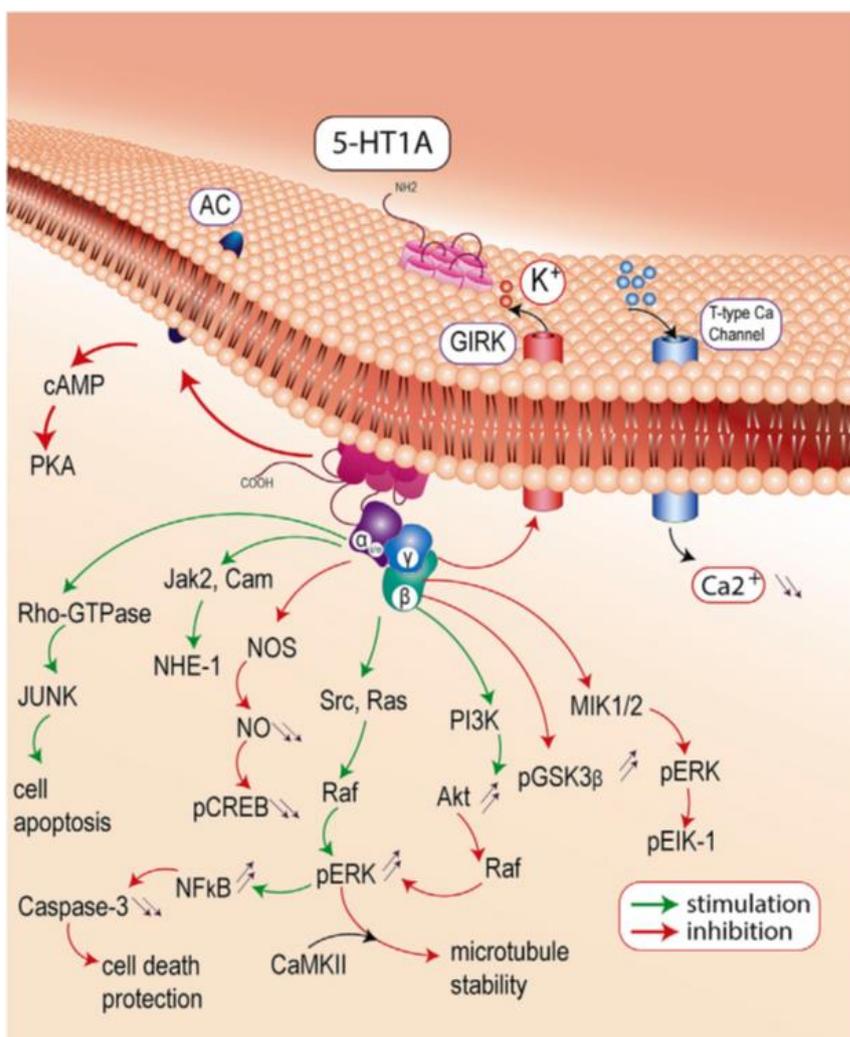


Субъединица $\beta\gamma$ G-белка как фактор регуляции цитоскелета

Sierra-Fonseca J.A., Miranda M., Das S., Roychowdhury S. The $\beta\gamma$ subunit of heterotrimeric G proteins interacts with actin filaments during neuronal differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 549 (2021) 98-104. DOI: 10.1016/j.bbrc.2021.02.095

Sierra-Fonseca J.A., Bracamontes C., Saldecke J., Das S., Roychowdhury S. Activation of β - and α 2-adrenergic receptors stimulate tubulin polymerization and promote the association of $G\beta\gamma$ with microtubules in cultured NIH3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018 Sep 3; 503(1):102-108. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.05.188.

Как раньше все было просто на схемах сигнальных путей нейротрансмиттерных рецепторов: рецептор - G-белок и последующее взаимодействие с аденилатциклазой и протеинкиназой А. Ныне же картина внутриклеточной передачи сигнала от G-белок связанных рецепторов неизмеримо усложнилась.



