молекулы мелиттина с мембраной, медленная фаза обусловлена перестройкой липидного бислоя и белковых комплексов в мембране.

Помимо воздействия на мембраны для мелиттина описано и специфическое действие на белки. По-видимому, мелиттин структурно похож на модуль внутриклеточных белков, который принимает участие в белок-белковых взаимодействиях. В частности, он имитирует участок связывания кальмодулина с его белковыми мишенями [3]. Известно, что каталитические субъединицы АТФаз Р-типа также специфически связывают мелиттин [4, 5]. Пептид взаимодействует с последовательностью MI/LDPPR, которая находится в

Сокращения. ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография; HRP (horse radish peroxidase) — пероксидаза хрена.

$\alpha$ -субъединице  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -АТФазы из слизистой оболочки желудка [6]. Похожая последовательность присутствует во всех изоформах  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы (M(591)DPPRAA) и в  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазе саркоплазматического ретикулума (M(599)LDPPRKE). Белок с молекулярной массой около 70 кДа, взаимодействующий с антителами против мелиттина, был обнаружен в клетках слизистой оболочки желудка и в гомогенатах из скелетных мышц кролика. Этот белок непосредственно взаимодействует с цитоплазматическим участком полипептидной цепи  $\alpha$ -субъединицы  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы [5].

Цель работы заключалась в идентификации в почках мыши мелиттинподобных белков с молекулярной массой около 70 кДа, взаимодействующих с  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазой.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Реагенты.** В работе использованы ЭДТА, дексиксидат натрия, глицин, мышинные моноклональные антитела против Hsp70 (Lot: 029K4845, "Sigma-Aldrich", США), Tris, перекись водорода, коктейль ингибиторов протеаз, CHAPS и PMSF ("Sigma-Aldrich"); Affi-gel 10, акриламид, метилен-бис-акриламид и другие реагенты для проведения электрофореза в ПААГ ("Bio-Rad", США); PVDF-мембраны ("ICN Biomedical", США); Triton X-100, глутаровый альдегид, имидазол ("Merck", Германия); Coomassie R-250 ("Serva", Германия). Мелиттин из яда пчелы (свободный от фосфолипазы A2), полученный методом ВЭЖХ, покупали у фирмы "Аура" (Россия).

**Получение модифицированного мелиттином аффинного сорбента.** Для получения аффинного сорбента для выделения мелиттинспецифичных антител использовали сорбент Affi-gel 10. Сначала 5 мл геля дважды промывали 5-кратным объемом холодной деионизованной воды и один раз 5-кратным объемом холодного раствора 100 мМ MOPS (pH 7.4). Навеску мелиттина (75 мг) растворяли в 10 мл 100 мМ MOPS, pH 7.4 (из расчета 15 мг мелиттина на 1 мл геля). Раствор мелиттина (10 мл) добавляли к 5 мл носителя и инкубировали при перемешивании при 4°C в течение 2.5 ч. Жидкость декантировали, добавляли двукратный объем 100 мМ раствора MOPS (pH 7.4), в который для блокировки свободных сукцинимидных групп вносили 0.5 мл 1 М раствора этаноламина, pH 8.0 (из расчета 100 мкл раствора на 1 мл носителя). Полученную суспензию инкубировали в течение 1 ч при 4°C.

**Получение поликлональных антител против мелиттина.** Поликлональные антитела против мелиттина, сшитого 3%-ным глутаровым альдегидом (для повышения иммуногенности), были получены путем иммунизации кроликов, как описано ранее [5]. Антитела очищали с использованием мо-

дифицированного мелиттином Affi-gel 10. Готовый аффинный носитель объемом 5 мл и емкостью 15 мг белка на 1 мл помещали в хроматографическую колонку, в которую вносили частично очищенные антитела со скоростью 20 мл/ч. Носитель промывали последовательно 10-кратным объемом PBS (pH 7.2) с 0.1% Tween-80 (PBST), 5-кратным объемом буфера 100 мМ Gly-HCl (pH 2.5) и 10-кратным объемом PBST до нулевого значения оптической плотности. Фракцию не сорбирующихся на колонке белков элюировали PBST, содержащим 0.2%  $\text{NaN}_3$ , а затем тем же раствором, содержащим дополнительно 300 мМ NaCl. Для элюции антител с колонки использовали буфер 100 мМ Gly-HCl, pH 2.5. В полученном препарате антител pH доводили до нейтральных значений с помощью 1 М раствора  $\text{NaHCO}_3$  (pH 8.0) и диализовали дважды против PBS, содержащего 0.2%  $\text{NaN}_3$ .

