

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНЫХ АСПЕКТОВ ТРАНСМЕМБРАННОГО И ПРИМЕМБРАННОГО ДОМЕНОВ РЕЦЕПТОРА TrkA

Научный руководитель – Гончарук Сергей Александрович

Васильева Е.В.¹, Кот Э.Ф.²

1 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра биоорганической химии, Москва, Россия, *E-mail: anflez001@bk.ru*; 2 - Московский физико-технический институт, Москва, Россия, *E-mail: kot@phystech.edu*

Нейротрофины - это важнейшие участники процесса развития нервной системы, так как они представляют собой факторы роста. Они играют важную роль в таких процессах жизнедеятельности нейронов, как: дифференциация, миграция, синаптическая пластичность, запрограммированная клеточная гибель и защита от апоптоза. Экспрессия нейротрофинов напрямую связана с тем, как проявляют себя различные фенотипические признаки. На сегодняшний день известны два типа рецепторов: специфические (для каждого типа нейронов) - Trk-рецепторы и общий для всех нейротрофинов рецептор роста нейронов p75NTR.

Одним из самых популярных для изучения и наиболее известных представителей специфических рецепторов является TrkA. Он включает в себя участок связывания для фактора роста нейронов (NGF). Но несмотря на его известность и популярность в качестве объекта для исследований, TrkA на сегодняшний день не изучен достаточно хорошо, чтобы полностью представлять себе механизм его работы.

Внеклеточная часть этого белка состоит из лейцин-богатого домена, который обособлен двумя цистеин-богатыми участками, и двумя иммуноглобулин-подобными доменами. Последние в свою очередь связываются с трансмембранным доменом (ТМД) через небольшой линкер. ТМД представлен одиночной α -спиралью. Внутриклеточная же часть белка содержит примембранный домен, связывающий ТМД и киназный участок, который в свою очередь ответственен за запуск сигнального каскада внутри клетки. В более ранних исследованиях считалось, что взаимодействие с NGF приводит непосредственно к димеризации рецептора и затем активации киназного домена. Но более новые работы показывают, что на поверхности мембраны TrkA может присутствовать в том числе в виде неактивного димера. Однако на данный момент недостаточно данных, чтобы иметь полное представление о том, как сигнал передается к трансмембранному домену. И поэтому мы одновременно изучаем структуру трансмембранного и примембранного регионов с помощью ЯМР спектроскопии, чтобы установить принципы их работы и взаимосвязь между ними.

В этой работе мы приводим высокоэффективные протоколы продукции связки примембранного и трансмембранного доменов в системе бесклеточного синтеза, выходы составили порядка миллиграмма с миллилитра реакционной смеси. Кроме того, представлены протоколы очистки данного белка, включающие металл-хелатную аффинную хроматографию и гель-фильтрацию. Показано, что наиболее подходящей средой, имитирующей мембранное окружение, являются бицеллы DMPC/CHAPS. В данном окружении трансмембранный домен принимает форму альфа спирали, а примембранный регион находится в растворе. То есть близко к тому, как они существуют в природе. С использованием метода ЯМР были описаны структурные характеристики обеих частей исследуемого фрагмента рецептора TrkA. Для трансмембранного домена получены параметры альфаспиралей, а для примембранного региона - описаны его структурные элементы и их подвижность.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-00241.