

Исследование особенностей взаимодействия белка StAR с универсальными адаптерными белками семейства 14-3-3**Научный руководитель – Случанко Николай Николаевич*****Тугаева Кристина Владимировна****Студент (магистр)*

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра биохимии, Москва, Россия

E-mail: kri94_08@mail.ru

Стероидогенный регуляторный белок (StAR) отвечает за доставку молекул холестерина в митохондрии, где начинается синтез стероидных гормонов. Согласно последним исследованиям, StAR переносит холестерин в кооперации с другими белками. Также существуют работы на клеточных моделях, предполагающие, что в регуляции активности StAR принимают участие белки семейства универсальных адаптерных белков 14-3-3 [1], т.к. фосфорилированные остатки Ser⁵⁷ и Ser¹⁹⁵ и их аминокислотное окружение в белке StAR напоминают консенсусные последовательности для взаимодействия с 14-3-3. Однако предложенный механизм регуляции кажется нам противоречивым, и в некоторых местах расходится с представлениями о функционировании белков 14-3-3. Поэтому в данной работе мы идентифицировали участки фосфорилирования в белке StAR, полученного в системе коэкспрессии с протеинкиназой A, и изучили особенности его взаимодействия с белками 14-3-3.

Согласно литературным данным, именно остаток Ser¹⁹⁵ играет ключевую роль в связывании с 14-3-3, поэтому для изучения взаимодействия с белком, содержащим только Ser¹⁹⁵, был получен по разработанной нами ранее методике [2] фосфоимитирующий мутант STAR.66 S¹⁹⁵E. Однако данные наших опытов на STAR.66 S¹⁹⁵E показали отсутствие комплекса с 14-3-3, что может означать, что другой(-ие) участки задействованы в этом взаимодействии. Для проверки гипотезы о том, что участок Ser⁵⁷ является более важным для связывания, был получен белок с удлиненным N-концом. Методом масс-спектрометрии было идентифицировано в нём три участка фосфорилирования: описанные в литературе Ser⁵⁷ и Ser¹⁹⁵, а также Ser⁵⁶. Предполагая, что фосфорилирование двух соседних участков Ser может препятствовать образованию комплекса между 14-3-3 и StAR, была получена мутантная форма белка STAR.46 S⁵⁶A. С целью создания участка максимально соответствующего консенсусной последовательности для 14-3-3 в другой конструкции Leu⁵⁹ был заменен на Pro. Методом гель-фильтрации было показано, что прединкубация только белков 14-3-3 и STAR.46 S⁵⁶A L⁵⁹P в присутствии ионов Mg⁺² приводит к образованию их комплекса. Также обработка глутаровым альдегидом этой смеси приводила к появлению «сшитых» белковых комплексов с кажущимися молекулярными массами около 80 кДа, что соответствует комплексу STAR.46 S⁵⁶A L⁵⁹P с димером 14-3-3. Таким образом, в данной работе нами было показано, что белок 14-3-3 образует комплекс только с фосфорилированным белком STAR.46 S⁵⁶A L⁵⁹P, что в свою очередь подтверждает нашу гипотезу о важности именно остатка Ser⁵⁶ в этом взаимодействии. *Работа поддержана грантом РФФИ 17-04-00331-а.*

Источники и литература

- 1) Aghazadeh Y, et al. Protein Modifications Regulate the Role of 14-3-3 Adaptor Protein in cAMP-induced Steroidogenesis in MA-10 Leydig Cells // JBC. 289. 2014. 26542-26553.

- 2) Sluchanko N.N. et al High-yield soluble expression, purification and characterization of human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) fused to a cleavable Maltose-Binding Protein (MBP) //Prot. Exp. and Purif. 119. 2016. 27-35.