Концентрацию белка во фракциях, полученных в ходе аффинной хроматографии, определяли методом Лоури [7]. В качестве стандарта использовали раствор БСА ("Thermo Fisher Scientific", США) с концентрацией 2 мг/мл.

Препарат антител, связывающихся с мелиттином, использовали в качестве лиганда для получения аффинного сорбента (по методике, приведенной выше для мелиттина) с целью выделения мелиттинподобных белков из гомогената почек мыши (к 1 мл носителя добавляли 6 мг антител).

**Электрофорез белков в SDS-ПААГ и иммуноблоттинг.** Фракции элюата, полученные в ходе аффинной хроматографии, анализировали электрофорезом в 10%-ном SDS-ПААГ. Электроперенос белков с геля на PVDF-мембрану проводили в течение 1 ч 30 мин при силе тока 200 мА. После окончания электропереноса мембрану блокировали в 5%-ном сухом молоке ("Valio", Финляндия), приготовленном на PBST, в течение 1 ч при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Далее добавляли поликлональные антитела, специфичные к мелиттину и очищенные методом аффинной хроматографии, в разведении 1 : 1000 и инкубировали мембрану в течение 1 ч при комнатной температуре и перемешивании. Мембрану отмывали PBST от несвязавшихся первичных антител 3 раза по 10 мин и инкубировали с конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP) мышинными антителами против IgG кролика ("Sigma-Aldrich") в разведении 1 : 5000 в течение 1 ч при комнатной температуре. Для визуализации комплексов антиген-антитело использовали коммерческий набор ECL-kit SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate ("Thermo Fisher Scientific") и прибор ChemiDoc XRS+ Molecular Imager ("Bio-Rad").

**Очистка мелиттинподобных белков.** Фракция мелиттинподобных белков с молекулярной мас-

сой ~70 кДа была очищена из гомогената почек мыши с использованием метода аффинной хроматографии [8]. Все операции по получению гомогената проводили при 4°C. Почки двух мышей общей массой 0.93 г измельчали ножницами, добавляли 10-кратный объем среды выделения (30 мМ имидазол, pH 7.4, 130 мМ NaCl, 5 мМ ЭДТА, 1.1% Triton X-100, 0.25% CHAPS, 2 мкМ PMSF, коктейль ингибиторов протеаз). Коктейль ингибиторов протеаз и PMSF вносили непосредственно перед выделением. Ткань гомогенизировали с помощью гомогенизатора Potter-Elvehjem ("Kleinfeld", США). Гомогенат центрифугировали в течение 10 мин при 13000 g, осадок удаляли, а супернатант пропускали через бумажный складчатый фильтр. Далее супернатант в объеме 8 мл наносили на колонку с носителем Affi-gel 10 с иммобилизованными антителами, специфичными к мелиттину. Не связавшиеся с носителем компоненты сыворотки отмывали PBST с 0.2% NaN<sub>3</sub> и затем тем же раствором, содержащим дополнительно 300 мМ NaCl. Для элюции мелиттинподобных белков использовали буфер 100 мМ Gly-HCl (pH 2.5). Во фракциях, содержащих мелиттинподобные белки, pH доводили до нейтральных значений раствором 1 М NaHCO<sub>3</sub> (pH 8.0). Полученный препарат мелиттинподобных белков анализировали методами электрофореза по Лэммли [9] и иммуноблоттинга.

**Идентификация мелиттинподобных белков.** Целевые фракции аффинной хроматографии анализировали методами электрофореза в 10%-ном SDS-ПААГ и иммуноблоттинга с использованием в качестве первичных антител мелиттинсвязывающей фракции сыворотки кролика (см. выше), а в качестве вторичных – HRP-конъюгированные мышинные антитела против IgG кролика.

