

Роль трансмембранного домена в фосфорилировании рецептора, подобного рецептору инсулина (IRR)

Гавриленкова Алина Александровна

Аспирант

Московский физико-технический институт, Москва, Россия

E-mail: alycat1008@gmail.com

А. А. Гавриленкова^{1,2}, И. Е. Деев², Э. В. Бочаров^{1,2}, О. В. Серова²

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. ак. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Рецептор, подобный рецептору инсулина, принадлежит семейству рецепторных тирозинкиназ (RTKs), которые играют ключевую роль в развитии и дифференцировке клеток. RTKs состоят из 3-х частей: внеклеточной части, которая отвечает за связь с лигандом, трансмембранного домена, и внутриклеточной части, участвующей в фосфорилировании субстратов. В лаборатории клеточной биологии рецепторов ИБХ РАН было показано, что IRR является внеклеточным щелочным сенсором, участвующим в регуляции секреции бикарбоната почками.

Для того, чтобы изучить роль трансмембранного домена в pH-зависимой активации рецептора IRR, в нашей лаборатории, были получены мутантные формы данного рецептора, содержащие одиночные и двойные замены. Для этого клетки НЕК293 трансфицировали плазмидными конструкциями, кодирующими мутантные формы IRR с заменами P928A, T927I-G930I, V929E-G930R, V929E, G930R, F942I-F943I, A938E-A939R, A938E, A939E. Спустя двое суток, клетки помещали в бессывороточную среду на 3 часа, а после обрабатывали растворами Tris-HCl с различными значениями pH. Далее клеточные лизаты анализировали методом вестерн-блота.

В результате эксперимента мы получили следующие данные. Мутации P928A, T927I-G930I, F942I-F943I не влияли на характер активации рецептора. Двойные замены V929E-G930R приводили к фосфорилированию рецептора при pH 7,4, в отличие от рецептора дикого типа, который активируется при значениях pH больше 8.0. Мутант V929E-G930R не реагировал на щелочную обработку и имел максимальную активацию при нейтральном pH. Единичные замены V929E и G930R также приводили к фосфорилированию рецептора при pH 7,4. Но в отличие от двойного мутанта, у мутантов с одиночными заменами наблюдалось увеличение уровня фосфорилирования при повышении pH.

Одиночная замена A938E и двойная замена A938E_A939R в трансмембранном домене IRR также приводит к фосфорилированию рецептора уже при нейтральных значениях pH внеклеточной среды. Напротив, замена A939R в трансмембранном домене рецептора IRR приводит к сдвигу pH чувствительности рецептора в щелочную область, фосфорилирование наблюдается при значениях pH внеклеточной среды >8.3. Исходя из полученных данных, мы можем сделать вывод о том, что трансмембранный домен играет важную роль в активации IRR, и даже точечные замены в его аминокислотной последовательности, могут привести к изменению характера активации рецептора.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (РНФ) грант № 23-25-00298.