

Исследование влияния мутаций в трансмембранном домене на активацию рецептора, подобного рецептору инсулина (IRR)

Научный руководитель – Серова Оксана Викторовна

Калиниченко Андрей Леонидович

Студент (бакалавр)

Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемакина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Москва, Россия

E-mail: andrus20002014@gmail.com

О. В. Серова, А. Р. Агишева, А. А. Гавриленкова, Е. Д. Милешина, М. А. Пигусова, Е. А. Ганцова, И. Е. Деев, Е. В. Бочаров, А. Г. Петренко

Рецептор, подобный рецептору инсулина (IRR) - белок семейства рецепторных тирозинкиназ. Рецепторы этого типа состоят из трех частей: внеклеточной части, связывающейся с лигандом, трансмембранного домена (ТМД), и внутриклеточной части, обладающей киназной активностью. При активации рецептора внутриклеточные домены трансфосфорилируются и вызывают клеточный ответ. Было показано, что IRR является внеклеточным щелочным сенсором и участвует в регуляции секреции бикарбоната почками [2]. Недавние исследования указывают важную роль ТМД в лиганд-зависимой активации рецепторов [1].

Для изучения роли ТМД в рН-зависимой активации нами были получены плазмиды, кодирующие рецептор IRR с заменой одного или двух аминокислотных остатков: P928A, V929E, G930R, V929E-G930R, T927I-G930I, F942I-F943I, G945D. Мутантные белки изучались на клеточной линии НЕК293, трансфецированной полученными плазмидами. Через два дня после трансфекции клетки инкубировали в среде F-12 с добавлением Tris-HCl (7,4 и 9,0) для активации рецептора IRR. Двойной мутант V929E-G930R также был исследован при кислых значениях рН: инкубировали в F-12 с MES-HCl (рН 5,5 и 6,5). Клеточные лизаты анализировали методом Вестерн-блота.

При анализе полученных данных было установлено, что мутации P928A, T927I-G930I, F942I-F943I, G945D значимо не влияют на активацию рецептора. Рецептор с двойной мутацией V929E-G930R фосфорилирован при нейтральном значении рН, в отличие от рецептора дикого типа, и уровень его активации не изменяется при повышении рН. Мутанты V929E, G930R были фосфорилированы значительно слабее при рН 7,4, но активация повышалась при щелочных значениях рН. В кислом диапазоне для мутанта V929E-G930R наблюдалось снижение доли фосфорилированного рецептора по сравнению с нейтральным рН. Полученные данные свидетельствуют, что мутации в положениях V929E и G930R могут стабилизировать рецептор IRR в активной конформации за счет ионного взаимодействия между мутантными аминокислотами в ТМД. Таким образом ТМД играет важную роль в активации IRR, и даже точечные замены в его аминокислотной последовательности, могут приводить к изменению характера активации рецептора.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований гранты № 19-04-01042, 19-34-90177.

Источники и литература

- 1) Bocharov E.V., Sharonov G.V., Bocharova O.V., Pavlov K.V. Conformational transitions and interactions underlying the function of membrane embedded receptor protein kinases // Biochim Biophys Acta Biomembr. 2017, 1859(9 Pt A), 1417-1429.

- 2) Deyev I.E., Sohet F., Vassilenko K.P., Serova O.V., Popova N.V., Zozulya S.A., Burova E.B., Houillier P., Rzhovsky D.I., Berchatova A.A., Murashev A.N., Chugunov A.O., Efremov R.G., Nikol'sky N.N., Bertelli E., Eladari D., Petrenko A.G. Insulin receptor-related receptor as an extracellular alkali sensor // Cell Metab. 2011, 13(6), 679-89.