Кроме того, проведен масс-спектрометрический анализ полученных белков. Препараты мелиттинподобных белков для масс-спектрометрического анализа готовили следующим образом. Реактивы для электрофореза фильтровали через фильтры с размером пор 0.45 мкм в ламинарном боксе. Образцы белковой фракции наносили на ПААГ и проводили электрофорез при силе тока 25 мА в концентрирующем и 50 мА в разделяющем гелях по методу Лэммли. Гель окрашивали раствором Coomassie R-250. В ламинарном боксе из геля вырезали белковые полосы, измельчали их на кубики размером 1 мм × 1 мм и помещали в 100 мкл деионизованной воды. Полученные образцы белков анализировали в Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (Москва) с использованием метода tandemной масс-спектрометрии, сопряженной с ВЭЖХ с нанопотоками (LC-MS/MS).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлен профиль элюции сыворотки крови иммунизированного кролика (30 мл с концентрацией белка 3 мг/мл) на колонке с Affi-gel 10 с иммобилизованным мелиттином.

Фракцию поликлональных антител, элюированных с колонки после резкой смены pH, анализировали методом иммуноблоттинга с окрашиванием вторичными антителами – HRP-конъюгированными антителами мыши против IgG кролика. На рис. 2 представлены результаты электрофореза этой фракции (2а) и последующего иммуноблоттинга (2б) с использованием вторичных антител, а также детекция мелиттина на PVDF-мембране с использованием полученной сывороточной фракции антимелиттиновых антител (2в).

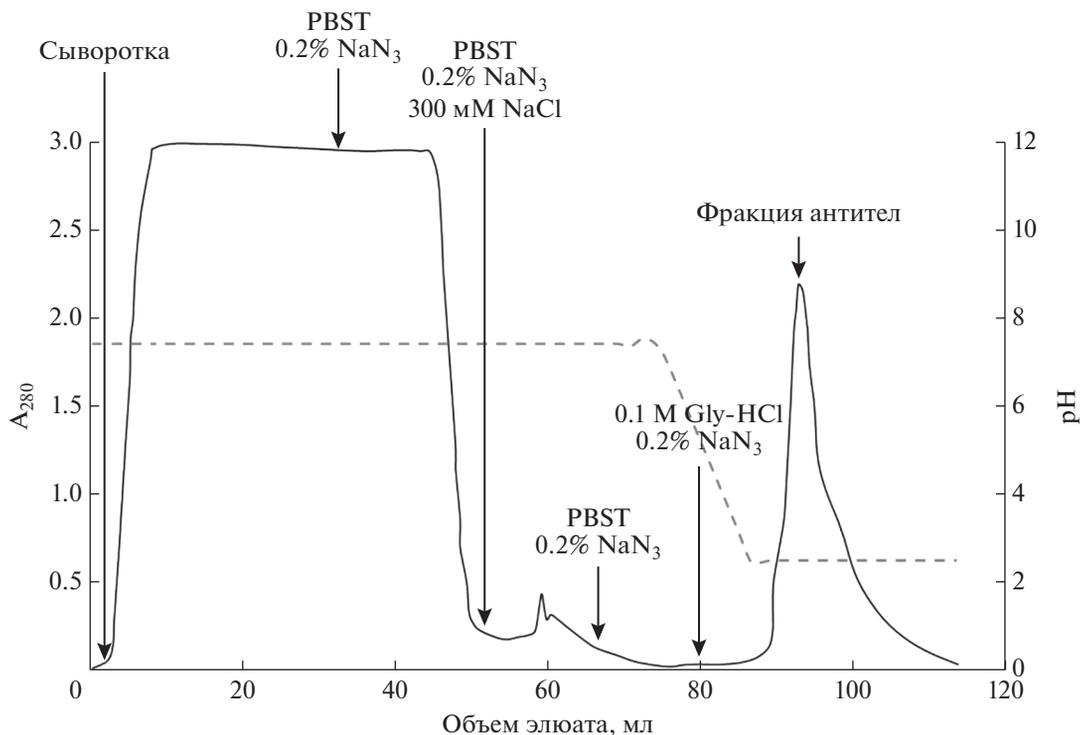
Как видно на рис. 2б, мышинные антитела против IgG кролика связываются с двумя белковыми полосами – с кажущимся молекулярным массам ~55 и ~25 кДа, которые соответствуют тяжелым и легким цепям IgG. Показано, что объединенный образец фракций 2–4 связывается с мелиттином (рис. 2в), то есть в очищенной аффинной хроматографией сыворотке кролика присутствуют целевые антитела.

