

## ЗНАЧЕНИЕ КИНАЗЫ AURORA A В РАЗВИТИИ ПОЛИКИСТОЗНОЙ БОЛЕЗНИ ПОЧЕК

*Аннотация.* В данной работе впервые показано, что киназа AurA связывается с белком полицистин-2 и фосфорилирует его С-терминальный домен, что может свидетельствовать о ее важной роли в развитии поликистозной болезни почек (ПБП). Продемонстрированная в этой работе роль ингибитора AurA в нормализации длины первичной реснички, редуцированной при ПБП, может способствовать дальнейшему изучению приложения ингибиторов этой киназы в терапии ПБП. Таким образом, данные результаты могут свидетельствовать о новой роли киназы AurA в регуляции активации полицистина-2 как возможного участника в нарушении механизма контроля пролиферации почечного эпителия.

*Ключевые слова:* поликистозная болезнь почек, PKD2, полицистин-2 (PC2), киназа Aurora A, первичная ресничка.

Поликистозная болезнь почек (ПБП) – врождённое заболевание человека, характеризующееся образованием и ростом множественных кист в обеих почках. ПБП связана с нарушением дифференцировки и пролиферации эпителиальных клеток в собирающих канальцах почек [1]. ПБП развивается в случаях появления инактивирующих мутаций в генах PKD1 или PKD2 [2], кодирующих трансмембранные белки полицистин-1(PC1) и полицистин-2(PC2). PC1 является интегральным мембранным белком, который связывается с кальциевым каналом, сформированным из шести субъединиц белка PC2, образуя комплекс, контролирующей дифференцировку и пролиферацию клеток почечного эпителия в сенсорном сигнальном пути [3]. Показано, что комплекс PC1 и PC2 локализуется в плазмолемме первичных ресничек [4]. Неподвижная первичная ресничка представляет собой выдающуюся во внеклеточное пространство покрытую цитоплазматической мембранной органеллу, в основании которой находится базальное тело, из которого восходят девять дуплетов периферических микротрубочек [5]. Есть все основания полагать, что первичные реснички, присутствующие на поверхности почечных эпителиальных клеток, являются механосенсорными органеллами, которые инициируют широкий спектр передачи Ca<sup>2+</sup>-опосредованных регуляторных сигналов, причем в данном случае реснички «отслеживают» скорость тока мочи через канальцы и собирательные трубочки. Мутации PC1 или PC2 приводят к повреждению механосенсорных функций реснички и развитию поликистоза почек [4]. Киназа Aurora A (AurA) хорошо изучена как митотическая киназа, которая является критическим фактором в сборке митотического веретена [6]. Недавно была показана ключевая роль AurA в инициации разборки и последующей потери клеткой первичной реснички [7]. В результате изучения развития ПБП у экспериментальных животных было выявлено, что потеря первичной реснички или редукция ее длины ведет к развитию кист [4]. В данной работе впервые показано, что киназа AurA связывается с белком PC2 и фосфорилирует его С-терминальный домен, что может свидетельствовать о ее важной роли в развитии ПБК.

*Материалы и методы*

В данной работе были использованы клеточные культуры НК2 и кистозные почечные клетки (ATCC, США). НК2, почечные эпителиальные клетки человека, полученные

из эпителия проксимальных канальцев и кистозные почечные клетки культивировали в среде GIBCO Keratinocyte-SFM (Invitrogen, США). Трансфекцию клеток НК2 проводили с использованием плазмидных векторов, несущих гены *AurA* и *PKD2*. Для этого клетки высевали на чашку Петри и выращивали до субконфлуентного монослоя. Трансфекция была выполнена с совместным использованием реагентов Lipofectamine и Reagent plus в соответствии с протоколом производителя (Invitrogen, США).

Для исследования возможности коиммунопреципитации киназы *AurA* с PC2 клеточные экстракты инкубировали с антителами к киназе *AurA* (BD Bioscience, США) в течение 12 ч при 4°C, полученные комплексы осаждали, инкубируя с протеин А/М-сефарозой 1 ч. при 4°C с последующим центрифугированием. Затем белки элюировали путем добавления буфера Лэммли и наносили на денатурирующий полиакриламидный гель (ПААГ) для проведения иммуноблотинга с антителами против PC2 (Sigma, США).

