

Исследование химер SH3 домена со встроенными пролин - богатыми пептидными лигандами.

Гущина Л.В., Николаева Т.А., Филимонов В.В.
аспирантка, студентка, ведущий научный сотрудник
Институт белка РАН, Пущино, 142290 Россия
E-mail: ljubin@vega.protres.ru

Для исследования процесса самоорганизации белков и моделирования белок - белковых взаимодействий лучше всего подходят небольшие, хорошо растворимые глобулярные белки, например такие, как SH3 (Src-homology region-3) домены. Это типичные представители β - структурных белков с ортогональным расположением коротких β - листов, состоящие из 60 - 85 аминокислотных остатков. Было показано, что SH3 домены являются важными компонентами в цепях передачи сигналов в эукариотических клетках; их роль была отмечена в развитии ряда важных патологий, таких как рак, СПИД, лейкемия, остеопороз и другие. Считается, что регуляторная роль SH3 доменов осуществляется через их взаимодействие с короткими (длиной 8 – 10 аминокислотных остатков) пролин – богатыми участками других белков. Эти участки (пептидные лиганды) могут располагаться на узнающей поверхности домена в двух противоположных ориентациях – I и II. Ранее, путем исследования взаимодействия домена с олигопептидами, было показано, что спектриновый SH3 домен предпочтительно образует комплексы с лигандами в ориентации I с довольно высокой константой диссоциации ($\sim 100 \mu\text{M}$). С целью уменьшения эффективной константы диссоциации и выяснения возможности связывания этим доменом лиганда в ориентации II, нами были сконструированы два варианта химерных белков. В первом, первичная структура химеры собиралась по схеме мет-лиганд–линкер–КП, где в качестве предполагаемого лиганда была выбрана последовательность GAPPLPPYSA, линкер содержал два или три остатка, а КП – это круговой пермутант S19-P20s с разрывом в RT петле исходного домена. Во втором варианте, химеры собирались на основе исходной последовательности домена по схеме мет-SH3-линкер-лиганд, где линкер имел длину 10 аминокислот, а лиганд имел последовательность PPPLPPR.

Гены химерных белков первого типа *sh3f1* и *sh3f2*, с линкерами гли-асн-гли и гли-гли соответственно, а также гены химерных белков второго типа были сконструированы, клонированы и экспрессированы в клетках *Escherichia coli*. Данные флюоресценции и сканирующей калориметрии свидетельствуют о том, что в белке SH3F2 лиганд прочно сидит на месте связывания в ориентации II, в то время как в случае SH3F1 лиганд практически не взаимодействует с телом домена. Анализ данных для химер второго типа показал, что лиганд также не садится на место связывания. Эти различия могут быть связаны с тем, что подвижность участков RT петли и линкера у химер SH3F2 достаточно высока, для того чтобы снять какие-то стерические препятствия к посадке лиганда на место связывания. С другой стороны, наличие длинного линкера, вероятно, не приводит к увеличению эффективной константы связывания лиганда до значений, необходимых для прочного связывания. Для выяснения причин низкой аффинности в составе химер проводится мутагенез в области линкеров и лигандов, а также ведутся структурные исследования белков. Начаты работы по определению структуры химер методом ЯМР. Были получены кристаллы SH3F2 белка и собраны дифракционные данные с разрешением до 2.6 Å. Получена карта электронной плотности, ведется построение и уточнение структурной модели белка.

Данная работа поддержана грантом Программы МКБ РАН и грантом ИНТАС (№ 03-55-5569).