Доказав, что полученные нами и очищенные методом аффинной хроматографии антитела связывают мелиттин, мы использовали их в качестве лиганда для аффинной хроматографии – с целью получения белков с мелиттинподобными детерминантами. Антитела, содержащиеся в объединенной фракции, иммобилизовали на носителе Affi-gel 10. Профиль элюции супернатанта, полученного после центрифугирования гомогената из почек мыши и нанесенного на Affi-gel 10 с иммобилизованными антителами на мелиттин, представлен на рис. 3. Белки, вышедшие с колонки при pH элюирующего буфера 2.5, проанализированы методами электрофореза в ПААГ и иммуноблоттинга. Результаты анализа представлены на рис. 4.

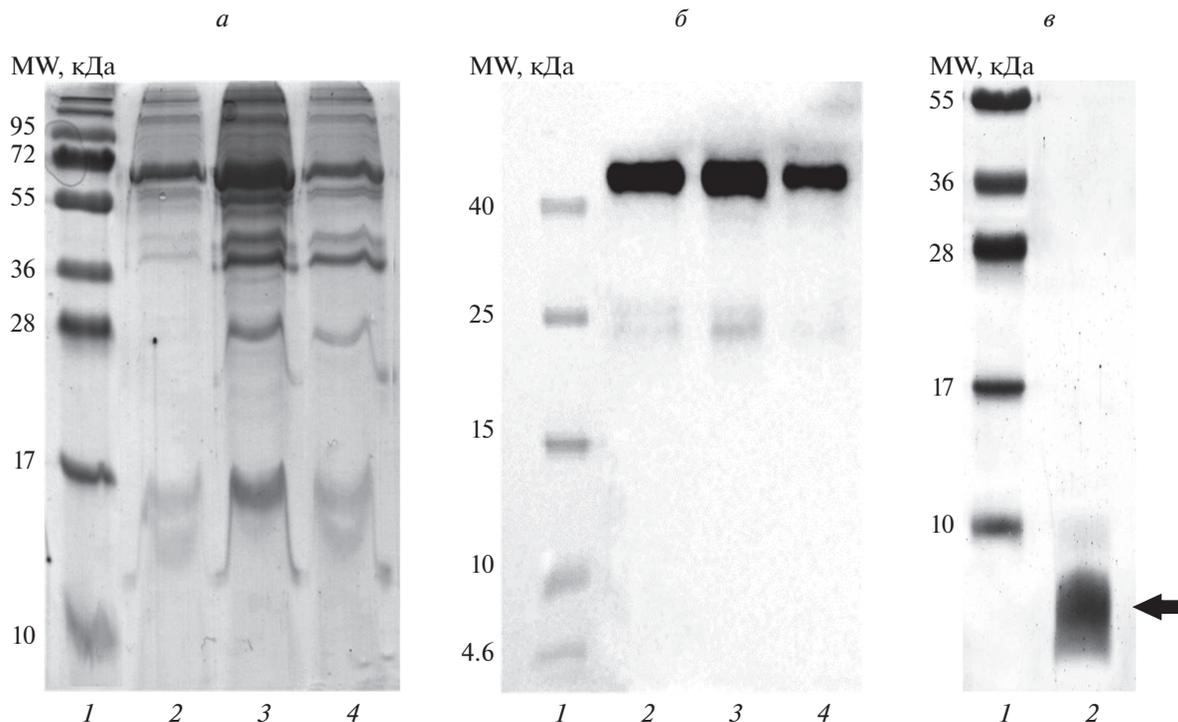
Белки, находящиеся в белковой полосе с молекулярной массой ~70 кДа, анализировали с использованием технологии tandemной масс-спектрометрии, сопряженной с ВЭЖХ с нанопотоками (LC-MS/MS). Результаты анализа представлены в табл. 1.