Сигнальные пути 5-HT_{1A}-рецептора (Из De Deurwaerdère et al., 2020. *Neuropharmacology* 168, 107967)

Гетеротримерные G-белки являются одним из ключевых элементов в передаче сигналов от рецепторов клеточной поверхности (G protein-coupled receptors, GPCRs) к внутриклеточным эффекторным молекулам. Гетеротример G белка, состоящий из связывающей гуанин-нуклеотид α -субъединицы и субъединицы $\beta\gamma$, неактивен, но связывание агониста с GPCRs запускает в G-белке структурные перестройки, так что внутриклеточный домен катализирует обмен нуклеотида в α -субъединице. В результате активированная субъединица $G\alpha$ диссоциирует с $G\beta\gamma$, и, таким образом, они обе оказываются способными принимать участие в регуляции внутриклеточных эффекторных молекул.

Наряду α -субъединицей G-белка, активирующей аденилатциклазу или фосфолипазу C, самостоятельными эффектами обладает и субъединица $\beta\gamma$. Первая обнаруженная в литературе по этому вопросу работа (Logothetis et al., 1987) показала, что $\beta\gamma$, а не α -субъединицы ответственны за активацию мускариновых калиевых каналов в клетках предсердия куриного зародыша. Мишенями субъединиц $\beta\gamma$, оказались также белки SNARE-комплекса (Yim et al., 2018), в частности, серотонинергический механизм с участием $G\beta\gamma$ -субъединицы, опосредующий регуляцию слияния синаптических пузырьков с клеточной мембраной (Photowala et al., 2006).

Хотя G-белки, взаимодействующие с рецепторами, являются мембранно-связанными, данные из различных лабораторий в последнее время дают основание предполагать, что субъединицы G-белка могут связываться и с элементами цитоскелета, которые в ходе, например, дифференцировки нейронов претерпевают быструю перестройку. В процессе формирования аксона микротрубочки (MTs) выстраиваются в параллельные селективно стабилизированные пучки, а конус роста обогащен актиновыми филаментами (AFs), участвующими в формировании филоподий и ламеллоподий. Координация между MTs и AFs критична для направления роста аксона и продвижения конуса роста.

Впервые влияние субъединиц G-белка на цитоскелет было показано в отношении микротрубочек (MTs): субъединицы $G\alpha$, $G\beta$ и $G\gamma$ ингибировали сборку и активировали динамику MT *in vitro* (Roychowdhury et al., 1997), при том, что восстановленный гетеротример $G\alpha\beta\gamma$ в отношении модулирования сборки MT был неактивен (Roychowdhury et al., 2006). Напротив, $G\beta\gamma$ сборку MT активировал [Roychowdhury et al., 1999].

Первая из рассматриваемых в данном комментарии работа Sierra-Fonseca et al., 2018 существенно уточнила знания о механизмах клеточной регуляции и взаимодействия субъединицы $G\beta\gamma$ с тубулиновым цитоскелетом. Известно, что введение агониста β -

