

Разработка и характеристика флуоресцентной метки к фосфоинозитол-3,4,5-трифосфату

Научный руководитель – Пантелеев Михаил Александрович

Силинг Елизавета Андреевна

Студент (специалист)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет
биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

E-mail: liza.siling@gmail.com

Силинг Е. А.³, Мартъянов А.А.^{1,2}, Свешникова А.Н.¹⁻³

1. Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, 109029, Москва, ул. Средняя Калитниковская, 30,

2. Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева, 117997, Москва, ул. Саморы Машела, д.1,

3. Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, физический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, строение 2

Введение.

Фосфатидилинозитол-3-4-5-фосфат (PIP₃) - фосфолипид внутреннего слоя мембран клеток эукариот, участвующий в процессах внутриклеточной сигнализации. PIP₃ производится путём фосфорилирования PIP₂ фосфоинозит-3 киназами, активация которых происходит как при активации тирозинкиназной, так и при активации GPCR-сигнализации. В тромбоцитах - безъядерных клетках крови, ответственных за гемостаз - PIP₃ служит в качестве докингового сайта для тирозинкиназ бруттона (Btk), а также для RAP1b ГТФ-обменника RASA3. Также показано, что при сильной стимуляции тромбоцитов PIP₃ выставляется на внешнюю мембрану тромбоцита вместе с фосфатидилсеринем (PS). Несмотря на важность PIP₃ как вторичного мессенджера сигнализации, подходы к измерению его концентрации в живых клетках весьма ограничены.

Цель. Исследовать связывание флуоресцентной метки к PIP₃ с прокоагулянтными тромбоцитами, а также проверить её конкурентность с Аннексином-V (метка к фосфатидилсерину).

Методы. Клонирование проводилось с использованием метода AQUA. Белок был очищен на Ni-NTA колонке и переведен в буфер PBSx1. Характеристику спектров поглощения и флуоресценции проводили при помощи спектрофотометри и флуориметрии. Исследование связывания домена с PIP₃ проводилось с помощью проточной цитометрии с последующей обработкой результатов в программе FlowJo. Построение математической модели с помощью LSODA в Python 3.8.

Результаты.

Разработанная нами метка показала малый коэффициент связывания с тромбоцитами.

Клетки в покое на метку не отвечали, малая степень реакции наблюдалась у слабо активированных тромбоцитов.

Таким образом активация повышает коэффициент связывания метки, достаточным он является лишь при сильной активации тромбоцитов.

Результаты проточной цитометрии продемонстрировали конкуренцию метки на PIP₃ с фосфатидилсеринем. С помощью специально разработанной компьютерной модели удалось показать зависимость конкуренции от плотности образуемых кластеров PIP₃ и PIP₂-доменов.

Выводы.

Мы считаем, что разработанная метка способна связываться с PIP3. Предположительно, фосфоинозитол-3,4,5-трифосфат выставляется на тромбоците одновременно с PS, а конкуренция метки с аннексином позволяет говорить о гетерокластерных PIP3 и PH-доменах.