Таким образом, масс-спектрометрический анализ показал, что в полученной нами фракции мелиттинподобных белков содержится семь белков, три из которых являются молекулярными шаперонами из суперсемейства Hsp70: mtHsp70 (морталин), Hsp73 и Grp78.

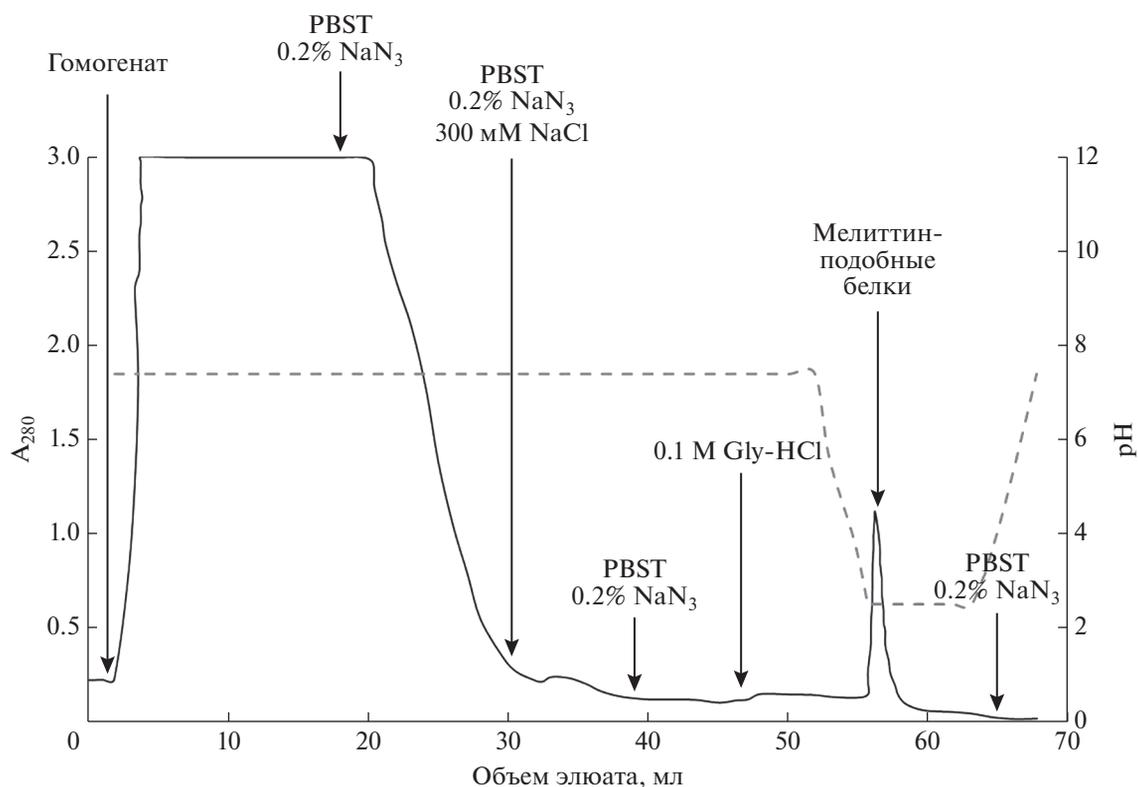
Для подтверждения этих данных мы провели иммуноблоттинг фракции мелиттинподобных белков с использованием антител не только против мелиттина, но и против Hsp70. Как видно из