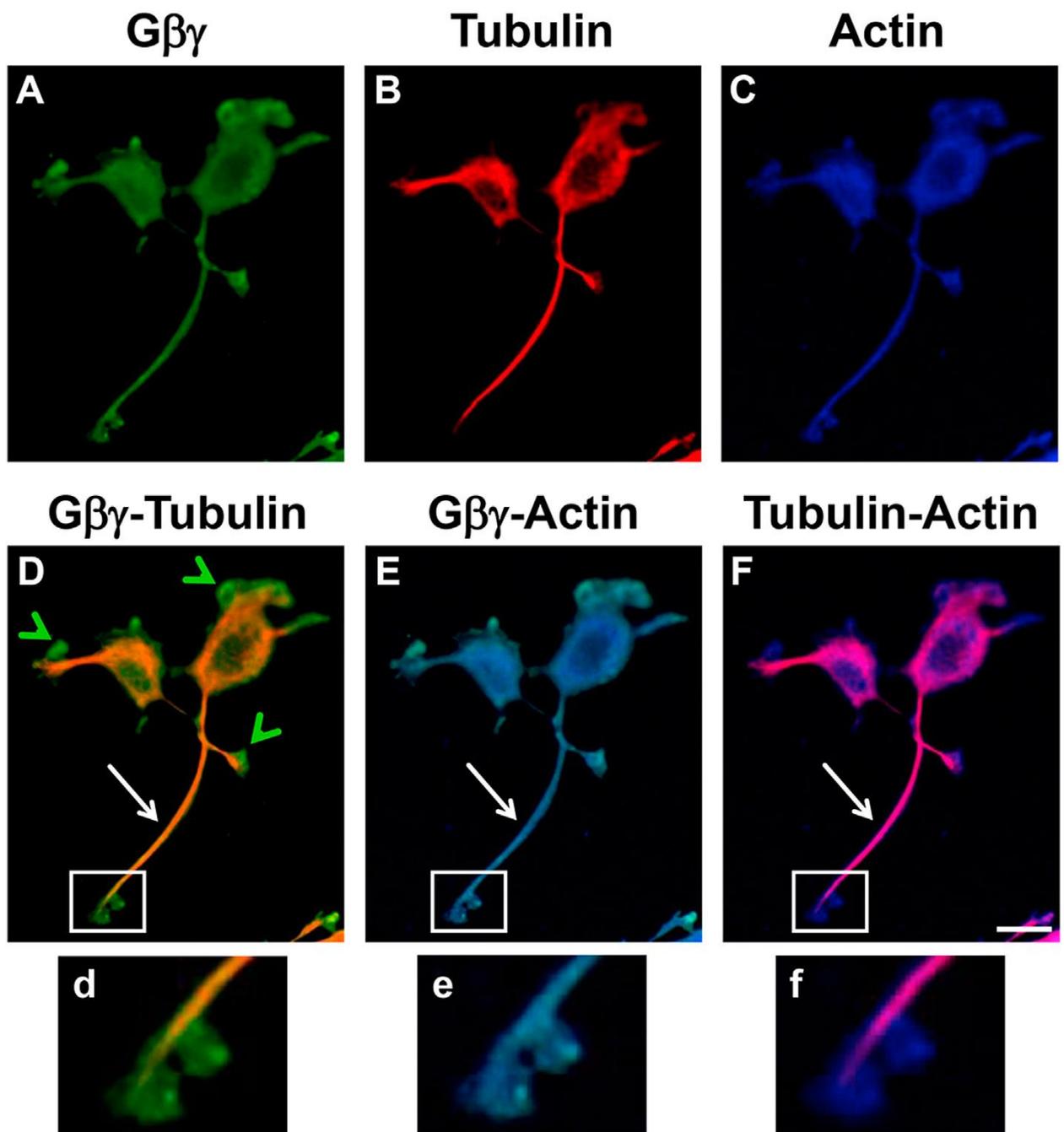
адренорецепторов изопротеренола приводит к активации в клетках NIH3T3 гетеротримера Gs ($G\alpha\beta\gamma$), за которой следует диссоциация субъединиц α и $\beta\gamma$ с последующей активацией аденилатциклазы [см. Roychowdhury, Rasenick, 2008; Roychowdhury, Sierra-Fonseca, 2017]. Поскольку β -адренорецепторы активируют Gs-белки, что ведет к повышению уровня цАМФ, а α -адренорецептор, напротив, активирует Gi белки, в результате чего продукция цАМФ ингибируется, возможное участие в этом процессе α -субъединиц G-белков и цАМФ, а также последующих за ним эффекторов исключено.

В данной работе клетки NIH3T3 обрабатывали 50 μ M изопротеренола, а сборку МТ оценивали путем определения иммунореактивности тубулина во фракции МТ и растворимой фракции тубулина с помощью специфических антител к α -тубулину. В присутствии изопротеренола сборка МТ стимулировалась на 37%. Соответственно, иммуноблот анализ с помощью антител к G β , показал, что после обработки изопротеренолом ассоциация G $\beta\gamma$ с МТs возросла на 57%. Повторное исследование блотов с антителами к актину показало отсутствие существенных изменений полимеризации актина в присутствии изопротеренола.