Для проведения киназной реакции *in vitro* была использована рекомбинантная киназа *AurA* (Millipore, США) и в качестве субстрата - конъюгированный с глутатион S-трансферазой (GST) С-терминальный домен белка PC2, выделенный из *E. coli* линии BL21. Фосфорилирование рекомбинантных белков *in vitro* проводили в течение 30 мин при 37°C в реакционной смеси объемом 50 мкл, содержащей реакционный буфер, 37 кБк [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] АТФ, 1 мкг киназы *AurA* и 1 мкг одного из двух субстратов. Пробы наносили на гель и после ПААГ гель экспонировали с рентгеновской пленкой. Иммунофлюоресцентный анализ проводился с использованием растущих на покровных стеклах клеток. После фиксации 4%-ным формалином клетки окрашивали сначала первичными антителами против ацитилированного тубулина (AcTub) – окрашивание реснички, а затем – вторичными. ДНК окрашивали красителем DAPI (4 мкг/мл). Образцы анализировали при помощи конфокального микроскопа Nikon C1 Spectral (Nikon, США).

#### Результаты исследования и их обсуждение

Связывание и фосфорилирование киназой *AurA* С-терминального (СТ) домена почечного белка полицистина-2 (PC2). Было исследовано возможное участие киназы *AurA* в регуляции PC2, мутации или нарушения функции которого ведут к развитию ПБП. С целью изучить возможность взаимодействия *AurA* и PC2 мы клонировали кДНК киназы *AurA* и PC2 в плазмидные вектора для экспрессии данных генов в клетках НК2. Затем полученные конструкции были трансфецированы в культуру НК2. После проведения коиммунопреципитации (КИП) с антителами к *AurA* и последующего иммуноблотинга белков преципитата с антителами против PC2 мы наблюдали, что киназа *AurA* действительно образует комплекс с полицистином-2 (рис. 1А). Левая дорожка – КИП между киназой *AurA* и PC2, правая – контроль (контр.) специфичности КИП, где вместо полицистина-2 был взят пустой вектор. На нижней панели отображен уровень экспрессии киназы *AurA* в клеточных лизатах (КЛ). *AurA* является серин-треониновой киназой, регулирующей белки путем их фосфорилирования [6]. С целью изучить возможность регуляции PC2 киназой *AurA* путем фосфорилирования мы проанализировали аминокислотную последовательность PC2 и предсказали находящийся на его С-терминальном домене консенсусный мотив для фосфорилирования киназой *AurA* PRGSI (S=S829). Найденный мотив соответствует стандартному мотиву фосфорилирования для *AurA* R/K/N-R-x-S/T-V (х – любая аминокислота, V – любая аминокислота, за исключением пролина) [8]. Затем был проведен киназный анализ *in vitro* с использованием рекомбинантной киназы *AurA* и рекомбинантного СТ домена PC2 в качестве субстрата. Показано, что *AurA* фосфорилирует *in vitro* СТ домен PC2 дикого типа (WT), но не СТ домен PC2 с введенной мутацией в данный сайт фосфорилирования (S829A) (рис. 1Б). Присутствие данных белков в реакционной смеси подтверждали путем окрашивания ПААГ кумаси синим (KM) (рис. 1Б,

средняя и нижняя панель).

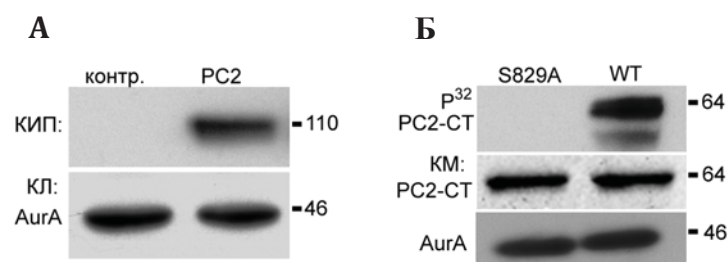


Рис. 1. А. Коиммунопреципитация полицистина-2 (PC2) с киназой AurA. Б. Фосфорилирование киназой AurA СТ домена полицистина-2 *in vitro*.

В результате изучения развития ПБП у экспериментальных животных и людей было выявлено, что потеря или редукция длины первичной реснички ведет к развитию кист [4]. Исходя из этих данных была изучена возможность воздействия путем ингибирования AurA на количество и длину первичных ресничек на поверхности кистозных клеток, полученных от больных с ПБП. С целью исследовать, может ли ингибирование активности AurA влиять на размер первичной реснички, кистозные клетки были инкубированы с ингибитором AurA РНА-680632 в течение 24 часов и затем первичные реснички на поверхности этих клеток были визуализированы методом иммунофлуоресценции. В результате анализа было показано, что ингибирование киназы AurA ведет к восстановлению нормальной длины первичной реснички, соответствующей 3-4 мкм (рис. 2). Принимая во внимание описанную ранее роль AurA в разборке первичной реснички [7], можно заключить, что чрезмерно активированная AurA вносит вклад в укорочение первичной реснички. Соответственно, ингибирование киназы AurA способствует восстановлению нормальной длины первичной реснички.