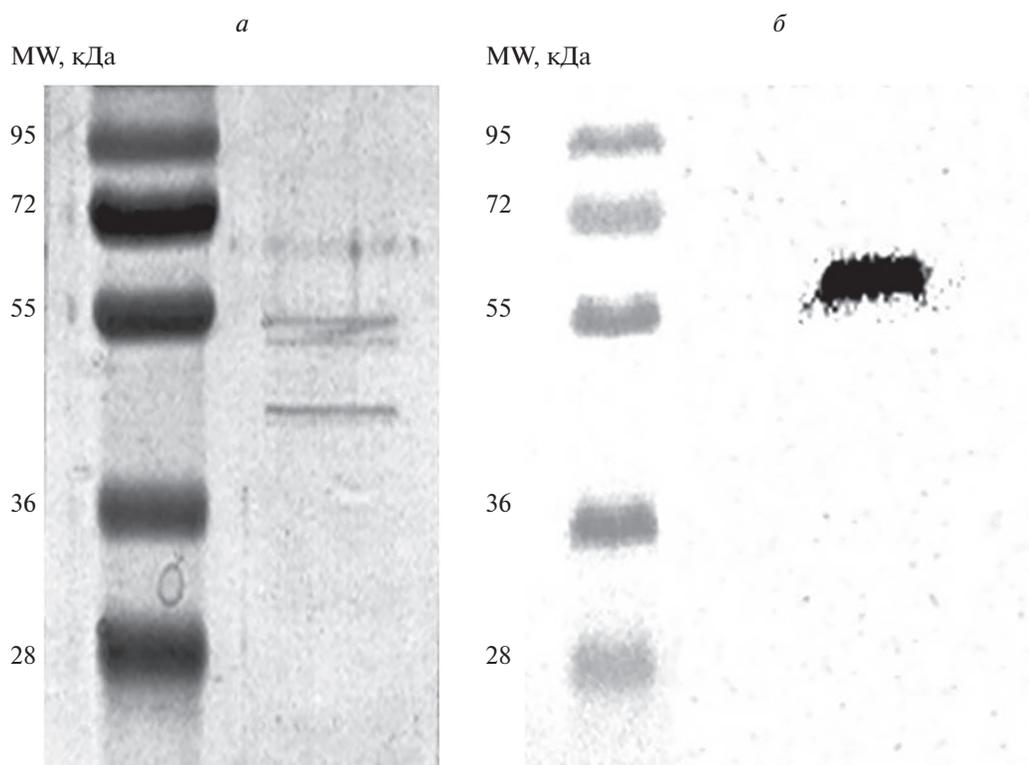
**Рис. 1.** Профиль элюции белков сыворотки крови кролика, иммунизированного мелиттином, с колонки с носителем Affi-gel 10, конъюгированным с мелиттином. Пунктирной линией указан градиент pH.



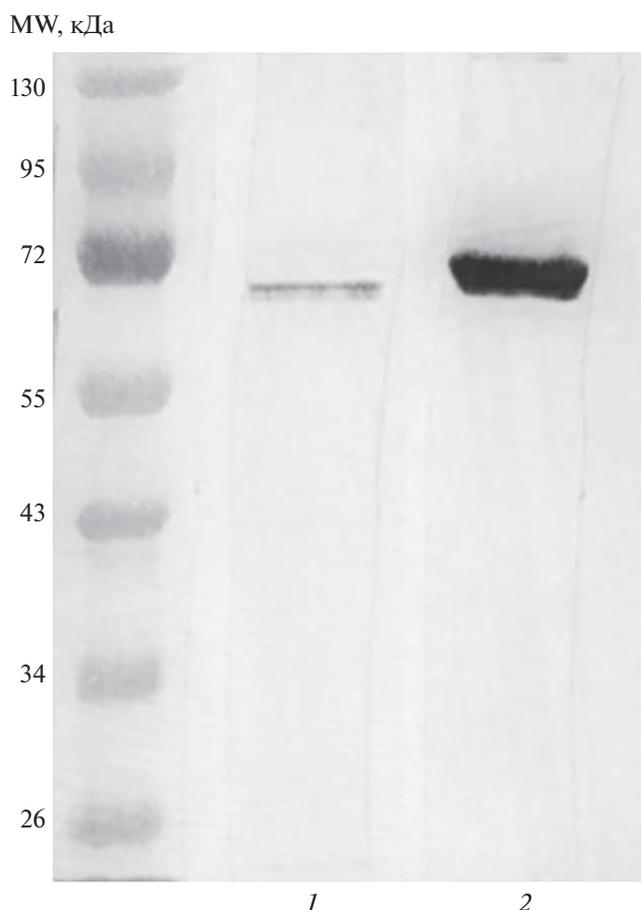
**Рис. 2.** Анализ белкового состава сыворотки иммунизированного мелиттином кролика в ходе аффинной хроматографии и анализ специфичности полученных антител. Анализ белкового состава фракций элюата аффинной хроматографии методом электрофореза в SDS-ПААГ (*а*) и идентификация фракций, содержащих IgG кролика, методом иммуноблотинга с использованием HRP-конъюгированных мышиных антител соответствующей специфичности (*б*). На дорожки *1а* и *1в* нанесены маркеры молекулярной массы белков PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (“Thermo Fisher Scientific”, США), *1б* – Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder (“Thermo Fisher Scientific”); на дорожки 2–4 – фракции антител, соответствующие пику их элюции. Анализ специфичности антител (*в*) во фракциях, полученных в результате аффинной хроматографии, методом иммуноблотинга с использованием мелиттина (указано стрелкой) в качестве антигена.