В отличие от изопротеренола агонист α 2-адренорецептора UK14,304 также стимулировал сборку МТ на 37% и ассоциацию G $\beta\gamma$ с МТs на 74%. Так же, как и в случае с изопротеренолом, отсутствовало воздействие на актиновые филаменты и взаимодействие с ними G $\beta\gamma$ -субъединиц.

Однако, во второй из рассматриваемых работе Sierra-Fonseca et al., 2021 показано, что, помимо МТs, в клетках PC12 под действием фактора роста нервов (NGF) субъединица G $\beta\gamma$ также взаимодействует с актиновыми филаментами, и ее координированные взаимодействия с двумя основными элементами цитоскелета критичны для роста аксонов и дифференцировки. Хотя известно, что NGF вызывает свой эффект через рецептор тирозин киназы TrkA, авторы предполагают возможное участие в этом процессе GPCRs.

В работе, используя тройное иммунофлуоресцентное окрашивание, оценивали колокализацию анти-G β (зеленое окрашивание) с антителами к актину (голубое) и с антителами к тубулину (красное) в дифференцированных NGF клетках PC12.



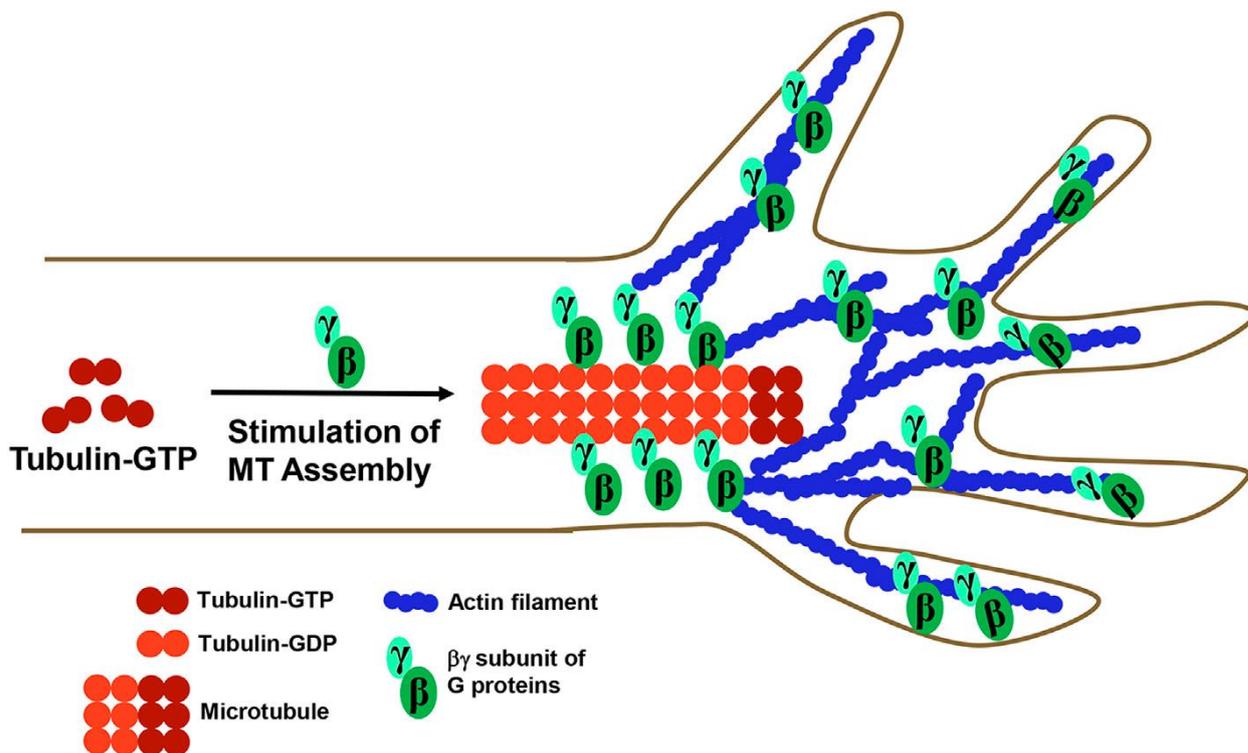
Из Sierra-Fonseca et al., 2021

В обработанных NGF клетках $G\beta\gamma$ обнаруживаются вдоль отростков нейрона, где они колокализуются со структурами, содержащими актин и тубулин (фрагменты D-F на рисунке сверху). Важно, что окончания этих аксонов демонстрируют низкое иммуноокрашивание тубулина, и в дистальных окончаниях $G\beta\gamma$ колокализуется **только** с актином.

Взаимодействие $G\beta\gamma$ -актин в цитоскелетной фракции существенно увеличивалось с $25 \pm 3.3\%$ в контрольных клетках до $52.4 \pm 10.1\%$ в присутствии NGF ($p < 0.05$). Предобработка клеток нокодазолом, деполимеризующим тубулин, не влияла на

взаимодействие $G\beta\gamma$ -AF, и полагают, что взаимодействие между актином и $G\beta\gamma$ происходит не через MTs.

Основываясь на результатах данной работы, авторами предложена модель, которая описывает взаимодействие $G\beta\gamma$ с MTs и AFs в ходе роста аксона и его роль в формировании конусов роста. Предполагается, что субъединица $G\beta\gamma$, которая связывается с тубулином и стимулирует сборку MT, направляет MTs в конус роста и позволяет им взаимодействовать с AFs. $G\beta\gamma$, которая предпочтительно ассоциируется с MTs, вероятно, в конусе роста взаимодействует исключительно с актиновыми филаментами.