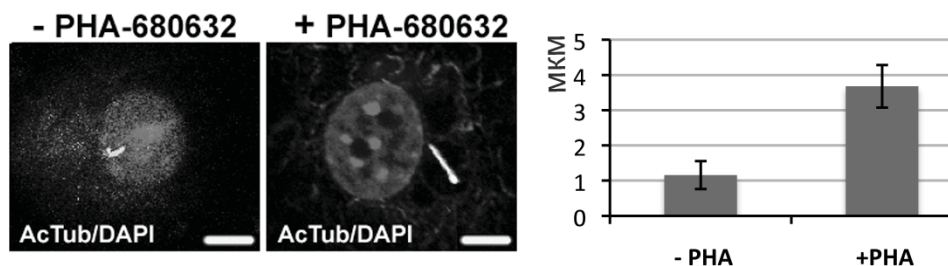


Рис. 2. Справа - Иммунофлуоресцентная детекция размера первичной реснички до (-PNA) или после (+PNA) обработки клеток ингибитором AurA РНА-680632 (PNA). Масштабные отрезки – 20 мкм.

Слева – график, отражающий длину первичной реснички до или после обработки клеток ингибитором AurA РНА. Ось Y – длина первичной реснички (мкм).

Таким образом, с помощью коиммунопреципитации и киназной реакции *in vitro* мы показали, что AurA связывает и фосфорилирует PC2, - белок, нарушение функции которого ведет к развитию ПБП. PC2, встроенный в плазмолемму первичной реснички, функционирует как механосенсор, который улавливает сигналы тока мочи, движущейся через каналцы и собирающие трубочки [4]. Данные результаты позволяют предположить, что киназа AurA может увеличивать уровень фосфорилированного PC2, что влечет за собой изменение его функционирования и неспособность первичных ресничек по-

чечного эпителия реагировать на изменения потока мочи. Этот патологический процесс ведет к неконтролируемому усилению притока внутриклеточного  $Ca^{2+}$ , что способствует нерегулируемой пролиферации почечного эпителия, и, в конечном итоге, приводит к формированию кист. Так же показанная в данной работе роль ингибитора AurA нормализовывать длину первичной реснички, редуцированную при ПБП, свидетельствует о ее возможной гиперактивации в кистозном эпителии и может способствовать дальнейшему изучению приложения ингибиторов этой киназы в терапии ПБП. Таким образом, наши результаты могут свидетельствовать о новой роли киназы AurA в регуляции активации полицистина-2 как возможного участника в нарушении механизма контроля пролиферации почечного эпителия.

#### ЛИТЕРАТУРА

- 1 Вельтищев Ю.Е., Игнатова М.С. Наследственные и врожденные болезни почек и мочевыводящих путей. Наследственная патология человека. М.: Медицина, 1992. Т.2. 407 с.
- 2 Igarashi P., Somlo S. Genetics and pathogenesis of polycystic kidney disease // J Am Soc Nephrol. – 2002. – V.13. – №9. – P. 2384–2398.
- 3 Hanaoka K., Qian F., Boletta A., et al. Co-assembly of polycystin-1 and -2 produces unique cation-permeable currents // Nature. – 2000. – V.408. – №6815. – P.990–994
- 4 Pan J., Wang Q., and Snell W. J. Cilium-generated signaling and cilia-related disorders // Lab Invest. – 2005. – V.85. – №4. – P.452–463.
- 5 Жажан П.М. Первичная ресничка как механосенсор // Сенсорные системы. – 2008. – Т. 22. – №2. – С.99–111.
- 6 Andrews P. D., Knatko E., Moore W. J., and Swedlow J. R. Mitotic mechanics: the auroras come into view // Curr Opin Cell Biol. – 2003. – V.15. – №6. – P.672–683.
- 7 Pugacheva E. N., Jablonski S. A., Hartman T. R., et al. HEF1-dependent Aurora A activation induces disassembly of the primary cilium // Cell. – 2007. – V.129. – №7. – P.1351–1363.
- 8 Ferrari S., Marin O., Pagano M. A., et al. Aurora-A site specificity: a study with synthetic peptide substrates // Biochem J. – 2005. – V.390. – №Pt 1. – P.293–302.

O. Plotnikova, R. Lacis

#### THE ROLE OF AURORA A-KINASE IN POLYCYSTIC KIDNEY DISEASE

Abstract. In this study we have demonstrated that Aurora A (AurA) coimmunoprecipitates with polycystin-2 (PC2) in mammalian cells and phosphorylates PC2 in vitro that might suggest biological role for AurA in the regulation of PC2 function. Inhibitors of AurA increase the length of primary cilium reduced in PKD cysts and that inhibition of AurA may have therapeutic benefit in PKD. Overall, the current data support the idea that AurA might be involved in the pathogenesis of PKD.

*Key words:* Polycystic kidney disease (PKD), PKD2, polycystin-2, Aurora A, primary cilia