**Рис. 3.** Профиль элюции белков супернатанта, полученного из гомогената почек мыши, с носителя Affi-gel 10, на котором иммобилизованы антитела против мелиттина.



**Рис. 4.** Анализ фракции мелиттинподобных белков, полученной в результате аффинной хроматографии гомогената почек мыши (см. рис. 3). *a* – Электрофорез в 10%-ном SDS-ПААГ с окрашиванием Coomassie R-250; *б* – иммуноблоттинг с использованием антител против мелиттина, полученных из сыворотки кролика (см. рис. 2), и вторичных антител – HRP-конъюгированных мышинных антител против IgG кролика. Для маркировки молекулярной массы белков использован набор PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (“Thermo Fisher Scientific”).



**Рис. 5.** Анализ мелиттинподобных белков с молекулярной массой  $\sim 70$  кДа методом иммуноблоттинга с использованием антител против мелиттина (1) и Hsp70 (2). Для маркировки молекулярной массы белков использован набор Blue Plus® V Protein Marker (“TransGen Biotech Co.”, Китай).

результатов, представленных на рис. 5, взаимодействующие с антителами против мелиттина белки связывались и с антителами против Hsp70.

Ранее мы обнаружили, что при иммунопреципитации  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы из гомогената почек мыши с использованием антител против  $\alpha 1$ -субъединицы совместно с ней осаждаются белки с молекулярной массой около 70 кДа, которые окрашиваются антителами против мелиттина. При перекрестной иммунопреципитации — в осадке антител против мелиттина — в осадке обнаружили  $\alpha 1$ -субъединицу  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы. Более того, предварительная обработка гомогената специфическим ингибитором  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы убаином в концентрации 0.5 мМ приводила к увеличению количества мелиттинподобного белка с молекулярной массой  $\sim 70$  кДа в иммунопреципитате [8]. На основании этих данных мы предположили, что  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза взаимодействует с этим белком, а связывание  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы с убаином усиливает это взаимодействие.

В проведенном теперь исследовании получены белки, взаимодействующие с антителами против мелиттина, а методом масс-спектрометрии в этой фракции идентифицировано три белка-шаперона из суперсемейства Hsp70. Пока у нас нет информации о том, какой из них взаимодействует с  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазой. Попробуем гипотетически объяснить факт увеличения количества мелиттинподобного белка, связывающегося с  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазой в присутствии убаина. Скорее всего, убаин переводит  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазу в конформацию, которая лучше взаимодействует с шапероном, что приводит удалению комплекса  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза—убаин из мембраны. Логично предположить, что это происходит под действием шаперона Hsp70,

**Таблица 1.** Мелиттинподобные белки из почек мыши с молекулярной массой  $\sim 70$  кДа

Название белка; $M_r$	Локализация
mtHsp70 (морталин); 73 кДа	Митохондрии, эндоплазматический ретикулум, цитоплазматическая мембрана, цитоплазматические везикулы
Ацил-КоА-дегидрогеназа длинноцепочечных жирных кислот; 71 кДа	Внутренняя мембрана митохондрий
Субъединица А протонной АТФазы V-типа; 68 кДа	Цитоплазма, лизосомы, митохондрии, цитоплазматическая мембрана
Изоформа-2 комплекса MICOS, субъединица Mic60; 84 кДа	Внутренняя мембрана митохондрий
Gpr78; 72 кДа	Эндоплазматический ретикулум
Hsp70; 71 кДа	Цитозоль, эндосомы, лизосомы, ядро, цитоплазматическая мембрана
Регуляторный кофактор $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обменника Nherf3; 57 кДа	Цитоплазматическая мембрана

который функционирует при фолдинге белков, а также при солюбилизации агрегированных белков [10].