Из Sierra-Fonseca et al., 2021

Авторы предположили, что взаимодействие $G\beta\gamma$ и с MTs, и с AFs определяет значение $G\beta\gamma$ как ключевой трансмембранной сигнальной молекулы, которая опосредует таким образом рост аксона, и, можно предположить, другие процессы, реализуемые цитоскелетом.

Сравнительный анализ данных двух рассматриваемых работ ставит важный вопрос: чем объясняется такая существенная разница между эффектами агонистов адренорецепторов и NGF? Поскольку субъединица $G\beta\gamma$ является достаточно неспецифическим сигнальным агентом, в чем-то подобным ионам кальция, который Rasmussen называл «рискованным мессенджером», способным влиять на массу процессов, каким образом при действии адренолигандов они взаимодействуют исключительно с тубулиновым цитоскелетом, а NGF затрагивает и актиновый? Напрашиваются два

варианта объяснений. Либо субъединица G $\beta\gamma$ является столь же короткодистантным сигнальным агентом, как и ионы Ca²⁺, при том, что в окончаниях аксонов клеток PC12 сосредоточены исключительно актиновые элементы цитоскелета, а в самом аксоне, напротив, только или в основном – тубулиновые. Тогда решающим фактором становится место локализации GPCR, и, если адренорецепторы отсутствуют в окончаниях аксона, то и присутствующие там актиновые филаменты не затрагиваются. Напротив, предполагаемые авторами рассматриваемых работ GPCR к NGF, очевидно, в соответствии с этой гипотезой, должны быть сосредоточены именно в окончаниях аксона. Альтернативное объяснение может состоять в том, что при действии лигандов различных рецепторов в каждом случае формируются специфические наборы субъединиц в составе G $\beta\gamma$, разнообразие которых насчитывает 5 G β и 12 G γ (см. Yim et al., 2018).

В любом случае, данные рассмотренных работ могут существенным образом сказаться на трактовке уже известных фактов, касающихся функционирования цитоскелета и его регуляции, и планировании новых экспериментов.

Ю.Б.Шмуклер

вед.н.с., д.б.н.