

Разработка рекомбинантной метки к PIP3

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

Введение: Фосфатидилинозитол-3-4-5-фосфат (PIP3) - фосфолипид внутреннего слоя мембран клеток эукариот, участвующий в процессах внутриклеточной сигнализации. PIP3 состоит из инозитола в мио-форме, фосфорилированного в положениях 3,4,5, соединенного с глицериновой основой с двумя остатками жирных кислот посредством фосфатной группы. PIP3 играет роль в регуляции процессов пролиферации, аутофагии, изменении цитоскелета клеток, ремоделировании актина, везикулярном транспорте. Регуляторная роль PIP3 определяется наличием у некоторых белков специфичных доменов. Регуляция происходит посредством прямого взаимодействия с мембранными белками, или с помощью мембранного рекрутирования цитозольных белков, имеющих специфичные домены. В частности, было показано, что высокую аффинность к PIP3 имеет домен гомологии плекстрина (PH). [1] Вариабельность аминокислотного состава PH-домена связывают с функциональной эволюцией белков, его содержащих. [2] Существующие метки к PIP3 обладают рядом недостатков: низкой аффинностью, дороговизной и сложностью подготовки препарата. Для создания новой метки используется PH-домен GRP1 - основного рецептора к фосфоинозидам, цитозольного белка, рекрутирующегося на мембрану при повышении уровня содержания в ней PIP3.

Цель: Цель работы - получение рекомбинантной метки к PIP3 на основе химерного белка, состоящего из eGFP и PH-домена киназы GRP1.

Методы: рестрикция, лигирование PH-домена GRP1 в плазмиду pET28a, содержащую кодирующую последовательность белка eGFP, клонирование с использованием штамма XL E. coli, экспрессия в штамме BL E. coli, AQUA клонирование, конфокальная микроскопия. Моделирование плазмиды и дизайн праймеров были выполнены на платформе benchling.com. Метка была охарактеризована на PS/PC везикулах со вставками PI4,5P, P5P, а также тромбоцитах.

Результаты: Разработанная метка не связывалась ни с везикулами, содержащими PI4,5, ни с везикулами, содержащими PIP. С другой стороны, было получено связывание метки с прокоагулянтными тромбоцитами (сильно активированными тромбоцитами, перешедшими в фазу некроза) в области их шапки, которая является областью, обогащённой PIP3. Таким образом был сделан вывод о селективности разработанной метки.

Заключение: Полученная рекомбинантная метка позволяет обнаружить PIP3 в везикулах и мембранах эукариот. Вес метки - 18034.41 Da, степень мечения - 1.

Источники и литература

- 1) Mark A. Lemmon. Pleckstrin Homology (PH) domains and phosphoinositides. // Biochem Soc Symp. 2007; (74): 81–93

- 2) Gyles E. Cozier, Dalila Bouyoucef, and Peter J. Cullen. Engineering the Phosphoinositide-binding Profile of a Class I Pleckstrin Homology Domain // THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 278, No. 41, Issue of October 10, pp. 39489–39496, 2003