Два других шаперона, обнаруженных во фракции мелиттинподобных белков (морталин и Grp78), также могут иметь отношение к удалению  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы из плазматической мембраны. Однако они относятся к шаперонам эндоплазматического ретикулума и скорее имеют отношение к фолдингу и доставке  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы к плазматической мембране. Нами показано, что шаперон, взаимодействующий с  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазой, содержит мелиттинподобный мотив, но ответ на вопрос о его функциональной значимости остается пока открытым. Предстоит выяснить и другие вопросы, поставленные результатами проведенного исследования: какой именно шаперон взаимодействует с  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазой; приводит ли это взаимодействие к удалению фермента из мембраны и необходим ли для этого мелиттинподобный мотив.

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Raghuraman H., Chattopadhyay A. (2007) Melittin: a membrane-active peptide with diverse functions. *Biosci. Rep.* **27**, 189–223.
2. Dempsey C.E. (1990) The actions of melittin on membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1031**, 143–161.
3. Kaetzel M.A., Dedman J.R. (1987) Identification of a 55-kDa high-affinity calmodulin-binding protein from *Electrophorus electricus*. *J. Biol. Chem.* **262**, 1818–1822.
4. Cuppoletti J., Abbott A.J. (1990) Interaction of melittin with the  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ : evidence for a melittin-induced conformational change. *Arch. Biochem. Biophys.* **283**, 249–257.
5. Каманина Ю.В., Климанова Е.А., Дергоусова Е.А., Петрушанко И.Ю., Лопина О.Д. (2016) Идентификация участка полипептидной цепи  $\alpha$ -субъединицы  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы, взаимодействующего с мелиттинподобным белком с молекулярной массой 67 кДа. *Биохимия.* **81**, 369–375.
6. Cuppoletti J. (1990) [ $^{125}\text{I}$ ]azidosalicylyl melittin binding domains: evidence for a polypeptide receptor on the gastric  $(\text{H}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ . *Arch. Biochem. Biophys.* **278**, 409–415.
7. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275.
8. Долгова Н.В., Каманина Ю.В., Акимова О.А., Орлов С.Н., Рубцов А.М., Лопина О.Д. (2007) Белок, связывание которого с  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазой регулируется убаином. *Биохимия.* **72**, 1061–1071.
9. Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680–685.
10. Rosenzweig R., Nillegoda N.B., Mayer M.P., Bukau B. (2019) The Hsp70 chaperone network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 665–680.

## Identification of the 67-kDa Melittin-Like Proteins Interacting with $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase

L. A. Varfolomeeva<sup>1</sup>, E. A. Klimanova<sup>2</sup>, \*, S. V. Sidorenko<sup>2</sup>, D. A. Fedorov<sup>2</sup>, and O. D. Lopina<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

<sup>2</sup>*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia*

\*e-mail: klimanova.ea@yandex.ru

Melittin, a peptide from bee venom, was found to interact with many proteins, including calmodulin target proteins and ion-transporting P-type ATPases. It is assumed that melittin mimics a protein module involved in protein-protein interactions within cells. Previously, a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase containing the  $\alpha 1$  isoform of the catalytic subunit was found to co-precipitate with a protein with a molecular weight of about 70 kDa that interacts with antibodies against melittin by cross immunoprecipitation. In the presence of a specific  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase inhibitor (ouabain), the amount of protein with a molecular weight of 70 kDa was increased in the precipitate. In order to identify melittin-like protein from murine kidney homogenate, a fraction of proteins (with a molecular mass of approximately 70 kDa) was obtained using affinity chromatography with immobilized antibodies specific to melittin. By mass spectrometry analysis, the obtained protein fraction was found to contain three molecular chaperones of Hsp70 superfamily: mtHsp70 (mortalin), Hsp73 and Grp78. These data suggest that chaperones from the Hsp70 superfamily contain a melittin-like module.

**Keywords:** melittin,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, Hsp70, melittin-like proteins